



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**TESIS**

**ESTUDIO DE VARIANTES GENÉTICAS DEL RECEPTOR LRP1 EN  
PACIENTES HIPERTENSOS MEXICANOS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**Vanessa López Pérez**



**MÉXICO, D.F.**

**2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: M EN C. ALICIA CERVANTES PEREDO**

**VOCAL: DR. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS**

**SECRETARIO: DRA. CLAUDIA HUESCA GOMEZ**

**1er. SUPLENTE: DRA. MARÍA TERESA DE LOURDES FLORES CAMACHO**

**2° SUPLENTE: DRA. MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA “IGNACIO CHÁVEZ”**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA**

**ASESOR DEL TEMA:**

**Dra. Claudia Huesca Gómez**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

**Dr. Ricardo Gamboa Ávila**

**SUSTENTANTE:**

**Vanessa López Pérez**

**Este trabajo fue financiado por el Apoyo Complementario para Investigadores en  
Proceso de Consolidación SNI-1-2009 de CONACYT número 119410.**

*We are an impossibility in an impossible universe.*

Ray Bradbury

*Nada es verdad, todo es posible.*

Altaïr Ibn-La'Ahad

*Sometimes it's only madness that makes us what we are.*

B. Wayne

*Rien dans la vie n'est à craindre, c'est seulement à être compris. Il est maintenant temps pour mieux comprendre, afin que nous puissions craindre moins.*

Marie Curie

*Watch your thoughts for they become words. Watch your words for they become actions. Watch your actions for they become... habits. Watch your habits, for they become your character. And watch your character, for it becomes your destiny! What we think we become.*

Margaret Thatcher

## Tabla de contenido

1. Abreviaturas.....	8
2. Definiciones.....	9
3. Marco Teórico.....	11
3.1 Hipertensión Arterial.....	11
3.1.1 Diagnóstico.....	11
3.1.2 Clasificación.....	12
3.1.3 Tratamiento.....	13
3.1.4 Factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares.....	15
3.1.5 Epidemiología de enfermedad cardiovascular.....	16
3.2 Aterosclerosis.....	18
3.2.1 Inicio y progresión de las lesiones ateroscleróticas.....	19
3.2.1.1 El Endotelio.....	20
3.2.2 Disfunción endotelial.....	22
3.2.3 Inicio de lesión - Formación de la estría grasa.....	24
3.2.4 Inflamación.....	27
3.2.5 Ruptura de placa y formación de trombos.....	29
3.3 Grosor íntima-media arterial.....	32
4. Antecedentes.....	33
4.1 El LRP1 y su papel en la aterogénesis.....	33
4.2 LRP1.....	34
Ligandos y otras funciones.....	36
Localización y estructura.....	36
Polimorfismos.....	37
5. Justificación.....	39

6.	Hipótesis.....	41
7.	Objetivos.....	42
7.1	Objetivo general: .....	42
7.2	Objetivos específicos: .....	42
8.	Diseño Experimental .....	43
8.1	Población de estudio.....	43
	Tamaño de la muestra .....	43
	Cálculo del tamaño de la muestra .....	44
8.2	Toma de muestra .....	44
8.3	Extracción de DNA.....	44
8.4	Perfil lipídico.....	44
8.5	Determinación del grosor intima media arterial .....	45
8.6	Cuantificación de Angiotensina II.....	45
8.7	Determinación genotípica del LRP1 .....	45
	Discriminación alélica.....	46
8.8	Análisis estadístico.....	46
9.	Resultados .....	48
9.1	Características clínicas de la población total y por grupo .....	48
9.2	Curvas de amplificación y discriminación alélica .....	50
9.3	Desequilibrio de ligamento .....	51
9.4	Frecuencias alélicas y genotípicas del LRP1 .....	52
9.5	Comparación de frecuencias alélicas con otras poblaciones previamente reportadas.....	52
9.6	Características clínicas de los grupos en estudio de acuerdo al genotipo.....	54
9.7	Resultados de regresión logística binaria .....	58
10.	Discusión.....	59
11.	Conclusiones .....	65

12. Bibliografía .....	67
13. Anexos.....	73
1. Extracción de DNA por equipo comercial .....	73
2. Frecuencias mundiales de HTA reportadas .....	75



## 1. Abreviaturas

ACV	Accidente cardiovascular
Ag II	Angiotensina II
CE	Células Endoteliales
c-HDL	Colesterol de lipoproteínas de alta densidad
c-LDL	Colesterol de lipoproteínas de baja densidad
CML	Célula de músculo liso
CT	Colesterol
EC	Enzima convertidora
ECA	Enzima convertidora de la angiotensina
ECV	Enfermedades cardiovasculares
GIM	Grosor de íntima-medio carotídeo
HDL	<i>High density lipoproteins</i> , lipoproteínas de alta densidad
HTA	Hipertensión Arterial
IDL	<i>Intermediate density lipoproteins</i> , lipoproteínas de densidad media
IMC	Índice de masa corporal
LDL	<i>low density lipoproteins</i> , lipoproteínas de baja densidad
LDLag	LDL agregadas
LDLox	LDL oxidadas
LRP1	Proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad
MAF	Alelo menos frecuente
µg	Microgramos
mg	Miligramos
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PGs	Proteoglicanos
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	<i>Single-Nucleotide Polymorphism</i> . Polimorfismo de un solo nucleótido
TG	Triglicéridos
VLDL	<i>Very low density lipoproteins</i> , lipoproteínas de muy baja densidad

## 2. Definiciones

**Angiogénesis:** Formación de nuevos vasos sanguíneos, neovasos, a partir de vasos sanguíneos ya existentes.

**Apoptosis:** Muerte celular programada mediada en su mayor parte por una familia de proteínas intracelulares denominadas caspasas.

**Aterogénesis:** Proceso de formación e incremento de lesiones ateromatosas en la pared arterial.

**Ateroma:** Lesión focal de la capa íntima arterial constituida por un núcleo rico en lípidos y cubierto de una capa fibrosa acompañada de un proceso inflamatorio continuo.

**Arterioesclerosis:** Término empleado para designar un engrosamiento y rigidez de los vasos sanguíneos de cualquier tamaño.

**Aterosclerosis:** Enfermedad sistémica caracterizada por la formación y acúmulo de placas ricas en lípidos dentro de las paredes de los vasos sanguíneos, principalmente en arterias grandes.

**Enfermedad Cardiovascular:** Término que describe cualquier enfermedad relacionada con el sistema cardiovascular, es la principal complicación de la aterosclerosis, sus manifestaciones pueden ser coronarias, cerebrovasculares o periféricas.

**Enfermedad Coronaria:** Tipo más común de enfermedad cardíaca, principal causa de muerte entre hombres y mujeres. Es una condición en la cual las principales arterias contienen placas ateroscleróticas.

**Estenosis:** Constricción o estrechamiento de un vaso sanguíneo, comúnmente dado por el desarrollo de una placa aterosclerótica.

**Leucocito:** También llamados glóbulos blancos, son un conjunto de células sanguíneas de origen linfático efectoras celulares de la respuesta inmunitaria.

**Linfocito:** Son un tipo de glóbulo blanco, representan alrededor de un 30% de la celularidad sanguínea, son células agranulocitas.

**Macrófago:** Célula de la estirpe blanca que se encuentra en tejidos procedente de la migración de un leucocito llamado monocito, célula especializada en la internalización y eliminación de material infeccioso o de deshecho.

**Neutrófilo:** Célula de la estirpe blanca más abundante en circulación, son los primeros en migrar hacia una lesión o proceso inflamatorio.

**Placa:** Lesiones dentro de la pared de las grandes arterias que contienen lípidos, leucocitos y células musculares lisas.

**Placa con núcleo calcificado:** Una placa con un proceso inflamatorio avanzado cuya característica principal es la presencia de un centro con alto contenido en calcio, resultado de la pérdida de función de las células endoteliales.

**Placa de alto riesgo o vulnerable:** Términos sinónimos que describen a una placa con elevado riesgo de ruptura o trombosis.

**Síndrome metabólico:** Condición patológica asociada a la manifestación de dislipidemias, resistencia a la insulina, hipertensión arterial (HTA) y obesidad, sobre todo con acumulación de grasa abdominal excesiva. Por convención se deben cumplir al menos tres de los síntomas mencionados.

**Sistema Renina Angiotensina Aldosterona:** Sistema renal encargado del control de la presión arterial.

**SNP:** Polimorfismo de un solo nucleótido.

## 3. Marco Teórico

### 3.1 Hipertensión Arterial

La hipertensión arterial se define como una presión arterial sistémica (HTA) elevada de forma crónica respecto a los límites establecidos como normales,  $\leq 120/80$ , mostrados en la tabla 1. Es un padecimiento multifactorial caracterizado por un aumento sostenido de la presión arterial sistólica, diastólica o ambas. La elevación de la presión arterial, aunque sea moderada, acorta la esperanza de vida ya que al presentar un aumento de la presión media en un 50% o más por encima de los valores normales, será pronóstico de que la persona no vivirá más de algunos años, a no ser del inicio de un régimen terapéutico inmediato.<sup>1</sup>

El estudio de la HTA es vital debido a la alta frecuencia que presenta, siendo casi un tercio de la población mundial la que padece de esta patología; así como por el hecho de ser una enfermedad incapacitante con un aumento creciente en los índices de mortalidad. La HTA puede ser el resultado de una elevación en el gasto cardíaco, un aumento de las resistencias periféricas, o ambos. En la práctica, la principal anomalía en la mayoría de los casos de hipertensión es una resistencia periférica total aumentada. Algunos de los efectos letales de la HTA se producen principalmente de tres formas:

1. Un exceso de la carga de trabajo sobre el corazón lo que produce insuficiencia cardíaca precoz y cardiopatía coronaria.
2. La hipertensión arterial daña algún vaso sanguíneo mayor del cerebro, con lo que mueren importantes porciones de ese órgano; lo que se denomina infarto cerebral.
3. La hipertensión casi siempre provoca lesiones en los riñones, produciendo muchas zonas de destrucción renal y ocasionando finalmente insuficiencia renal, uremia y muerte.<sup>2</sup>

#### 3.1.1 Diagnóstico

Realizar una toma de la presión arterial es la prueba diagnóstica más sencilla y de uso común en la medicina cardiovascular. Lo preferente es realizar la lectura con un esfigmomanómetro mercurial o, en caso contrario, un esfigmomanómetro aneroide recientemente calibrado.<sup>3</sup>

El diagnóstico de una persona hipertensa es realizado mediante los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) los cuales son: en ausencia de enfermedad cardiovascular renal o diabetes  $\geq 140/90$  mmHg, en caso de presentar enfermedad cardiovascular o diabetes  $>130/80$  mmHg y en caso de tener proteinuria de 1,0g e insuficiencia renal  $>125/75$  mmHg. Se consideran valores diferentes de presión arterial (PA) debido a la importancia de una coexistencia con varios factores de riesgo.

Es importante realizar un diagnóstico correcto de hipertensión, el cual debe hacerse después de mediciones repetidas de la presión arterial durante algunas semanas, al menos en 3 ocasiones. Se debe recordar que la HTA es un padecimiento asintomático, por lo que se debe realizar una medición de presión arterial en sujetos de apariencia sana, en un intento de diagnóstico temprano.<sup>1</sup>

### 3.1.2 Clasificación

De acuerdo a las sociedades europeas de cardiología e hipertensión (ESC y ESH respectivamente), la HTA por cifras se clasifica de acuerdo a los siguientes criterios. La categoría de PA fronteriza es de gran importancia ya que será en esta fase cuando la prevención y un diagnóstico correcto darán un pronóstico bueno al paciente.

**Tabla 1. Clasificación de la Hipertensión**

<b>Categoría</b>	<b>Sistólica mmHg.</b>	<b>Diastólica mmHg.</b>
Optima	< 120	< 80
Presión arterial normal	120 a 129	80 a 84
Presión arterial fronteriza	130 a 139	85 a 89
Hipertensión 1	140 a 159	90 a 99
Hipertensión 2	160 a 179	100 a 109
Hipertensión 3	$\geq 180$	$\geq 110$
Hipertensión sistólica aislada	$\geq 140$	$\leq 90$

*Valores de referencia de presión sanguínea sistólica y diastólica que permiten la clasificación de la HTA.*

En 90% de los casos de HTA la causa es desconocida, a esta forma se le cataloga como hipertensión esencial o primaria. Por otro lado, la HTA secundaria por definición, tiene una causa demostrable.<sup>1</sup>

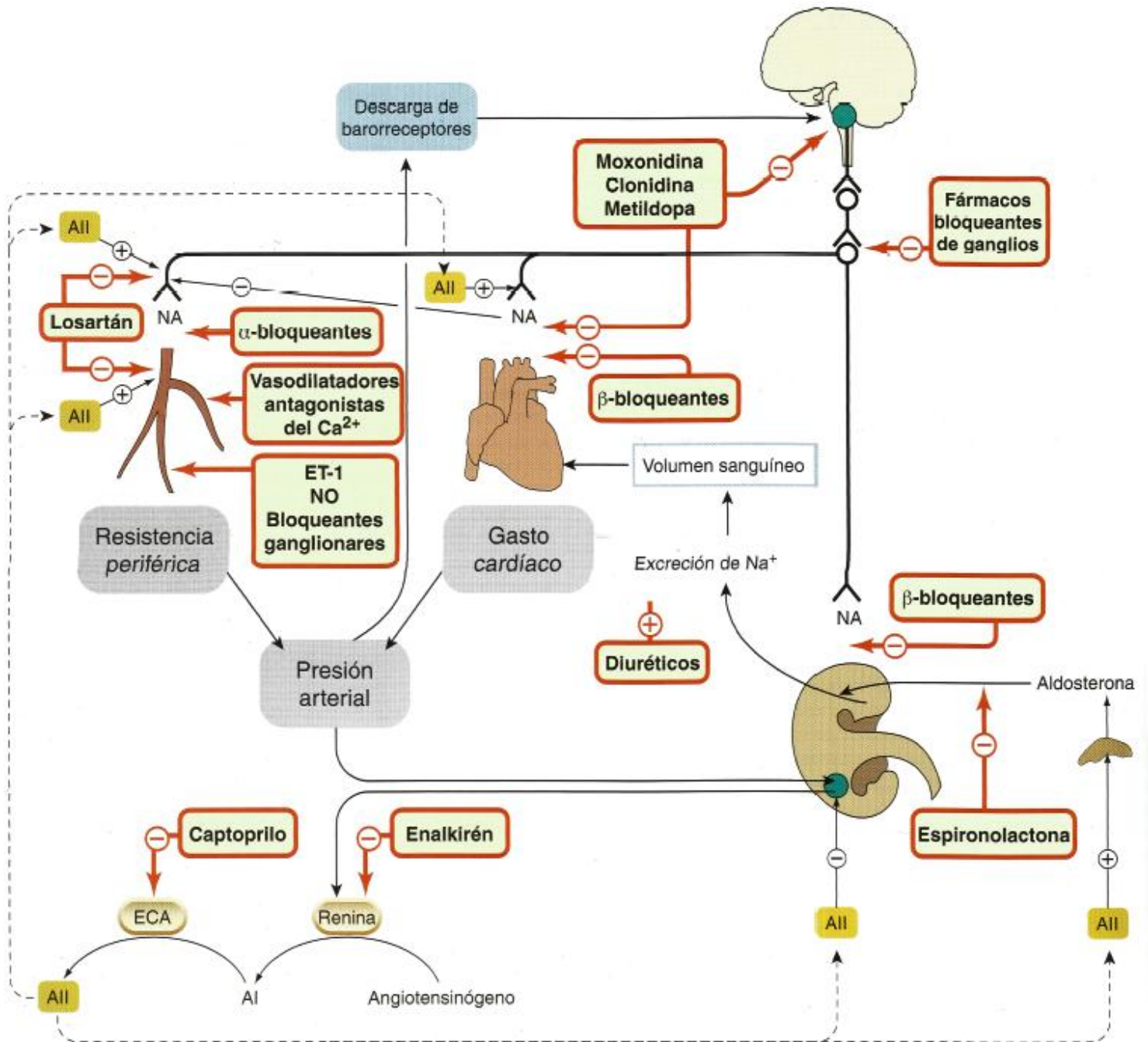
1. **Primaria o esencial:** se presenta en la mayor parte de los casos, no hay una causa identificable, entre otros mecanismos participan la herencia, alteraciones del sistema nervioso simpático, el volumen sanguíneo, el gasto cardiaco, las resistencias arteriolas periféricas, el Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA), la sensibilidad al sodio y a la resistencia a la insulina.
2. **Secundaria:** se puede identificar una causa, entre las cuales se encuentran:
  - 2.1 Renal: glomerulopatías, tubulopatías y enfermedades intersticiales
  - 2.2 Vascular: coartación de la aorta, hipoplasia de la aorta, renovascular, trombosis de la vena renal, arteritis.
  - 2.3 Endocrina: enfermedades de la tiroides o de la paratiroides, aldosteronismo primario, síndrome de Cushing, feocromocitoma.
  - 2.4 Del SNC: tumores, encefalitis, apnea del sueño.
  - 2.5 Físicas: quemaduras.
  - 2.6 Inducida por medicamentos: esteroides suprarrenales, antiinflamatorios no esteroideos, inhibidores de la ciclooxigenasa 2, anfetaminas, simpaticomiméticos, anticonceptivos orales, ciclosporina, eritropoyetina, complementos dietéticos.
  - 2.7 Inducida por tóxicos: cocaína, regaliz, plomo.
  - 2.8 Inducida por embarazo: incluye pre-eclampsia y eclampsia.

### 3.1.3 Tratamiento

El tratamiento de la HTA no solo consiste en medidas farmacológicas, sino también dependerá de un cambio de estilo de vida.<sup>4,5</sup>

La HTA es un trastorno frecuente que si no se controla eficazmente aumenta en gran medida la probabilidad de ECV. Existen pocos casos de HTA que son tratables quirúrgicamente, la mayoría de los casos son HTA esencial, y su tratamiento depende únicamente de acción farmacológica.<sup>6</sup>

**Figura 1. Regulación de la Presión Arterial**



Esquema de los principales mecanismos que intervienen en la regulación de la presión arterial. Las líneas negras representan los principales mecanismos de regulación, los sitios de acción de los antihipertensivos se muestran en recuadros enmarcados con líneas naranjas. AI, angiotensina I; AII, angiotensina II; ECA, enzima convertidora de la angiotensina; ET-1, endotelina-1; NA, noradrenalina; NO, óxido nítrico. (Rang et Dale, 2008).<sup>6</sup>

En el tratamiento de la HTA esencial deben cuidarse tres aspectos: 1) Reducir los niveles de presión arterial. 2) Evitar el daño a órganos de impacto o revertirlo si es posible. 3) Tratar los padecimientos o alteraciones concomitantes.<sup>2</sup>

Los principales sistemas encargados de controlar la PA son el sistema nervioso simpático (SNS), el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) y los autacoides derivados del endotelio tónicamente activo. El incremento de la resistencia vascular periférica pone en marcha varias respuestas fisiológicas en los sistemas mencionados, creando círculos viciosos que son objetivos blanco de la acción farmacológica, que se resumen en la figura 1.

La HTA, el engrosamiento de la pared arterial, en conjunto con otras entidades y/o factores de riesgo pueden desencadenar ECV como una enfermedad inflamatoria crónica.

#### **3.1.4 Factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares**

Se han asociado alrededor de 300 factores de riesgo con la prevalencia de ECV y entre ellos, se han reconocido como los principales desencadenantes del desarrollo y progresión de la aterosclerosis a 6 factores en concreto: tabaquismo, alcoholismo, presión arterial elevada, niveles de colesterol elevados y obesidad.<sup>7, 8, 9</sup>

En términos globales, los factores de riesgo cubren rubros de estilo de vida, características fisiológicas, bioquímicas y de historia familiar.

En muchos casos el único tratamiento necesario para que el paciente presente una mejoría, consiste en realizar un cambio en su estilo de vida. Sin embargo, existen una serie de factores no modificables, como son la predisposición genética para padecer ciertas enfermedades. De esta manera se puede clasificar a los factores de riesgo en modificables y no modificables.

#### ***Factores de riesgo modificables y no modificables***

Aproximadamente el 75% de las ECV pueden ser atribuidas a los siguientes factores, y se dividen en factores de riesgo modificables y no modificables, se muestran en la tabla 2:

#### ***Otros factores de riesgo:***

- Niveles sanguíneos elevados de homocisteína: Factor influyente en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y cerebro vasculares.



- Procesos inflamatorios crónicos: Un proceso inflamatorio crónico conlleva a una alteración de permeabilidad vascular, modificaciones leucocitarias y cambios hemodinámicos.
- Coagulación sanguínea anormal: Niveles elevados de plasminógeno y otros factores de la cascada de coagulación, además de fallas en la modulación del proceso de coagulación se relacionan con el riesgo de complicaciones cardiovasculares.<sup>10</sup>

**Tabla 2. Principales factores de riesgo para ECV<sup>11</sup>**

Factores de riesgo modificables	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alimentación y dieta</li> <li>• Inactividad física</li> <li>• Tabaquismo</li> <li>• Manejo adecuado de: Diabetes Mellitus, HTA y dislipidemias.</li> </ul>
Otros factores modificables	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nivel socioeconómico bajo</li> <li>• Psicológicos</li> <li>• Medicamentos</li> </ul>
Factores de riesgo no modificables	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Historia familiar genética</li> <li>• Sexo</li> <li>• Etnia</li> <li>• Predisposición genética para HTA, Diabetes Mellitus y/o alteraciones de niveles lipídicos.</li> </ul>

La HTA es un padecimiento multifactorial y de herencia multifactorial, y cada vez resulta más compleja la compleja interacción que existe entre todos estos factores, por lo que la presencia de uno o varios, incrementa la incidencia de alguna enfermedad aterosclerótica o vascular.

### 3.1.5 Epidemiología de enfermedad cardiovascular

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son las principales causas de muerte, en países industrializados y es una causa creciente de mortalidad en países en desarrollo; además de ser una causa común de discapacidad, muerte prematura y que ocasiona altos costos para su prevención y control. Las principales formas de ECV son la enfermedad cardíaca coronaria (ECC) e infartos. Además, la OMS prevé que para el año 2020 las enfermedades cardiovasculares serán la principal causa de defunción y discapacidad en todo el mundo, rebasando a la mortalidad ocasionada por enfermedades infecciosas y parasitarias.<sup>12,13</sup>

Hay una variación geográfica mundial muy amplia en la distribución de índices de mortalidad de ECV, debido a que los índices de mortalidad varían respecto a numerosos factores; como el género, origen étnico y clase social; encontrándose generalmente niveles más altos en hombres que en mujeres, y con niveles acrecentados con la edad.<sup>10</sup>

A pesar de que existe una variación mundial muy amplia en la distribución de índices de mortalidad, estas enfermedades afectan por igual a diferentes grupos de población, independientemente de su nivel cultural o socioeconómico. En adición al género, edad, origen étnico y nivel socioeconómico existen otras variables importantes que afectan los niveles de mortalidad como lo son la susceptibilidad genética, el tabaquismo, el consumo excesivo de bebidas alcohólicas y de sodio, el estrés psicosocial, los hábitos de alimentación inadecuados y la falta de actividad física. Es por esto que la prevención y control representan un reto para la salud pública del país, debido a que constituyen un conjunto de enfermedades que resultan de estilos de vida no saludables.<sup>14</sup>

La Organización Panamericana de la Salud estima que durante los próximos diez años ocurrirán aproximadamente 20,7 millones de defunciones por ECV en América (31%), de las cuales un 12% pueden ser atribuidas a la hipertensión arterial (HTA). Actualmente cada año mueren alrededor de 17 millones de personas en el mundo por enfermedad cardiovascular, se estima que cada cuatro segundos ocurre un evento coronario y cada cinco segundos un evento vascular cerebral. Aproximadamente entre 1,5 a 5% de todos los hipertensos mueren cada año por causas directamente relacionadas a HTA. Por su parte, la cardiopatía isquémica afecta a hombres de mediana y avanzada edad; su mortalidad es 20% más alta que en las mujeres, siendo los mayores de 65 años los más afectados.<sup>1,13</sup>

En México según datos del Sistema Nacional de Encuestas de Salud, en el año 2006, la prevalencia nacional en población adulta fue de 21% para obesidad, 27% para hipertensión arterial (figura 2), 30% para Síndrome Metabólico y 35% para hipercolesterolemia.<sup>15</sup>

Respecto a los valores de HTA, muy pocos casos contaban con diagnóstico previo. Lo que resulta alarmante debido a la alta ocurrencia de las enfermedades.<sup>16,17</sup>

**Figura 2. Distribución de la incidencia de HTA por entidad.**

*Los estados del sur presentan un menor porcentaje de HTA en comparación con los estados del centro y del noroeste. (ENSANUT, 2006)*

### 3.2 Aterosclerosis

La aterosclerosis, compleja enfermedad crónica de la pared vascular, es la causa de la mayor parte de episodios patológicos cardiovasculares, entre los que se incluye la ECC y otras complicaciones clínicas de tipo vascular (infarto cerebral, enfermedad vascular periférica, gangrena y pérdida de función de las extremidades)

El término Arterioesclerosis es un término general que alude al engrosamiento y rigidez de los vasos sanguíneos de cualquier tamaño, y que se ven afectados en cualquiera de sus capas. La palabra viene del griego *aterio* que significa arteria y *sclerosis* que significa cicatriz o rigidez.<sup>1</sup>

El término Aterosclerosis se define como una variedad de arterioesclerosis que afecta primordialmente a arterias grandes e intermedias con daño endotelial e inflamación, que se caracteriza por depósito de lípidos y proliferación de tejido fibroso con capacidad de crear obstrucción de la luz del vaso, ya sea por crecimiento de la placa o por ruptura y trombosis. Es la complicación más frecuente de la asociación de diabetes, hipertensión arterial y dislipidemia, con incremento exponencial cuando se asocia al tabaquismo<sup>18</sup>. Las principales diferencias entre ambos padecimientos se muestran en la tabla 3<sup>12,19</sup>

**Tabla 3. Comparación y principales diferencias entre la arterioesclerosis y aterosclerosis.**

Factor	Arterioesclerosis	Aterosclerosis
Células inflamatorias	++++	++++
Infiltración lipídica	++++	++++
Calcificación	++++	+
Proliferación de células de músculo liso (CML)	-	++
Riesgo de muerte cardiovascular	++	++++
Riesgo infarto de miocardio	++	++++
Progresión hasta la obstrucción valvular	++++	-
Mecanismo de complicaciones clínicas	Rigidez de las valvas	Inestabilidad de la placa

*Los signos (+) representan la presencia del factor dentro de la enfermedad.*

Aunque las lesiones ateroscleróticas pueden crecer lo suficiente como para provocar un bloqueo del flujo sanguíneo, la complicación clínica más importante se da debido a la formación de trombos que al liberarse resultan en infarto al miocardio. Las complicaciones de aterosclerosis son la causa más común de muerte. La ruptura de la placa y trombosis son el resultado de complicaciones agudas clínicas de infarto de miocardio y accidente cerebrovascular.<sup>20</sup>

### 3.2.1 Inicio y progresión de las lesiones ateroscleróticas

Las alteraciones del endotelio se consideran como un proceso causal en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas, ya que comprometen la capacidad de las células endoteliales para regular su función y mantener la homeostasis de la pared vascular.

El aumento de estrés oxidativo es considerado un proceso relevante en la patogénesis de la disfunción endotelial y podría ser la vía común del efecto de factores de riesgo sobre el endotelio<sup>4</sup>. El endotelio disfuncional promueve la proliferación de células musculares lisas

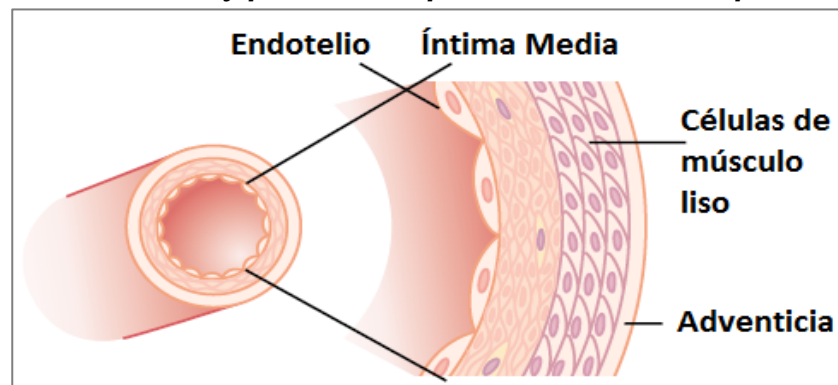
(CML), la deposición o proteólisis de matriz extracelular (ECM), la inflamación y la activación de plaquetas.

Las alteraciones del endotelio se consideran como un proceso causal en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas, ya que comprometen la capacidad de las células endoteliales para regular su función y mantener la homeostasis de la pared vascular.

### 3.2.1.1 El Endotelio

El endotelio es uno de los órganos más grandes de nuestro cuerpo, ocupando una superficie de más de 150 m<sup>2</sup>, es el encargado de regular la fluidez intraluminal de la sangre y la vasorreactividad y permeabilidad de la pared. El endotelio responde de una manera inmediata a los cambios hemodinámicos provocados por la presión de la sangre, por la presión tangencial de la pared arterial y por las fuerzas de cizalladura (*shear rate*) del flujo de la circulación sanguínea.<sup>21</sup>

**Figura 3. Estructura y partes de la pared aortica en una persona sana.**



La pared arterial está organizada en tres capas concéntricas, la íntima, la media y la adventicia. Estas dos últimas están separadas por una malla compacta de elastina. La íntima es la capa interior que está limitada por una monocapa de células endoteliales por el lado laminar y por una capa de fibras elásticas por el lado periférico; está compuesta principalmente por colágeno y proteoglicanos. La capa media está compuesta por células de músculo liso (CML), es la capa de mayor grosor cuya función consiste en mantener el tono muscular y por ello tienen un citoesqueleto rico en miosina y actina. La adventicia es la capa externa conformada por tejido conectivo con fibroblastos, CML y vasos de pequeño calibre, que pueden penetrar la capa media con el propósito de aportar nutrientes y oxígeno a las

capas internas arteriales (Figura 3). En una persona sana este grosor arterial denominado grosor de la capa íntima-media (GIM) es muy delgado (<0.5).<sup>22,23</sup>

Varios estudios prospectivos en individuos asintomáticos de más de 45 años de edad han demostrado de modo concluyente que el GIM carotideo es un factor de riesgo independiente de la incidencia de ECC y accidente vascular cerebral.<sup>24,25</sup>

En un estadio normal el sistema vascular se encuentre recubierto por una monocapa de células endoteliales (CE) que actúa como barrera semipermeable al transporte e intercambio de diferentes solutos, además tiene una función de inhibición plaquetaria por repulsión de cargas y por síntesis de PGI<sub>2</sub> (Prostaciclina) y NO (Óxido nítrico) que inhiben la acción de la trombina; la cual posee actividad mitógena para las CE, que aumentan la permeabilidad vascular y a su vez, la trombina modula la actividad de metaloproteasas que degradan la matriz facilitando la migración celular.

**Tabla 4. Sustancias liberadas por el endotelio**

	Vasoconstrictoras: Angiotensina II, endotelina, tromboxano, serotonina, trombina, etc.
	Activadoras de CML: PDGF, βFGF, endotelina, Ag II
Proterogénicas	Protrombóticas: Tromboxano, trombina, vWF
	Proinflamatorias: VCAM-1, ICAM-1, selectinas
	Vasodilatadoras: PG, histamina, bradicinina, serotonina, sustancia P
Antiaterogénicas	Inhibidores de las CML: NO, PGI <sub>2</sub> , bradicinina, TGF-β
	Antitrombóticas: Trombomodulina, TFPI, tPA, pAI-I
	Antiinflamatorias: NO

*Mediante un equilibrio entre la síntesis y liberación de una serie de agentes pro y antiaterogénicos el endotelio es capaz de proteger la integridad arterial. (adaptado de Badimon et al., 2002)<sup>26</sup>*

*PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas; βFGF, factor de crecimiento de fibroblastos; Ag I βFGF βFGF I, angiotensina II; vWF, Factor de von Willebrand; VCAM, molécula-1 de adhesión vascular; ICAM, molécula -1 de adhesión intercelular; PG, proteoglicano; NO, óxido nítrico; PGI<sub>2</sub>, prostaciclina; TGF- β, factor de crecimiento transformante beta; TFPI, factor inhibidor tisular; tPA, activador del plasminógeno tisular; pAI-1, inhibidor del activador de plasminógeno.*

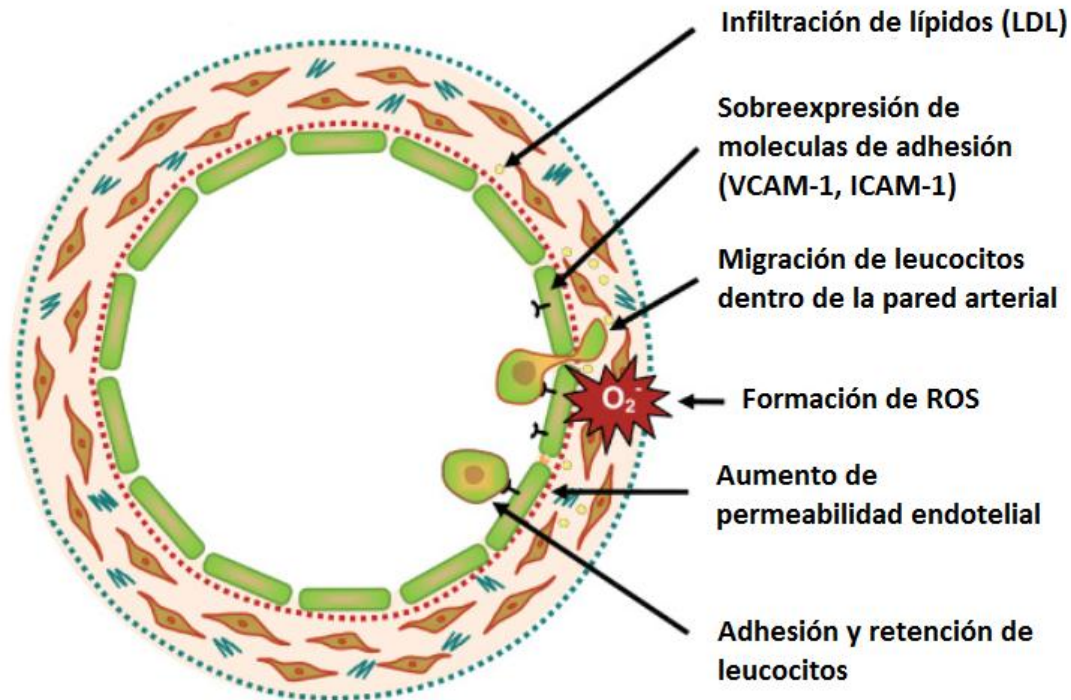
Así mismo el endotelio lleva a cabo distintos procesos homeostáticos que incluyen la regulación de permeabilidad vascular a lipoproteínas plasmáticas, expresión de proteínas de adhesión, reclutamiento de leucocitos, liberación de sustancias con acción pro y pre-trombótica, factores de crecimiento; y regula el tono vascular mediante la producción de moléculas vasodilatadoras como el NO y la PGI<sub>2</sub>, y de sustancias vasoconstrictoras como la endotelina 1 y la Angiotensina II (AglI), como se resume en la tabla 4.<sup>27</sup> El NO que sintetizan las CE provoca una vasodilatación arterial, previene la expresión de proteínas de adhesión como molécula-1 de adhesión intercelular (ICAM-1) y molécula-1 de adhesión vascular (VCAM-1) que además evita la adhesión e infiltración leucocitaria, tiene acción antiproliferativa de CML y regula la expresión de factores de transcripción, como el factor nuclear de transcripción NFκB.<sup>28</sup>

### 3.2.2 Disfunción endotelial

El primer evento de aterogénesis es la lesión vascular endotelial (Figura 4) producida por factores de riesgo ya mencionados. Se le denomina disfunción endotelial a cualquier alteración de la fisiología del endotelio, como el desequilibrio entre la producción y liberación de agentes vasodilatadores y vasoconstrictores.<sup>29, 30, 31</sup>

Los sitios de lesión se determinan debido a diferencias dinámicas en flujo sanguíneo aplicadas sobre las células endoteliales, ya que el continuo desgaste por una presión arterial elevada, turbulencias en flujo sanguíneo, estrés oxidativo y otros factores de riesgo ya mencionados aceleran la disfunción endotelial.<sup>27</sup>

Los factores de riesgo que generalmente provocan la disfunción endotelial son: niveles altos de lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox) y especies reactivas de oxígeno (ROS), variaciones genéticas, concentraciones elevadas de homocisteína, microorganismos infecciosos como el virus del herpes o *Chlamydia pneumoniae*, *shear stress* o procesos inflamatorios crónicos.

**Figura 4. Disfunción endotelial**

*El daño endotelial resulta de la exposición a factores de riesgo y lleva a la presencia de ROS, aumento en expresión de moléculas de adhesión e incremento de la permeabilidad. En consecuencia los leucocitos invaden la pared celular y las LDL se infiltran dentro de la pared. LDL, lipoproteína de baja densidad; VCAM, molécula-1 de adhesión vascular; ICAM, molécula-1 de adhesión intercelular.<sup>11</sup>*

Se ha comprobado que una persona que cursa una dislipidemia tiene un déficit intracelular de L-Arginina causante de una menor producción de NO, del mismo modo un aumento de ROS reduce la biodisponibilidad de NO. La pérdida de producción de NO por las CE es indicador de disfunción endotelial ya que el NO funciona como un factor ateroprotector regulando muchos aspectos de la homeostasis vascular, incluyendo la presión y flujo sanguíneo, la contracción muscular, inflamación, activación de plaquetas, por lo que es conocido como un factor ateroprotector.<sup>27</sup>

Además de intervenir en la disfunción endotelial, un exceso de ROS contribuye a la generación de LDL que se han denominado mínimamente modificadas (LDLmm), que representan un grado de oxidación relativamente bajo, son capaces de activar al endotelio y poseen mayor capacidad que las LDL nativas de inducir la adhesión de leucocitos. Varios sistemas enzimáticos, como la mieloperoxidasa y las lipooxigenasas, muy activos en macrófagos, se han implicado en la oxidación de las LDL. La oxidación de las LDL puede



ser potenciada por otros procesos patológicos subyacentes como la diabetes, debido a que las concentraciones elevadas de glucosa promueven la glucosilación y aceleran la oxidación.

Estas LDLmm o LDLox son citotóxicas para las células endoteliales, inhiben la respuesta vasodilatadora por NO, favorecen la agregación plaquetaria y alteran la producción de radicales libres. Igualmente, concentraciones elevadas de LDL nativas inducen una regulación a la baja de eNOS (Óxido nítrico sintasa) alterando la propiedad contráctil del endotelio, afectan propiedades antitrombóticas del endotelio vascular, activan vías de señalización proinflamatorias, aumenta la adhesión por integrinas y selectinas, y liberan compuestos quimiotácticos como el receptor de quimiocinas tipo 2 (CCR2 o CD192), e interleucina 8 (IL-8) que son proinflamatorios.<sup>32</sup>

### **3.2.3 Inicio de lesión - Formación de la estría grasa**

Como ya se mencionó anteriormente, el inicio de la enfermedad tiene preferencia por las zonas donde hay cambios en la velocidad y turbulencia sanguínea, generalmente en las curvaturas y bifurcaciones de los vasos donde se dan estas diferencias mecánicas provocando así una disfunción endotelial. Uno de los episodios más tempranos en la formación de lesiones ateroscleróticas es la adhesión de monocitos circulantes al endotelio y su migración a la íntima.

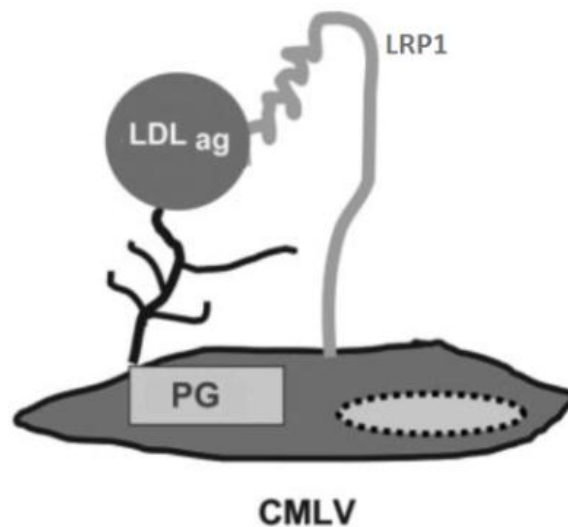
Aunque las plaquetas tienen una función más significativa en procesos más tardíos de la formación de la placa, estas se adhieren al endotelio disfuncional exponiendo en su superficie múltiples factores inflamatorios, proteasas y sustancias vasoactivas, que promueven disfunción endotelial e inflamación<sup>33</sup>. Esto conduce al reclutamiento de más neutrófilos y monocitos al área.<sup>34</sup>

En un estadio de desbalance lipídico hay un aumento de receptores tipo Toll (TLR) y un incremento de la expresión génica de moléculas de adhesión. Al mismo tiempo un estado de hiperlipidemia desencadena una neutrofilia por estimulación de granulopoyesis, que implica elevados niveles de células plasmáticas (macrófagos, neutrófilos y CE) expresando quimiocinas atrayentes de células blancas como la familia de receptores de quimiocinas CXC: CXCL1, CCL2, CX3CL1, entre muchas otras.<sup>35,36</sup>

De esta manera se da el inicio de migración de células inflamatorias y de lípidos, principalmente LDL, que atraviesan el endotelio y son retenidos por proteoglicanos (PGs) debido a la interacción electrostática de la carga negativa de los PGs y la positiva de la apo B (Figura 5).<sup>28</sup> Las LDL acumuladas en el espacio subendotelial se modifican por procesos de oxidación, lipólisis y/o agregación.<sup>37</sup>

Ciertos factores de riesgo, como la HTA o la hiperlipidemia, favorecen la penetración y la retención de LDL en la íntima por (PG) y glucosaminoglicanos, lo que favorece la retención de las LDL en la íntima y contribuye al ataque de diversas enzimas que modifican y oxidan a las LDL y aumentan su aterogenicidad.<sup>21,27</sup>

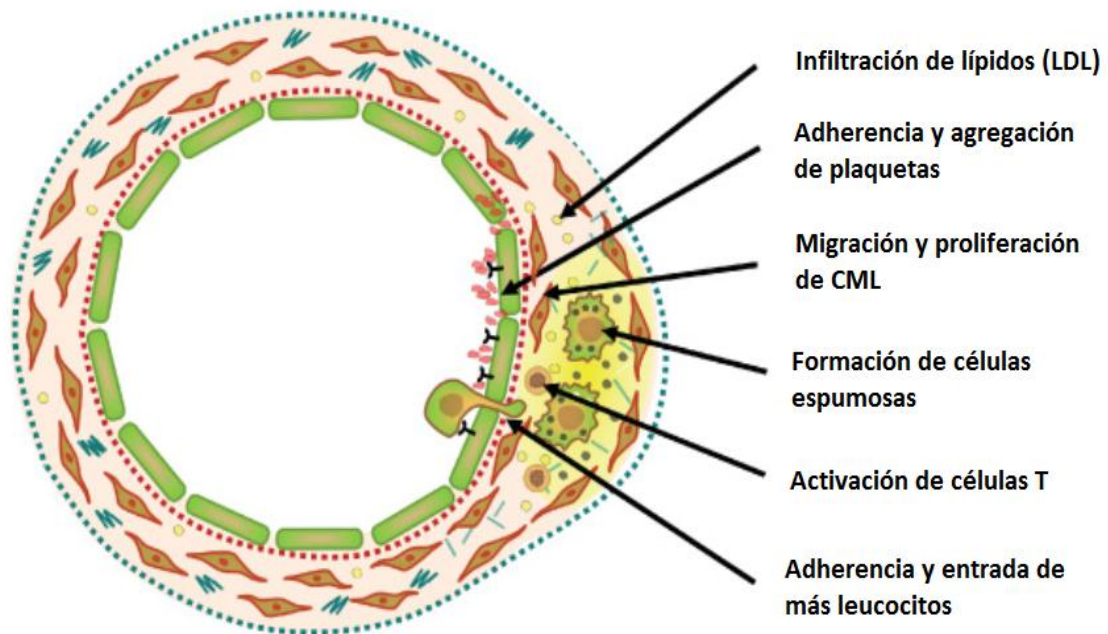
**Figura 5. Interacción entre PGs y el LRP1**



*Mecanismo de la internalización de LDLag por CMLV a la región subendotelial, por medio de la interacción entre PGs y el LRP1.*<sup>38</sup>

*LDLag, Lipoproteína de baja densidad agregada; LRP1, proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad; PG, proteoglicano; CMLV, célula musculo liso vascular*

Las LDLox ya completamente modificadas y otros factores proinflamatorios ( $\text{INF-}\gamma$ .,  $\text{TNF-}\alpha$ ) liberados por los linfocitos T, CE y CML, activan la transcripción de los genes responsables de la síntesis de factores quimiotácticos para monocitos y CML, como MCP-1 y M-CSF mediante la inducción del factor  $\text{NF}\kappa\text{B}$ . Este factor también aumenta la síntesis y liberación de interleucinas 1, 2 y 6 (IL-1, IL-2 e IL-6) perpetuando el proceso de acumulación celular en el espacio subendotelial.<sup>11</sup> (Figura 6)

**Figura 6. Formación de la estría grasa**

*Las plaquetas se agregan a la capa endotelial dañada y degranulan. Una vez dentro de la pared arterial las LDL empiezan a modificarse y es endocitada por macrófagos, los cuales posteriormente se transforman a células espumosas.*

Los leucocitos atraviesan el endotelio por diapédesis y una vez dentro de la íntima los leucocitos maduran; los monocitos maduran a macrófagos y los linfocitos T maduran y liberan ciertas citocinas quimioatrayentes, como el ligando CCL2 también conocido como MCP-1 que estabiliza el gradientes de quimiocinas para la migración y retención de macrófagos y así amplificar la respuesta inflamatoria.<sup>34</sup>

Las LDLag y LDLox son captadas ávidamente por macrófagos y por distintos receptores mediante endocitosis. Estos receptores pueden ser receptores *Scavenger*, TLRs, el receptor de LDL, la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1) y el receptor VLDL<sup>39</sup>. El LRP1 altamente expresado en las CML de la pared vascular no solo reconoce LDLag y LDLox para transportarlas al espacio subendotelial, sino también células dañadas o en apoptosis, plaquetas activadas, productos terminales de glicosilación avanzada, cada uno de los cuales, después de unirse a dicho receptor provoca la endocitosis y activación de CML, la cual expresa mayor cantidad de receptores.<sup>40</sup> Puesto que el LRP1 está altamente expresado en CML y en macrófagos; y no es un proceso regulado por las concentraciones intracelulares de colesterol, puede considerarse un

mecanismo de alta capacidad/baja especificidad que permite la captación de gran cantidad de LDLag.<sup>41</sup> Este mecanismo produce una sobreacumulación de colesterol en los macrófagos y CML. Este colesterol libre es citotóxico, por lo que las células lo reesterifican lo almacenan, junto con triglicéridos y fosfolípidos en el interior de vacuolas.<sup>42</sup> Sin embargo, la capacidad de las células de acumular el colesterol es limitada. La formación de centros necróticos en las placas ateroscleróticas se atribuye precisamente a la lisis de células espumosas que han saturado su capacidad de neutralizar el colesterol libre por esta vía.<sup>43</sup>

La perpetuación de este proceso deriva en acúmulos focales de células espumosas que se observan en la superficie de la íntima, incluso en la infancia, y se denominan estrías grasas.<sup>10</sup> A la formación de esta estría grasa se le considera como el comienzo de una lesión aterosclerótica.

Las estrías grasas son pequeñas lesiones ligeramente elevadas causadas por la acumulación de macrófagos de células espumosas en la íntima. En condiciones homeostáticas los macrófagos son capaces de eliminar el acúmulo excesivo de lípidos. Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) tienen un papel primordial en este proceso de regresión de lesión, ya que se encargan del transporte reverso de los lípidos desde la pared vascular hasta el hígado, dándole flujo al colesterol acumulado. También se les atribuyen otras funciones protectoras frente a la aterosclerosis, como su efecto antioxidante protector contra la oxidación, reducción de la expresión de moléculas de adhesión, y aumento de la capacidad fibrinolítica endógena.

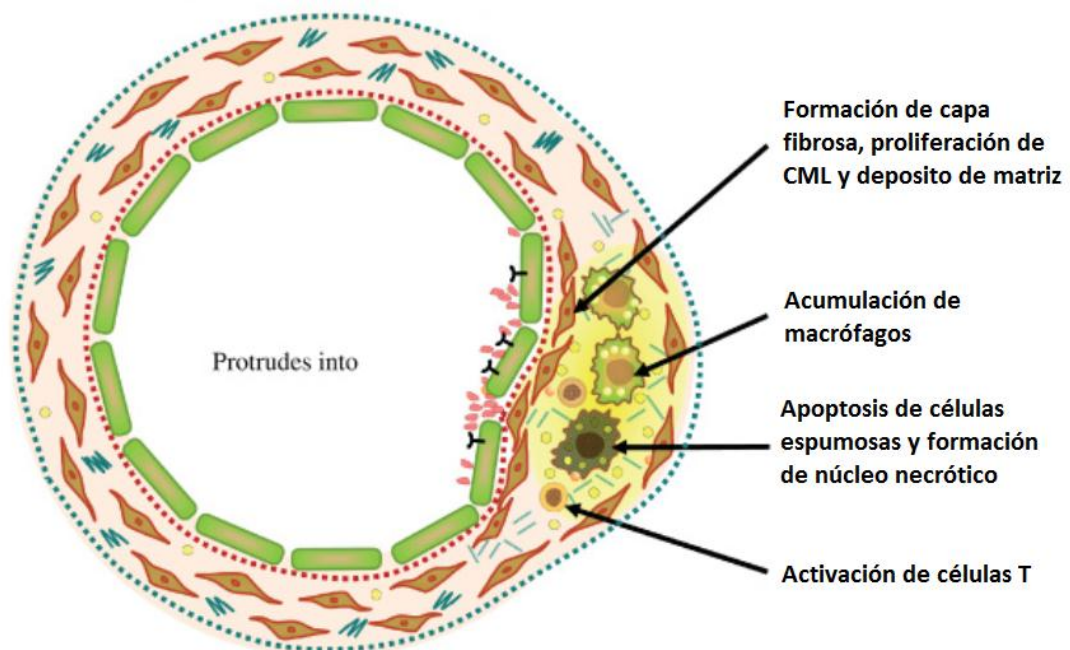
La formación de estría grasa no es clínicamente importante debido a su naturaleza reversible, pero son los precursores de lesiones mucho más avanzadas que se caracterizan principalmente por la acumulación de lípidos.

#### **3.2.4 Inflamación**

La aparición de placas de ateroma representa el estadio intermedio entre la aparición de la estría grasa y la constitución de la placa vulnerable. Mientras la lesión incrementa en tamaño y complejidad, la respuesta inflamatoria y la acumulación de macrófagos y lípidos; además de la proliferación y migración de las CML serán los dos factores condicionantes para la progresión de las lesiones.

Mientras la estría grasa se torna más compleja convirtiéndose en placa aterosclerótica, se desarrolla una capa fibrosa que forma una capa protectora entre la lesión y el lumen. En este proceso las CML migran de la media a la íntima en donde proliferan y establecen una capa de matriz extracelular. Durante este proceso, las CML experimentan un cambio fenotípico, de forma que dejan de ejercer una función principal en la contractibilidad celular manteniendo la tonalidad del vaso, para adquirir fenotipo sintético que les confiere actividad funcional (migración, división, síntesis de proteínas de la matriz extracelular: colágeno, proteoglicanos y elastina, que formarán la capa fibrosa de la placa). La complejidad de estas capas puede aumentar debido a la presencia de calcificaciones y ulceraciones en la superficie luminal; así como hemorragias de pequeños vasos sanguíneos dentro de la lesión arterial. Las placas ateroscleróticas estables se caracterizan por un núcleo lipídico necrótico recubierto por una gruesa capa fibrosa rica en CML. Las lesiones se expanden por los laterales mediante la continua adhesión de leucocitos.<sup>11, 29</sup>

**Figura 7. Placa estable**



*La liberación de citocinas y factores de crecimiento conllevan al reclutamiento de células inflamatorias, activación de células T y migración y proliferación de CML. La migración y proliferación de estas células conlleva a la formación de la capa fibrosa. La apoptosis de las células espumosas provoca la formación del núcleo necrótico y en adición, la acumulación de otros macrófagos y células activadas continua.*

La capa fibrosa es estimulada por factores de crecimiento y citocinas, incluyendo el PDGF, FGF-2 y el TGF- $\beta$  liberado de la degranulación plaquetaria, células endoteliales, macrófagos, células espumosas y CMLV. Además, la degradación de la matriz extracelular y el contacto célula-célula mediado por proteasas, incluyendo MMPs, permite la migración de CMLV de la media a la íntima.<sup>44</sup> (Figura 7)

El estado inflamatorio de la lesión sumado a la cantidad de lípidos provoca la muerte de las células espumosas, esto lleva la formación de un gran núcleo necrótico característico de una lesión avanzada. La muerte de las células espumosas saturadas de lípidos liberan al intersticio su contenido en LDLox, radicales libres y otros materiales altamente tóxicos para el endotelio, además de componentes intracelulares que funcionan como alarminas. Las LDLox y principalmente el PDGF activan las CML de la capa media que secretan IL-1, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$  estimulando la síntesis de PDGF y EGF.<sup>45</sup> Además los macrófagos que liberan su contenido intracelular, y los linfocitos T ya activados; aumentan su capacidad de oxidación de lipoproteínas y la secreción de factores de crecimiento y citocinas inflamatorias tales como: MCP-1, M-CSF, IL-1, TNF, IFN- $\gamma$ . Estas citocinas estimulan la expresión en las CE y CML de factores de crecimiento ( $\beta$ FGF, PDGF) y muchas otras citocinas originándose un círculo vicioso que prolonga los procesos aterogénicos descritos anteriormente. Al mismo tiempo las células espumosas liberan factores de crecimiento y citocinas, que se encuentran involucrados en la progresión de la lesión, así como en la liberación de metaloproteinasas que estimulan la degradación de la matriz.

El PDGF y otros agentes como la trombina y la Ag II, promueven la proliferación de las CML que degradan la matriz extracelular facilitando a su vez su propia migración.<sup>37</sup> El proceso de inflamación continua a la par del desarrollo de la placa aterosclerótica y media un sin fin de citocinas proinflamatorias, entre las que destacan: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL -1, IL-2, e IL-8. También es importante mencionar que algunas citocinas, como la IL-10 y el TGF- $\beta$  son ateroprotectoras por la inducción de células T reg.<sup>34</sup>

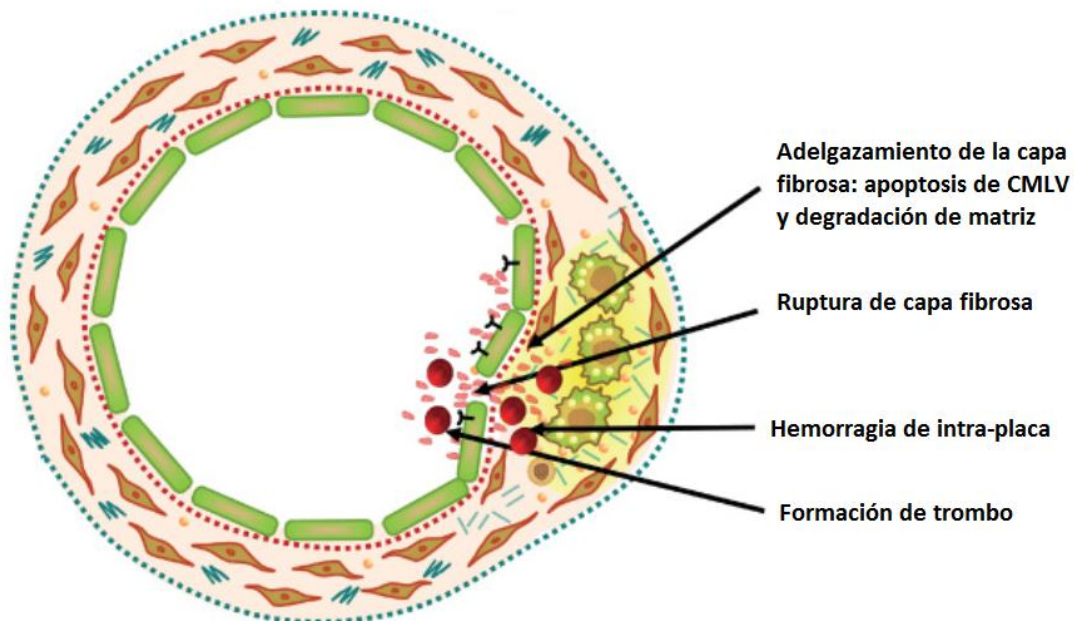
### **3.2.5 Ruptura de placa y formación de trombos**

Después de la formación de la placa, su continua exposición al microambiente inflamatorio crea un círculo vicioso que retroalimenta el crecimiento de la placa con un aumento de la quimiotaxis para monocitos, induciendo mayor acumulación lipídica, necrosis del núcleo y

evolucionando la lesión hacia una aterosclerosis avanzada. El crecimiento de la placa también depende de los continuos episodios de ruptura y sus posteriores reparaciones, ya que estas generan un trombo que al organizarse para reparar la fractura incrementan el volumen total de la placa.<sup>27, 11</sup>

La placa aterosclerótica puede causar complicaciones como consecuencia de su tamaño, reduciendo el diámetro de lumen vascular y el flujo sanguíneo, o por su tendencia a la erosión y/o ruptura<sup>21</sup>, como se observa en la figura 8. La misma formación de la placa puede incluso producir daño en las arterias, resultando en el adelgazamiento y debilidad de la pared arterial y la posible formación de aneurisma y hemorragias, sin embargo cuando hay rompimiento de la placa se expone su contenido a la sangre lo cual provoca la degranulación plaquetaria y la expresión de proteínas de adhesión plaquetaria.

**Figura 8. Placa Inestable**



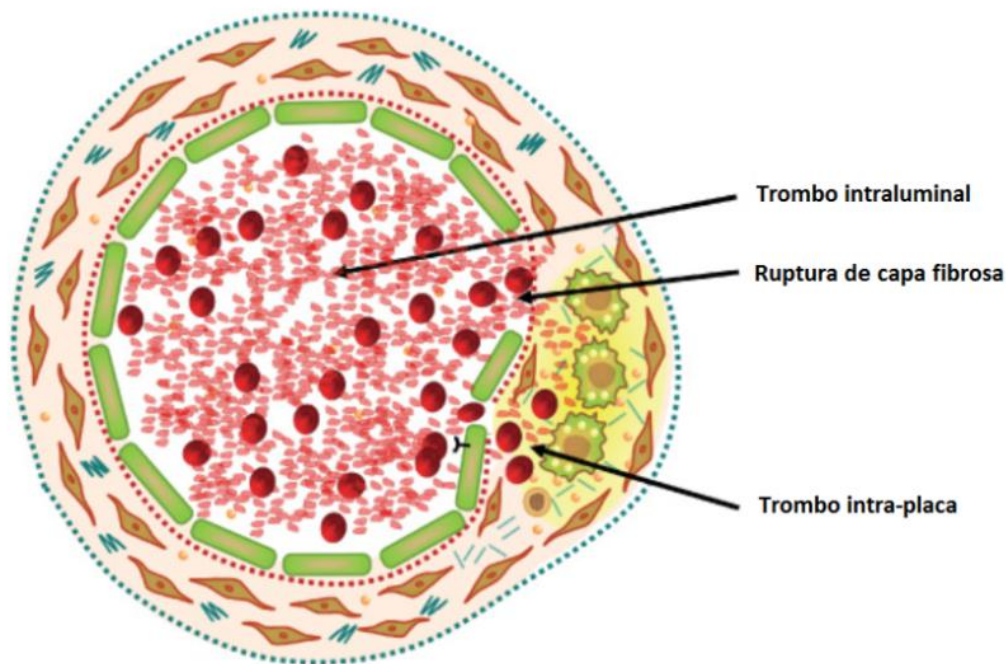
*Hay un adelgazamiento de la capa fibrosa como resultado de la muerte celular y la degradación de matriz extracelular. Ocurre hemorragia intra-plaquetaria. Ambos factores hacen que la placa sea más inestable y propensa a la ruptura.<sup>11</sup>*

La composición de la placa, más que el porcentaje de estenosis que provoca, es el factor crítico que determina el riesgo de rotura y trombogenicidad. Una placa rica en lípidos ( $\geq$ del

40%), una capa fibrosa delgada y un estado proinflamatorio son características de una placa con tendencia a la ruptura.<sup>46,26</sup>

La exposición de matriz extracelular al torrente sanguíneo induce una rápida adhesión, activación y extensión plaquetaria sobre la superficie lesionada y posterior agregación con otras plaquetas para formar un tapón plaquetario o trombo blanco. Finalmente, las plaquetas agregadas reclutan otras células de la sangre (eritrocitos, monocitos, neutrófilos) formando un trombo mixto.<sup>27</sup> (Figura 9)

**Figura 9. Formación de trombo**



*La ruptura de la capa fibrosa y/o la erosión de la superficie luminal promueven la formación del trombo, el cual puede ser oclusivo.*<sup>11</sup>

La ruptura de una placa aterosclerótica en las arterias coronarias, con la consiguiente formación de un trombo, es fundamental para el desarrollo de los síndromes isquémicos, infartos de miocardio etc.<sup>12</sup>



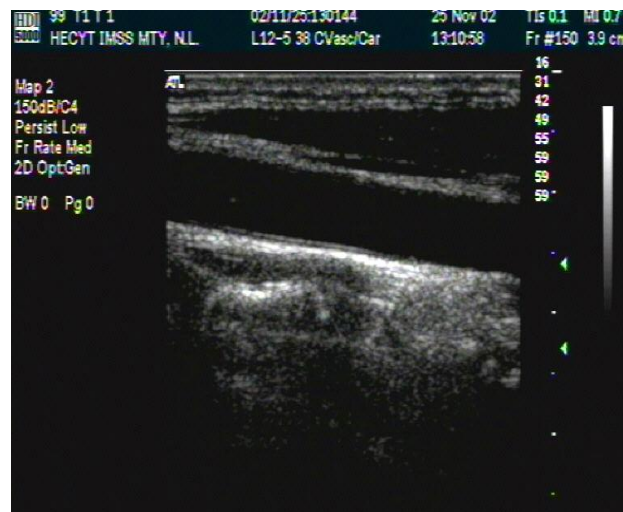
### 3.3 Grosor íntima-media arterial

Las primeras manifestaciones clínicas de enfermedad coronaria, vascular cerebral o arterial periférica frecuentemente aparecen en un estadio avanzado de la patología aterosclerótica. Los cambios en la pared arterial progresan lentamente en un largo período subclínico que se caracteriza por daño endotelial y engrosamiento difuso de la íntima arterial.<sup>25,24</sup>

La determinación del espesor o grosor íntima-media carotídeo (GIM) es un método diagnóstico seguro, no invasivo y de costo accesible, para evaluar la sobrecarga lipídica de la pared arterial. El GIM ha mostrado asociación con los factores de riesgo cardiovasculares y con la prevalencia de enfermedad cardiovascular.<sup>23</sup>

El valor de GIM determina la presencia o desarrollo de placa aterosclerótica y como ya se hizo mención anteriormente, el GIM en una persona sana tiene valores menores  $<0.5$ , mientras que valores entre 0,8 y 1,0 se consideran de engrosamiento; y valores mayores a 0.12 se les denomina ateroma.<sup>47</sup> Un valor elevado es considerado como un factor de riesgo para complicaciones clínica ateroscleróticas. La medición se realiza mediante una ecografía de las arterias carótídeas como se muestra en la figura 10.

**Figura 10. Ecografía arterial**



*Corte longitudinal de la arteria carótida común, donde se visualizan 2 líneas ecogénicas y un espacio ecolúcido.*

## 4. Antecedentes

### 4.1 El LRP1 y su papel en la aterogénesis

Cuando el LRP1 es expresado en CML, hepatocitos y/o macrófagos<sup>48</sup> su unión con apo E provoca un flujo de colesterol así como mayor supervivencia celular.<sup>49, 50</sup> La interacción de apo E con el LRP1 expresado en macrófagos limita la respuesta inflamatoria de las lesiones debido a la prevención de la activación del NF- $\kappa$ B.<sup>38, 51</sup> Además algunos ensayos en ratones con depleción del gen LRP1 (*knock-out* LRP1) demostraron un incremento en la progresión de las lesiones, lo cual sugiere un efecto ateroprotector del LRP1 al inicio de la aterogénesis, ya que esta deficiencia genética provoca una excesiva acumulación y apoptosis de macrófagos en la íntima, disminución de eferocitosis, aumento de necrosis y un aumento de la señalización por CCR2.<sup>34</sup> Por otro lado, la ausencia de la expresión del gen LRP1 resulta en una mayor proliferación de CML, una expresión deficiente de proteínas contráctiles, presencia de hiperplasia en pared aortica y un aumento en el deterioro de la contractilidad vascular.<sup>52, 53, 54</sup>

La modulación de la respuesta inflamatoria por LRP1 juega un papel importante en la aterogénesis, enfermedad neurodegenerativa y potencialmente en la fibrosis de órganos. Esta regulación inflamatoria es por acción en vías de señalización, secreción de citocinas por células inflamatorias y de migración celular, así como su contribución fagocítica.<sup>55</sup>

Como ya se mencionó existen ciertos factores que inducen la expresión del receptor LRP1, como es la disfunción endotelial, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, así como la prolongación del estado inflamatorio y de hipoxia en la lesión.<sup>34,56</sup> Además ciertos factores como la HTA, Diabetes Mellitus o dislipidemias promueven la lesión vascular y la producción endotelial de factores vasoconstrictores aterogénicos; específicamente, Ag II y endotelina-1, que también inducen incremento en la expresión de LRP1.<sup>57</sup>

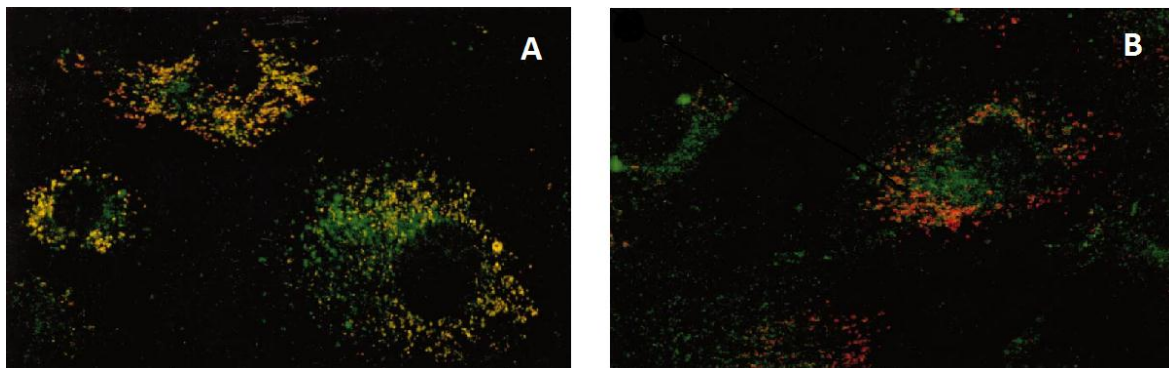
La Ag II es una hormona vasoactiva primaria en el sistema renina-angiotensina que inicia la respuesta celular por activación de los receptores de angiotensina tipo 1 (AT1) y tipo 2 (AT2). Un aumento en valores angiotensina II provoca disfunción endotelial e inducción en la expresión de la molécula de adhesión VCAM-1, favoreciendo la adhesión de monocitos a las células endoteliales y manteniendo un estímulo inflamatorio crónico, con lo que

contribuye a la formación de las lesiones ateroscleróticas. La inhibición de los efectos de la AgII parece afectar no solo a la progresión de la lesión aterosclerótica y la vulnerabilidad de la placa, sino también a los mecanismos desencadenantes del inicio de la enfermedad <sup>57</sup>.

En lesiones aterosclerosas de humanos y animales, el LRP1 está sobreexpresado en placas avanzadas ricas en lípidos. Esta característica además sumada a la presencia de dislipidemia y otros factores antes mencionados, hacen que el papel desempeñado del LRP1 sea aterogénico, debido a la sobreacumulación lipídica dentro de la íntima provocada por la falta de regulación de este proceso.

Este exceso de internalización de LDLag por LRP1 contribuye a: 1) La transformación protrombótica de la formación de CML por incremento del factor tisular (FT) 2) Migración y cambio de tipo por remodelación de CML. En la figura 11 se puede observar la preferencia de internalización de LDLag sobre LDLn. <sup>58</sup>

**Figura 11. Colonización de LRP1 sobre CML.**



En esta fotografía de microscopía confocal se puede observar la colonización de LRP1 sobre CML en color verde. A) se observa una mayor población de LDLag (rojo) unidas a LRP1 que resultan en una coloración amarilla. B) En contraste se observan LDLn en rojo que no colocalizan a LRP1. <sup>59</sup>

## 4.2 LRP1

El LRP1 por sus siglas en inglés “*Low density lipoprotein receptor-related protein*” codifica para un receptor de membrana endocítico, multifuncional, de 600 KDa que pertenece a la familia de los receptores de LDL, esta expresado en CMLV y participa en múltiples procesos celulares, incluyendo señalización intracelular, homeostasis de lípidos y aclaramiento de células apoptóticas, además, la proteína codificada es necesaria para el aclaramiento de

alfa-2 macroglobulina ( $\alpha_2M$ ) mediada de la proteína precursora secretada y beta-amiloide, principal componente de placas amiloides encontradas en pacientes con Alzheimer. La expresión de este gen se ve disminuida con la edad y en pacientes con Alzheimer.<sup>60</sup>

**Tabla 5. Ligandos más importantes de LRP1**

<b>Proteínas relacionadas al metabolismo de lípidos</b>	
Apo E (quilomicrones y remanentes de VLDL)	Lipoproteína lipasa
$\beta$ -VLDL	Lipasa Hepática
Proteína activadora de esfingolípidos (SAP)	
<b>Proteasas y complejos inhibidor/proteasa</b>	
$\alpha_2M$ y complejo proteasa $\alpha_2M$	Pro-uPA, uPA
Complejo proteína-proteasa de zona de embarazo	tPA
Aprotinina	Complejo Trombina/PAI-1
Complejo uPA/PAI-1	Trombina/Cofactor Heparina II
Complejo tPA/PAI-1	Neuroserpina
Trombina/Antitrombina III	Elastasa/ $\alpha_1$ -anti-tripsina
Trombina/Proteasa nexin-1	Proteasas/Inhibidor Proteína C
Inhibidor C1s/C1q	TFPI
MMP-9, 2 y 13	fVIII/fVIIIa
Complejo TSP-2/MMP-2	fXIa/proteasa nexina -1
Factor VIIa/TFPI	Precursor $\beta$ -amiloide
Factor IXa	Cofactor de heparina II
<b>Proteínas de matriz</b>	
Trombospondina-1	Trombospondina-2
Fibronectina	
<b>Proteínas intracelulares</b>	
RAP	Proteína Tat-VIH
Calreticulina	
<b>Factores de Crecimiento</b>	
PDGF	Midcina
Factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF/CCN2)	Factor de crecimiento transformante- $\beta$
<b>Otros</b>	
Proteína de circumsporozoite	Gentamicina
Lactoferrina	Polimicina
Ricina A	<i>Pseudomonas</i> exotoxina A
Saposina	C3 de Complemento
Rhinovirus	Collectinas (Vía calreticulina)
A $\beta$ péptido	

*$\alpha_2M$ , alfa-2-macroglobulina; uPA, activador del plasminógeno; tPA, activador de plasminógeno tisular; PAI-1, inhibidor del activador del plasminógeno tisular-1; TSP, trombospondina; MMP, metaloproteinasas de matriz; RAP, receptor de proteína asociada.*<sup>51, 61, 62, 63</sup>

## Ligandos y otras funciones

El receptor LRP1 interacciona con al menos 30 ligandos diferentes que representan varios grupos de familias como se observa en la tabla 5. El LRP1 está expresado en múltiples tejidos y órganos, tiene función endocítica y de regularización de señales. Está expresado abundantemente en hepatocitos y macrófagos residentes (Células de Kupffer). Aquí el LRP1 reconoce una gran variedad de moléculas en circulación incluyendo complejos de inhibición de proteinasas, factores de coagulación activados y remanentes de quilomicrones; y media su degradación intracelular por endocitosis.<sup>51, 64</sup>

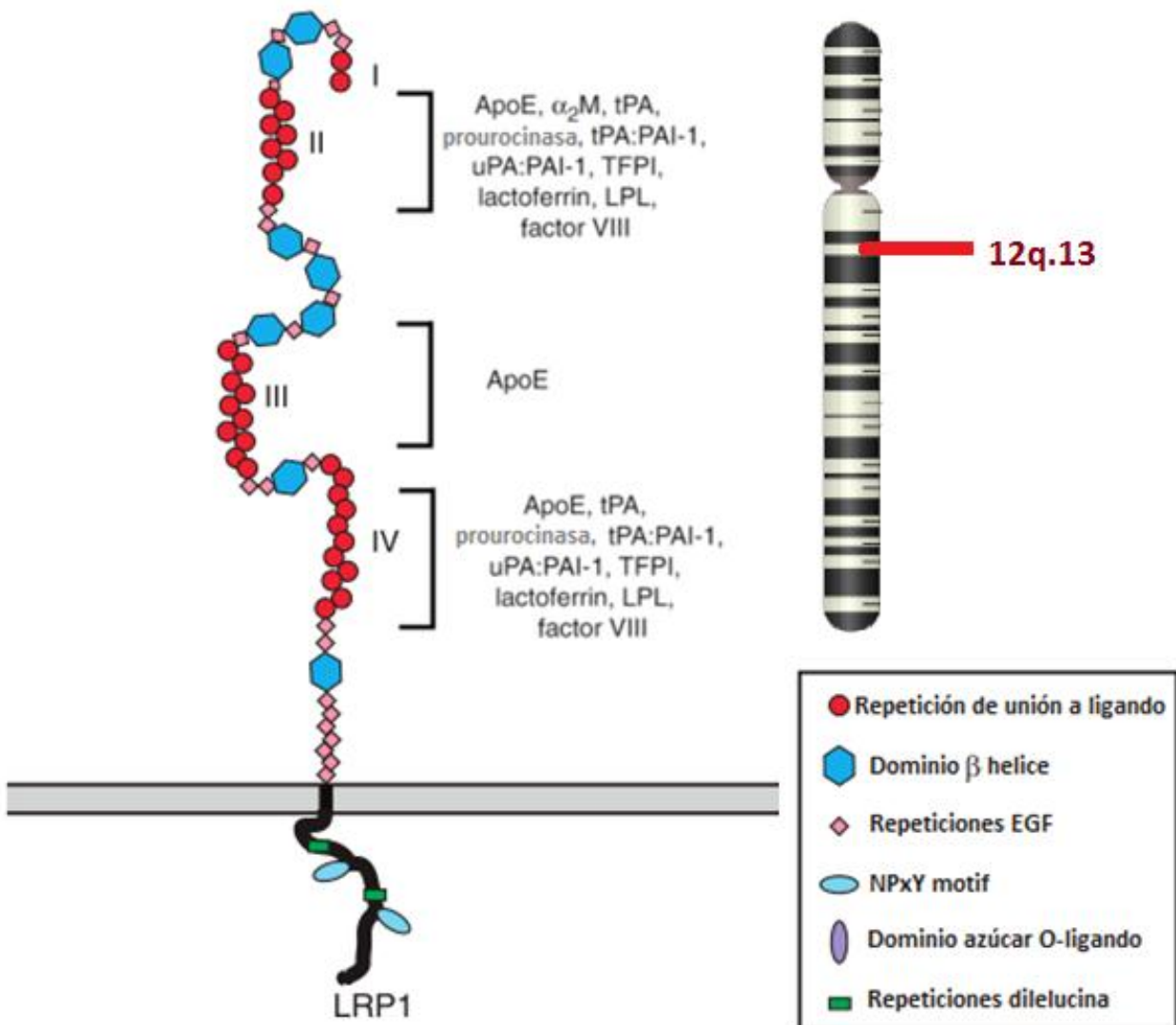
Con el paso del tiempo se han encontrado nuevas funciones de este receptor, un ejemplo se encuentra en pulmones; aquí el LRP1 junto con la calreticulina, regulan la respuesta inflamatoria y activan la respuesta fagocítica alveolar.<sup>48</sup> Este sistema LRP1/Calreticulina está relacionado con el aclaramiento de células apoptóticas, homeostasis de tejidos y en la resolución de procesos inflamatorios.<sup>53</sup> En células vasculares el LRP1 modula la proliferación y migración celular.<sup>65</sup> En células tumorales el LRP1 tiene la capacidad de modular la invasión celular debido a la unión de metaloproteinasa, y la inhibición de la expresión del LRP1 en células hepáticas también promueve la proliferación y migración.<sup>64</sup>

## Localización y estructura

El receptor LRP1 también es conocido como: CD91, receptor tipo V TGF-beta (TGFβR-V), receptor de apo E o receptor de alfa-2-macroglobulina ( $\alpha_2$ MR). Es una glicoproteína transmembranal de superficie celular perteneciente a la familia de genes de los receptores endocíticos de LDL. El LRP1 tiene 5 unidades estructurales en común con los otros miembros de su familia, estos son: a) Repeticiones de unión a ligando tipo cisteína. b) Repeticiones ricas en cisteína tipo receptores de crecimiento epidérmico (EGF). c) Dominios YWTD. d) Al menos un segmento de unión a membrana e) Una cola citoplásmica que alberga entre uno y tres motivos NPxY.

El gen del LRP1 es polimórfico, se localiza en el cromosoma 12 con las coordenadas citogenéticas: 12q13-q14, su posición se encuentra en: 57,522,282 – 57,607,124 (84,861) y se encuentra en orientación positiva, es uno de los receptores humanos más grandes (600 KDa), lo cual estructuralmente hace posible la unión a múltiples ligandos; su cDNA está compuesto por 14896 pb que abarcan 89 exones.<sup>66</sup> (Figura 12)

Figura 12. Localización y estructura del receptor LRP1



$\alpha_2$ M, alfa-2-macroglobulina; uPA, activador del plasminógeno; tPA, activador de plasminógeno tisular; PAI-1, inhibidor del activador del plasminógeno tisular-1; LPL, lipoproteína lipasa; TFPI, inhibidor del factor tisular.<sup>51</sup>

### Polimorfismos

El gen tiene al menos 1949 SNP reportados, varios de ellos han sido estudiados en patologías como Síndrome de Alzheimer<sup>67</sup>, cáncer de seno<sup>68</sup>, regeneración neuronal<sup>53</sup> e incluso alergias alimentarias.<sup>69</sup> Sin embargo, pocos estudios se han realizado respecto a la relación con aterosclerosis.<sup>52, 70, 71</sup>

Otros estudios previos han estudiado la asociación de SNP del gen LRP1 con ECV en poblaciones caucásicas<sup>72, 73, 74, 75</sup> sin embargo, estos estudios han presentado resultados

contradictorios entre sí. Estos y otros trabajos publicados sobre la implicación de los SNP del LRP1 en enfermedades complejas se resumen en el trabajo de Gläser et al.<sup>76</sup> Recientemente<sup>35</sup>, en un amplio estudio de SNP de genes relacionados en la eficacia de las estatinas en la disminución del colesterol, hallaron que un SNP del intrón 2 (rs715948) se asociaba con una disminución de infarto de miocardio, sin embargo estos resultados publicados son contradictorios con respecto a otros<sup>77</sup>. Poco se ha hecho para determinar la influencia de los SNP de este gen con la incidencia de la ECV<sup>78</sup> y no hay estudio alguno en población mexicana.

De acuerdo al número del alelo menos frecuente (MAF) para distinguir SNP y su asociación con enfermedades similares a la HTA se seleccionaron los SNP enlistados en la tabla 6. Tres SNP se encuentran en zona intrónica: rs11172113 entre los exones 1 y 2, rs1466535 entre los exones 2 y 3, y rs1800164 entre los exones 83 y 84; y dos SNP son sinónimos, rs1800194 y rs1140648 de los exones 22 y 62 respectivamente.

**Tabla 6. SNP seleccionados**

SNP	Cambio de nucleótido	Resultado	Alelo ancestral	Localización	MAF
rs11172113	C > T	Mutación silenciosa	C	Intrónica 57527283 pb	C:0.390
rs1466535	A > G	Mutación silenciosa	C	Intrónica 57534470 pb	A:0.272
rs1800194	TGC > TGT	Cys > Cys	C	Exón 22 57567762 pb	T:0.406
rs1140648	ACA > ACG	Thr > Thr	G	Exón 62 57593101 pb	G:0.458
rs1800164	A > G	Mutación silenciosa	A	Intrónica 57604802 pb	G:0.494

SNP, Polimorfismo de un solo nucleótido; C, Citosina; T, Timina; A, Adenina; G, Guanina; Cys, Cisteina; Thr, Treonina; pb, pares de bases; MAF, alelo menos frecuente

## 5. Justificación

Los accidentes cardiovasculares (ECV) son causa de casi 40% de todas las defunciones en los países más desarrollados. Además, la Organización Mundial de la Salud prevé que para el año 2020 las enfermedades cardiovasculares serán la principal causa de defunción y discapacidad en todo el mundo.

La Hipertensión Arterial (HTA) es un factor de riesgo para el desarrollo de EAC; su prevalencia en la población mundial es muy alta y se sabe que la mayoría de los afectados desconoce su enfermedad. Además, de los pacientes que se conocen hipertensos, solo el 19.2% se encuentran controlados. Por otro lado, la hipertensión en nuestra población afecta no solo al adulto mayor, sino también a la población de menor edad, como lo reporta una reciente encuesta nacional, donde el 75% de los pacientes hipertensos son menores de 54 años.

Los factores de riesgo cardiovascular tales como HTA, dislipidemias, tabaquismo, diabetes mellitus, infecciones, hiperhomocisteinemia entre otros; provocan respuestas anormales del endotelio. Consecuentemente, la proliferación de células de músculo liso (CML), la vasoconstricción, la actividad trombótica y la adhesión de las células sanguíneas son fenómenos predominantes para el desarrollo de la enfermedad.

A partir del momento en que el endotelio presenta alteraciones en su funcionalidad, se produce la entrada de monocitos, lípidos plasmáticos y proteínas dentro de la pared arterial, así como la activación de fenómenos inflamatorios que dan lugar a la formación de la estría grasa, primer paso de la formación de la placa aterosclerótica, en donde el receptor LRP1 tiene un importante papel ya que además de estar altamente expresado en CML se encuentra íntimamente relacionado en el inicio y desarrollo de la placa de ateroma.

El gen del LRP1 humano es polimórfico, se localiza en el cromosoma 12, está compuesto de 90 kb y comprende 89 exones. Sin embargo, poco se ha hecho para determinar la influencia de los SNP con la incidencia de la EAC solo se han estudiado algunos SNP relacionados con la enfermedad de Alzheimer. El LRP1 une distintos ligandos que incluyen lactoferrina, trombospondina, distintas lipoproteínas plasmáticas tales como VLDL, complejos de lipoproteínas ricas en triglicéridos y lípidos; y por esta razón se han realizado



diferentes estudios clínicos de sus variantes genómicas y su papel en el desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis o la enfermedad de Alzheimer

Por lo anterior, el estudio de las variantes genéticas del LRP1 y su relación con la hipertensión arterial como factor pro-aterogénico servirá para determinar la importancia que tiene este receptor con la ECV en población mexicana.

## **6. Hipótesis**

Si el receptor LRP1 modula la respuesta inflamatoria asociada con el GIM, dislipidemias e HTA; entonces se espera encontrar diferencias en estos parámetros clínicos, así como en las frecuencias alélicas y genotípicas del receptor LRP1 en pacientes con HTA con respecto a sujetos sin HTA.

## **7. Objetivos**

### **7.1 Objetivo general:**

Determinar si los polimorfismos del gen LRP1 participan en la modulación del riesgo primario de HTA.

### **7.2 Objetivos específicos:**

1. Determinar si los SNP del gen LRP1 se relacionan con el engrosamiento de la pared arterial, como factores de riesgo en aterosclerosis.
2. Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los SNP estudiados para el LRP1 en individuos con diagnóstico de HTA y en individuos no hipertensos.
3. Realizar el mapa de haplotipos correspondiente a los SNP seleccionados.
4. Determinar la asociación de SNP del gen LRP1 con las características clínicas en ambos grupos de estudio
5. Comparar las frecuencias alélicas y genotípicas de la población mexicana nuestra con otras poblaciones del mundo.

## 8. Diseño Experimental

### 8.1 Población de estudio

El estudio se llevó a cabo con 115 individuos adultos, 59 de ellos fueron pacientes de la consulta externa del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (INC) con diagnóstico de HTA; y 56 individuos normotensos como grupo control. En todos los casos los sujetos con HTA fueron valorados previamente por estudios e historial clínico. El grupo control fue conformado en su mayoría por el personal administrativo del INC, así como por compañeros de los investigadores. Se excluyeron a todos los sujetos que tenían alguna relación familiar. La selección de ambas poblaciones se encuentra pareada por edad y sexo. Se consideró como sujetos de nacionalidad mexicana a aquellos con al menos 2 generaciones anteriores de origen mexicano.

Los criterios de inclusión y exclusión para ambos grupos fueron los siguientes:

- Grupo de pacientes con HTA: Niveles de presión arterial (>140/90 mmHg), no estar bajo tratamiento de medicamentos hipolipemiantes, no padecer ninguna enfermedad crónico-degenerativa, ser mexicano de nacimiento, estar informados y de acuerdo con el tipo de estudio a realizar con firma de carta de consentimiento.
- Grupo de control (normotensos): Niveles de presión arterial  $\leq$  80/120 mmHg, sin diagnóstico de EAC, sin antecedentes clínicos de enfermedad cardiovascular confirmado por especialistas del INC, sin diagnóstico de diabetes tipo 1 ni 2, no padecer ninguna enfermedad crónico-degenerativa, ser mexicano de nacimiento, estar informados y de acuerdo sobre el estudio a realizar con firma de carta de consentimiento.

#### Tamaño de la muestra

Para el cálculo de casos y controles se tomó en cuenta el método de Rosner. Se desconoce la posibilidad de que la expresión de LRP1 sea al menos 2.5 veces más que la observada en la población general.

### Cálculo del tamaño de la muestra

Para cálculo de proporciones en muestras independientes, con un poder estadístico 90%  $P > 0.05$ .

$$pqoq \left[ \frac{Z_{\alpha} + Z_{\beta} \sqrt{\frac{p_i q_i}{pqoq}}}{(p_i - p_o)_2} \right]^2$$

Se calcula a partir de una incidencia aproximada de 0.08 en los casos y en los controles de 0.02  $\Delta = 0.06$

$$(.08)(.92) \left[ \frac{1.96 + 1.28 \sqrt{\frac{p(.02)(.98)}{(.08)(.92)}}}{((.08) - (.02))_2} \right]^2$$

Sujetos = 59

## 8.2 Toma de muestra

Se obtuvo una muestra de sangre venosa de todos los sujetos después de 12 h de ayuno y se colectó en tubos con ácido etilendiaminotetracético (EDTA) (1 mg/mL). De 2 tubos recolectados inmediatamente se separó el plasma por centrifugación a 3500 r.p.m. durante 5 minutos. Se separó 2 mL del plasma fresco para la determinación de los niveles de Ag II y perfil lipídico. Los glóbulos blancos se aislaron para la posterior extracción de DNA.

## 8.3 Extracción de DNA

La extracción se realizó mediante el equipo comercial para extracción de DNA de sangre completa *Wizard Genomic DNA Purification Kit*, (Promega, Wisconsin). Cuya técnica se explica detalladamente en el anexo 1. Finalmente el DNA fue disuelto y rehidratado en TE y ajustado a 10 ng/ $\mu$ L.

## 8.4 Perfil lipídico

El colesterol total y los triglicéridos, se determinaron por métodos enzimáticos colorimétricos comerciales. El C-HDL se midió en el sobrenadante después de haber precipitado las

lipoproteínas que contenían apo-B, por el método de precipitación con fosfotungstato de magnesio. El colesterol LDL se calculó con la fórmula de Friedewald (1972).

## 8.5 Determinación del grosor íntima media arterial

Para valorar la medición del grosor íntima-media carotídeo (GIM) e identificación de placas ateromatosas se realizó una ecografía carotídea a todos los individuos del estudio con el apoyo de la Dra. Nilda Espinola Zavaleta.

La ecografía se realizó con equipos duplex-Doppler y se utilizó el método del grosor íntima-media combinado; el cual resulta de la examinación de 3 segmentos predeterminados de las arterias de ambos lados: carótida primitiva (1 cm proximal al bulbo carotídeo), bifurcación/bulbo (1-2 cm) y carótida interna (1cm distal a la bifurcación). El GIM, definido como la distancia existente entre la interfaz luz carotídea-íntima y la interfaz media-adventicia de la pared distal, se determinó en la carótida primitiva prebifurcación explorada en sección longitudinal. Se cuantificó en 4 medidas a intervalos regulares en la pared posterior, 1 cm prebifurcación. Los resultados se expresan como la media de 8 determinaciones, 4 en cada lado (derecho e izquierdo).

Las placas se definieron como engrosamientos focales del GIM con una altura  $\geq 1.2$  mm o superior al 50% del GIM adyacente.<sup>23,24</sup>

## 8.6 Cuantificación de Angiotensina II

Se realizó la determinación y cuantificación de Ag II por electroforesis de zona capilar con detección UV y longitud de onda de 200 nm, en el departamento de Farmacología del INC.<sup>79</sup>

## 8.7 Determinación genotípica del LRP1

El análisis de SNP se llevó a cabo mediante la amplificación por PCR en tiempo Real (*Biorad Real Time PCR CFX-96 System*). Se utilizaron 5  $\mu$ L de una mezcla Taqman 2X universal PCR master mix en un volumen de reacción de 25 $\mu$ L a una concentración final de

50  $\mu$ g de DNA, 700  $\mu$ M de iniciadores y 100  $\mu$ M de sonda marcada con un fluorocromo (FAM - VIC). Se amplificaron los 5 SNP utilizando las sondas que se enlistan a continuación:

Las condiciones de reacción fueron:

- 1 ciclo de 10 min a 95°C
- 45 ciclos a 96°C por 15 segundos
- 1 ciclo de 1 minuto a 60°C

SNP	Fluorocromo	Sondas
rs1172113	VIC	TGTCTGAGCCTCAGGAAAGAGCCAC <u>C</u> GGGCAACACCCAAAATACAAAAAT
	FAM	TGTCTGAGCCTCAGGAAAGAGCCAC <u>T</u> GGGCAACACCCAAAATACAAAAAT
rs1466535	VIC	GGGAAGCAGGGTCCATGGCAGAGAAA <u>C</u> TCCAATGATAAAGAAAACTCCTTC
	FAM	GGGAAGCAGGGTCCATGGCAGAGAAA <u>T</u> TCCAATGATAAAGAAAACTCCTTC
rs1800194	VIC	ACGGCTCAGATGAGGGCGAGCTCTG <u>C</u> GGTGAGGCCTGGTCCCAGGAGAAGG
	FAM	ACGGCTCAGATGAGGGCGAGCTCTG <u>T</u> GGTGAGGCCTGGTCCCAGGAGAAG-G
rs1140648	VIC	CCATTAACCGAGCCCACAAGACCAC <u>A</u> GGCACCAACAAAACGCTCCTCATC
	FAM	CCATTAACCGAGCCCACAAGACCAC <u>G</u> GGCACCAACAAAACGCTCCTCATC
rs1800164	VIC	GGCCTTATGCAGCTGAGCCAGGCC <u>A</u> AGCTGCTGGCGCTTCCCCACAAAGG
	FAM	GGCCTTATGCAGCTGAGCCAGGCC <u>G</u> AGCTGCTGGCGCTTCCCCACAAAGG

### Discriminación alélica

Los niveles de fluorescencia de los productos amplificados de la PCR fueron cuantificados y analizados usando el software propio del equipo utilizado (*Biorad CFX Manager*). La discriminación alélica se detectó mediante la amplificación de la o las sondas específicas para cada uno de los alelos, indicando así, si son homocigotos o heterocigotos.

## 8.8 Análisis estadístico

Los datos clínicos entre los grupos se compararon mediante la prueba de t de Student para variables continuas, y la prueba no paramétrica (Mann-Whitney) para variables que no seguían una distribución normal. Las frecuencias alélicas fueron determinadas en ambas poblaciones para los 5 SNP, sin embargo, para fines de comparación mundial se usaron las

frecuencias genotípicas de la población control. Ambas poblaciones cumplen con la distribución según la ley de Hardy-Weinberg, prueba realizada mediante  $\chi^2$ .

Se calculó la razón de momios (OR) y sus intervalos de confianza del 95% (IC95%) para cada genotipo comparado con el homocigoto del alelo más frecuente o de referencia, y se estimó la significancia para un umbral de  $p < 0,05$  asumiendo un modelo de herencia general (cinco genotipos por separado), y modelo dominante.

El análisis de las variables y su distribución fue realizado mediante las pruebas de D'Agostino y Pearson, y Krustal–Wallis.

Se estimaron las frecuencias haplotípicas mediante desequilibrio de ligamiento (LD) en bloques definidos por el método de Gabriel, se calcularon los valores de LD y  $r^2$  entre SNP mediante el software para Windows Haploview v.4.2<sup>80</sup> (*Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology and Harvard University, Cambridge, MA, USA*).

Se realizó una regresión logística binaria ajustada por las variables de sexo y perfil de lípidos.

Todas las comparaciones estadísticas fueron realizadas con el software para Windows SPSS versión 19 (SPSS Inc. Chicago USA). Los resultados están expresados como valores medios  $\pm$  desviación estándar.



## 9. Resultados

### 9.1 Características clínicas de la población total y por grupo

Las características clínicas de la población de estudio se muestran en la tabla 7. El estudio se realizó con 115 individuos adultos, el 39.1% de género masculino y el 60.9% de género femenino. La población se encuentra equilibrada con respecto a sexo y edad.

**Tabla 7. Características clínicas de la población total en estudio**

n=115		Valores de referencia
Sexo (M/F)	45/70	
Edad	46.5 ± 10.3	
IMC	28.1 ± 3.7	18.5-24.9
CT (mg/dL)	197.8 ± 36.9	<200 (mg/dL)
TG (mg/dL)	182.1 ± 85.3	<150 (mg/dL)
HDL (mg/dL)	49.4 ± 12.7	>45 (mg/dL)
LDL (mg/dL)	117.3 ± 29.1	<130 (mg/dL)
AgII (pmol/mL)	0.2236 ± 0.12	0.01-0.25 (pmol/mL)
GIM	0.6667 ± 0.27	<0.5

*Análisis descriptivo. Los valores se expresan como media ± DE.*

*M, masculino; F, femenino; IMC, Índice de masa corporal; CT, colesterol total; TG, triglicéridos; HDL, lipoproteína de alta densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; AgII, angiotensina II; GIM, grosor de íntima media.*

Se dividió a la población en dos grupos, controles (CTRL) y pacientes hipertensos (HTA), siguiendo los criterios de la OMS (tabla 1), se consideró a los sujetos hipertensos aquellos que presentaron valores mayores a  $\geq 140$  mmHg. Las características clínicas de cada grupo se muestran a continuación en la tabla 8.

La edad media del grupo CTRL es de 46 años constituida por 20 hombres cuyas edades van desde los 18 hasta los 70 años; y 36 mujeres cuyas edades van desde los 18 hasta los 71 años. La media del grupo HTA es de 47 años, conformado por 20 hombres cuyas edades van desde los 18 años hasta los 70; y por 39 mujeres cuyas edades van desde los 19 hasta los 73 años. El grupo de sujetos HTA presentaron niveles bajos de HDL ( $45.1 \pm 8.7$  vs  $54.0$

$\pm 14.7$ ;  $p=0.000$ ), y elevados de AgII ( $0.2339 \pm 0.1$  vs  $0.2131 \pm 0.14$ ;  $p=0.018$ ); y de GIM ( $0.7154 \pm 0.27$  vs  $0.5445 \pm 0.14$ ;  $p=0.002$ ) con respecto al grupo control.

**Tabla 8. Características clínicas de las poblaciones en estudio divididas por controles y pacientes hipertensos**

Variable	Controles n=56	HTA n=59	Valor de P
n	56	59	
Sexo (M/F)	20/36	20/39	0.840
Edad (años)	$46 \pm 10$	$47 \pm 10$	0.593
IMC	$26.8 \pm 3.7$	$28.9 \pm 3.6$	0.544
CT	$200.6 \pm 37.5$	$195.4 \pm 36.6$	0.948
TG	$218.4 \pm 20.2$	$226.3 \pm 21.2$	0.646
HDL	$54.0 \pm 14.7$	$45.1 \pm 8.7$	0.000*
LDL	$116.8 \pm 28.5$	$117.7 \pm 30.0$	0.881
AgII	$0.2131 \pm 0.14$	$0.2339 \pm 0.1$	0.018*
GIM	$0.5445 \pm 0.14$	$0.7154 \pm 0.27$	0.002*

Los valores se expresan como media  $\pm$  DE. Prueba de *t* de Student para variables independientes en caso de las variables con distribución normal, y prueba de *U* de Mann-Whitney para las variables no paramétricas, \* $P < 0.05$ .

M, masculino; F, femenino; IMC, Índice de masa corporal; CT, colesterol total; TG, triglicéridos; HDL, lipoproteína de alta densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; AgII, angiotensina II; GIM, grosor íntima media.

Para conocer si existía alguna correlación de las variables clínicas de estudio y los pacientes hipertensos, se realizó una prueba de correlación de Spearman, (tabla 9) encontrando una correlación positiva con los valores de: TG (HTA vs TG,  $P=0.050$ ), GIM (HTA vs GIM,  $P=0.015$ ) y HDL (HTA vs HDL,  $P=0.000$ ).

**Tabla 9. Resultados del análisis de correlación de Spearman**

Correlación	TG	GIM	HDL
HTA	0.050	0.015	0.000

Valores de *P* resultantes de la correlación de TG, GIM y HDL con la HTA.  
TG, triglicéridos; GIM, Grosor de la íntima media; HDL, lipoproteína de alta densidad.

## 9.2 Curvas de amplificación y discriminación alélica

Se obtuvieron curvas de amplificación típicas <sup>81</sup> en todos los SNP realizados, y cada muestra fue analizada según sus valores de fluorescencia relativa (RFU, *relative fluorescence units*), número de ciclos (Ct, *cycle time*) y con la semejanza a una curva típica de amplificación. Para cada ensayo se utilizaron 4 controles positivos y 4 controles negativos.

**Figura 13. Curvas de amplificación**

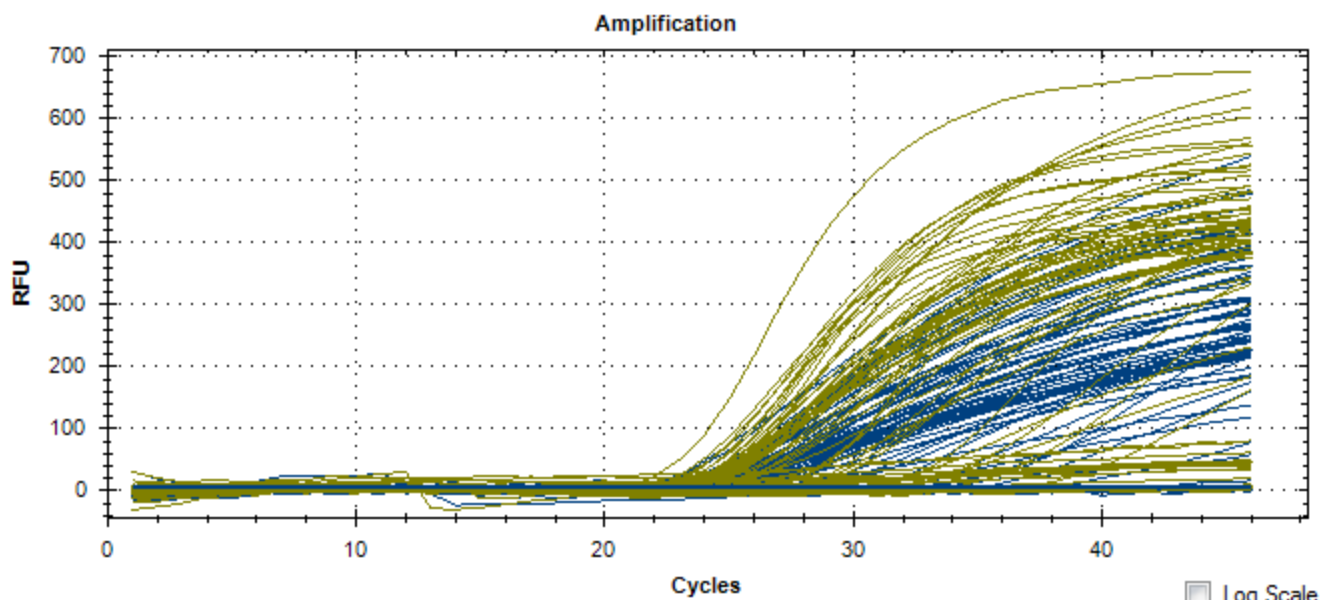
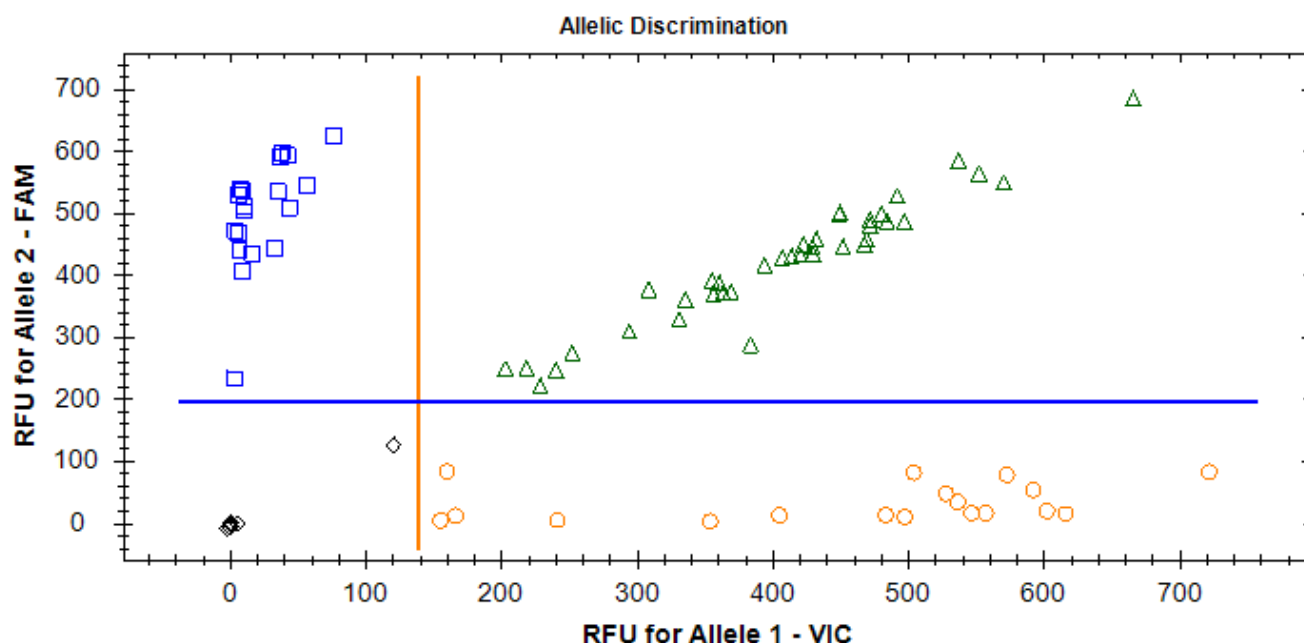


Figura mostrada por el software de análisis del aparato de PCR-tiempo real, se muestran curvas de amplificación típicas empezando por el ciclo 25 aproximadamente y algunas curvas de amplificación tardía alrededor del ciclo 30. En color verde se observa la amplificación con el fluorocromo VIC y en azul con FAM.

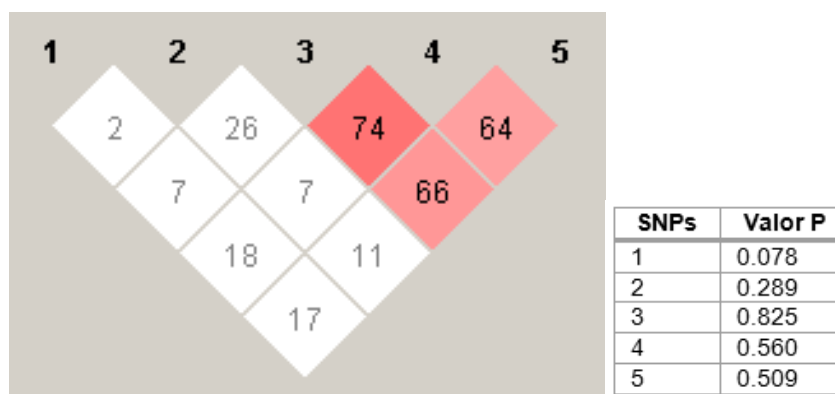
Mediante el uso del apartado designado a discriminación alélica del software y el análisis de curvas de amplificación del ensayo, se asignó un genotipo para todas las muestras de los 5 SNP, como se muestra en la figura 14.<sup>82</sup>

**Figura 14. Plano de discriminación alélica**

En color azul se observan los muestras que son heterocigotas para el alelo marcado con FAM, en color verde las muestras heterocigotas, en color naranja las muestras que son homocigotas para el alelo marcado con fluorocromo VIC, y en color negro los controles negativos o las muestras que no presentaron amplificación.

### 9.3 Desequilibrio de ligamento

Al realizar el análisis de desequilibrio de ligamento de los SNP del LRP1 en estudio, no se encontraron valores con significancia estadística (figura 15).

**Figura 15. Bloque de haplotipos.**

Desequilibrio de ligamento del bloque compuesto por rs11172113 (1), rs1466535 (2), rs1800194 (3), rs1140648 (4) y rs1800164 (5) del gen en estudio. Los valores LD' entre los SNP se encuentran señalados dentro de los recuadros.

## 9.4 Frecuencias alélicas y genotípicas del LRP1

Se realizó la determinación de 5 SNP del gen LRP1, las frecuencias alélicas y genotípicas de nuestra población control, se muestran en la tabla 10.

En el SNP rs11172113 se observó que el grupo de pacientes con HTA mostró un aumento de 10.6% para el alelo T con respecto a los controles. Los genotipos C-T y T-T no mostraron diferencias significativas al comparar ambas poblaciones. Sin embargo en el genotipo C-C la frecuencia se encontró disminuida con respecto al mismo genotipo en los controles (10.1% vs 25.0%) con una diferencia significativa ( $P=0.0487$ ; OR: 0.3396, IC 95%: 0.1202-0.9597). Con respecto a los otros SNP estudiados, en ninguno se encontraron diferencias estadísticamente significativas al realizar la comparación entre pacientes HTA y controles.

**Tabla 10. Frecuencias alélicas y genotípicas de los SNP en estudio del LRP1**

	N	rs11172113		rs1466535		rs1800194		N	rs1140648		rs1800164	
		HTA	CTRL	HTA	CTRL	HTA	CTRL		HTA	CTRL	HTA	CTRL
<b>Alelo</b>	C	0.305	0.411	0.475	0.545	0.432	0.411	A	0.475	0.429	0.585	0.634
	T	0.695	0.589	0.525	0.455	0.568	0.589	G	0.525	0.571	0.415	0.366
<b>Genotipo</b>	C C	0.101*	0.250	0.220	0.304	0.237	0.214	A A	0.254	0.214	0.407	0.411
	C T	0.407	0.321	0.508	0.482	0.390	0.393	A G	0.441	0.429	0.356	0.446
	T T	0.492	0.429	0.272	0.214	0.373	0.393	G G	0.305	0.357	0.237	0.143

*N, nucleótido; HTA, pacientes hipertensos; CTRL, controles sanos; C, citosina; T, timina; A, adenina; G, guanina. \* $P=0.0487$ ; OR: 0.3396, IC 95%: 0.1202-0.9597 al comparar los genotipos C-C de pacientes HTA contra CTRL.*

## 9.5 Comparación de frecuencias alélicas con otras poblaciones previamente reportadas

Con el propósito de comparar la carga genética de nuestra población con respecto a otras poblaciones mundiales, se realizó una comparación mediante la prueba de  $\chi^2$  de las frecuencias alélicas y del alelo menos frecuente (MAF) obtenidas del HapMap de los paneles: CEU, CHB, JPT, YRI y/o MEX<sup>83</sup>, hallados en la literatura para el LRP1. Los resultados se muestran en las tablas 11 y 12.

**Tabla 11. Frecuencias alélicas correspondientes de los SNP del LRP1**

Población	n	rs11172113			rs1466535			rs1800194			rs1140648			rs1800164			
		C	T	p	C	T	p	n	C	T	p	A	G	p	A	G	p
Nuestra Población	56	0.411	0.589		0.545	0.455		56	0.411	0.589		0.429	0.571		0.634	0.366	
MEX	100	0.460	0.540	0.490	0.656	0.344	0.607	100				0.490	0.510	0.342	0.570	0.430	0.413
CEU	226	0.367	0.633	0.446	0.686	0.314	0.050	44	0.704	0.296	0.000	0.678	0.322	0.000	0.350	0.650	0.000
CHB	256	0.275	0.725	0.006	0.760	0.240	0.000	256				0.699	0.301	0.000	0.495	0.505	0.043
JPT	172	0.204	0.796	0.000	0.796	0.204	0.081	172				0.544	0.456	0.059	0.351	0.649	0.000
YRI	324	0.428	0.572	0.758	0.823	0.177	0.000	48	0.459	0.541	0.364	0.628	0.372	0.001			
ESP								339	0.685	0.315	0.000	0.296	0.704	0.019	0.355	0.645	0.000

MEX, población mexicana; CEU, población europea; CHB, población china; JPT, población japonesa, YRI, población africana, ESP, población española.

**Tabla 12. Frecuencias del alelo menor correspondientes a SNP del LRP1 en estudio**

Población	N MAF	rs11172113		N MAF	rs1466535		N MAF	rs1800194		N MAF	rs1140648		N MAF	rs1800164	
		MAF	P		MAF	P		MAF	P		MAF	P		MAF	P
Nuestra Población	14/56	0.250		12/56	T:0.214		22/56	T: 0.393		12/56	A: 0.214		8/56	G: 0.143	
MEX	18/100	C: 0.180	0.299	10/100	T: 0.100	0.058				22/100	A: 0.220	1.00	12/100	G: 0.120	0.068
CEU	28/226	C: 0.123	0.018	20/226	T: 0.088	0.079	0/44	T: 0.000	<0.0001	104/226	A: 0.460	0.008	84/220	G: 0.382	0.001
CHB	8/86	C: 0.093	0.016	4/86	T: 0.047	0.003				26/86	A: 0.302	0.247	24/86	G: 0.279	0.058
JPT	58/226	C: 0.257	0.919	6/172	T: 0.035	<0.0001				70/172	A: 0.407	0.010	70/118	G: 0.593	<0.0001
YRI	38/226	C: 0.168	0.157	8/226	T: 0.036	<0.0001	10/48	T: 0.208	0.054	10/226	A: 0.044	0.002	0/226	G: 0.000	<0.0001

MEX, población mexicana; CEU, población europea; CHB, población china; JPT, población japonesa, YRI, población africana, ESP, población española. MAF: Alelo menos frecuente.

CEU: Panel de residentes adultos de Utah, originarios de Europa Occidental y del Norte. HCB: Panel de habitantes adultos de Beijing, China. JPT: Panel de habitantes adultos de Tokio, Japón. YRI: Panel de adultos originarios de la comunidad de Badán, Nigeria. ESP: Panel de habitantes de Barcelona, España. MEX: Panel de residentes de Los Angeles, USA de origen mexicano.

## 9.6 Características clínicas de los grupos en estudio de acuerdo al genotipo

Para conocer si existe una relación entre los diferentes SNP estudiados del LRP1 con los parámetros clínicos (IMC, CT, TG, LDL, AgII y GIM) se realizó el análisis estadístico por cada SNP estudiado agrupado por genotipo. Se realizó una prueba de t de Student para variables independientes en caso de las variables con distribución normal, y la prueba de U de Mann-Whitney para las variables no paramétricas,  $p < 0.05$ . Todas las comparaciones fueron entre los mismos genotipos correspondientes a HTA o CTRL.

**Tabla 13. Características clínicas por genotipo del SNP rs11172113**

Variable	Genotipos					
	CC	CT	TT	CC	CT	TT
	HTA			Controles		
Sexo (F/M)	10/19	9/15	1/5	8/16	6/12	6/8
Edad	49.1 ± 8.1	43.6 ± 12.2	47.3 ± 5.4	47.1 ± 13.3	47.4 ± 9.4	43.5 ± 7.8
IMC	28.9 ± 3.9	29.1 ± 3.2	28.0 ± 3.5	27.5 ± 3.7	25.2 ± 3.4	27.4 ± 3.8
CT	195.7 ± 37.9	199.5 ± 29.7	177.8 ± 54.2	191.0 ± 38.1	200.7 ± 26.7	216.1 ± 42.0
TG	228.0 ± 20.8 ∞	174.1 ± 68.4	231.7 ± 34.7	211.3 ± 16.9	185.2 ± 85.5	226.6 ± 20.9
HDL	45.3 ± 8.6 ∞	45.4 ± 8.7	43.3 ± 10.1	57.1 ± 14.4	53.1 ± 17.5	49.8 ± 11.3
LDL	114.9 ± 31.6	124.7 ± 27.2	106.2 ± 31.1 ϕ	109.2 ± 28.1	112.9 ± 19.1	133.1 ± 31.3
AgII	0.1964 ± 0.2 ∞	0.2611 ± 0.1 §	0.3029 ± 0.1	0.1883 ± 0.13	0.2669 ± 0.2	0.1821 0 ± 0.1
GIM	0.7348 ± 0.23 ∞	0.6985 ± 0.4 §	0.6860 ± 0.2	0.5509 ± 0.24	0.4925 ± 0.0	0.5720 ± 0.2

Los valores se expresan como media ± DE. Prueba de t de Student para variables independientes en caso de las variables con distribución normal, y prueba de U de Mann-Whitney para las variables no paramétricas,  $P < 0.05$ . M, masculino; F, femenino; IMC, Índice de masa corporal; CT, colesterol total; TG, triglicéridos; HDL, lipoproteína de alta densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; AgII, angiotensina II; GIM, grosor íntima media. ∞ Diferencia estadísticamente significativa al comparar los genotipos C-C de pacientes HTA contra controles, § Diferencia estadísticamente significativa al comparar los genotipos C-T de pacientes HTA contra controles, ϕ Diferencia estadísticamente significativa al comparar los genotipos T-T de pacientes HTA contra controles.

En la tabla 13 se muestran las características clínicas de los grupos en estudio divididas por grupos y genotipo del SNP rs11172113. En cuanto el genotipo C-C, se encontró un aumento en GIM (0.7348 vs 0.5509;  $P=0.041$ ), TG (228.0 vs 211.3,  $P=0.006$ ), AgII (0.1964 vs 0.1883,  $P=0.029$ ) y una disminución en HDL (45.3 vs 57.1;  $P=0.002$ ) en el grupo de HTA con respecto a los controles. Mientras que para el genotipo C-T las diferencias estadísticamente significativas fueron un aumento en valores de AgII (0.2611 vs 0.2669,  $P=0.019$ ), así como en GIM (0.6985 vs 0.4926,  $P=0.016$ ) en pacientes HTA contra controles. Por su parte el genotipo T-T en pacientes HTA presentó una disminución en valores de LDL (106.2 vs 133.1,  $P=0.008$ ) con respecto a controles.

**Tabla 14. Características clínicas por genotipo del SNP rs1466535**

Variable	Genotipo					
	C C	C T	T T	C C	C T	T T
	HTA			Controles		
Sexo (F/M)	3/10	9/21	8/8	6/11	9/18	5/7
Edad	44.9 ± 11.6	45.9 ± 105	49.9 ± 6.9	45.4 ± 8.5	45.3 ± 11.6	49.9 ± 11.8
IMC	28.8 ± 2.9	29.0 ± 3.9	28.8 ± 3.7	25.4 ± 3.2	27.6 ± 4.4	26.9 ± 1.9
CT	184.3 ± 39.6	195.0 ± 38.0	204.9 ± 30.8	210.3 ± 39.1	192.2 ± 34.5	205.5 ± 40.8
TG	226.7 ± 18.7	225.9 ± 25.0	226.7 ± 18.7	222.4 ± 20.2	212.5 ± 20.3	225.8 ± 17.5
HDL	46.3 ± 9.7	44.3 ± 8.0 §	45.7 ± 9.3	55.5 ± 14.3	54.9 ± 15.2	50.2 ± 14.8
LDL	114.3 ± 21.5	112.6 ± 33.4	130.8 ± 26.5	125.0 ± 31.7	112.0 ± 26.1	116.4 ± 28.9
AgII	0.2347 ± 0.1	0.2296 ± 0.5 §	0.2416 ± 0.3	0.2041 ± 0.1	0.2440 ± 0.2	0.1587 ± 0.1
GIM	0.6777 ± 0.2 ∞	0.6730 ± 0.2 §	0.8789 ± 0.3	0.4683 ± 0.0	0.5608 ± 0.2	0.6750 ± 0.5

Los valores se expresan como media ± DE. Prueba de *t* de Student para variables independientes en caso de las variables con distribución normal, y prueba de *U* de Mann-Whitney para las variables no paramétricas,  $P<0.05$ . M, masculino; F, femenino; IMC, Índice de masa corporal; CT, colesterol total; TG, triglicéridos; HDL, lipoproteína de alta densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; AgII, angiotensina II; GIM, grosor íntima media. ∞ Diferencia estadísticamente significativa al comparar los genotipos C-C de pacientes HTA contra controles, § Diferencia estadísticamente significativa al comparar los genotipos C-T de pacientes HTA contra controles.

En la tabla 14 se muestran las características clínicas de los grupos en estudio del SNP: rs1466535. Al comparar los valores de pacientes HTA contra controles, se observó un aumento significativo en los valores de GIM (0.6777 vs 0.4683,  $P=0.014$ ) para el genotipo C-C; así como en GIM (0.6730 vs 0.5608,  $P=0.008$ ) y AgII (0.2296 vs 0.2440,  $P=0.008$ ) en los



pacientes HTA heterocigotos, mientras que se encontraron disminuidos los valores de HDL (44.3 vs 54.9,  $P=0.004$ ) en los heterocigotos con HTA.

En la tabla 15 se muestran las características clínicas de las poblaciones en estudio del SNP: rs1800194. Se encontró un aumento en los pacientes con HTA para AgII (0.1963 vs 0.1111,  $P=0.027$ ) en los homocigotos para el alelo C, y una disminución en HDL en los heterocigotos (44.4 vs 52.5,  $P=0.047$ ) y homocigotos T-T (46.8 vs 58.2,  $P=0.008$ ) estos últimos tuvieron un aumento en valores GIM (0.7581 vs 0.4686),  $P=0.003$ ).

**Tabla 15. Características clínicas por genotipo del SNP rs1800194**

Variable	Genotipo					
	CC	CT	TT	CC	CT	TT
	HTA			Controles		
Sexo (F/M)	8/6	6/17	8/14	2/10	10/12	6/16
Edad	42.2 ± 13.9	47.7 ± 8.4	48.4 ± 8.1	48.4 ± 13.6	43.7 ± 8.3	47.5 ± 11.3
IMC	29.1 ± 5.4	28.4 ± 2.9	29.3 ± 2.9	29.2 ± 5.8	27.0 ± 3.0	25.8 ± 3.3
CT	184.1 ± 30.7	190.6 ± 43.4	207.4 ± 29.7	203.4 ± 44.79	200.8 ± 35.3	198.6 ± 37.4
TG	226.9 ± 24.4	224.6 ± 22.2	227.7 ± 20.4	220.6 ± 16.7	221.5 ± 20.7	213.8 ± 21.3
HDL	43.8 ± 8.0	44.4 ± 8.6 §	46.8 ± 8.7 ϕ	49.6 ± 15.2	52.5 ± 14.1	58.2 ± 14.8
LDL	109.3 ± 20.1	113.1 ± 37.7	127.1 ± 24.1	116.4 ± 34.5	118.0 ± 26.6	115.8 ± 28.2
AgII	0.1963 ± 0.1 ∞	0.2725 ± 0.1	0.2175 ± 0.1	0.1111 ± 0.0	0.2543 ± 0.2	0.2238 ± 0.1
GIM	0.6179 ± 0.2	0.7342 ± 0.2	0.7581 ± 0.4 ϕ	0.5167 ± 0.0	0.6060 ± 0.2	0.4686 ± 0.1

Los valores se expresan como media ± DE. Prueba de *t* de Student para variables independientes en caso de las variables con distribución normal, y prueba de *U* de Mann-Whitney para las variables no paramétricas,  $P<0.05$ . M, masculino; F, femenino; IMC, Índice de masa corporal; CT, colesterol total; TG, triglicéridos; HDL, lipoproteína de alta densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; AgII, angiotensina II; GIM, grosor íntima media. ∞ Diferencia estadísticamente significativa al comparar los genotipos C-C de pacientes HTA contra controles, § Diferencia estadísticamente significativa al comparar los genotipos C-T de pacientes HTA contra controles, ϕ Diferencia estadísticamente significativa al comparar los genotipos T-T de pacientes HTA contra controles.

En la tabla 16 se muestran las características clínicas de las poblaciones en estudio del SNP: rs1140648. Se encontró un aumento con diferencias significativas en los niveles de GIM (0.6096 vs 0.4940,  $P=0.041$ ), CT (214.7 vs 167.7,  $p=0.012$ ), TG (221.1 vs 198.9,  $P=0.049$ ) y LDL (132.1 vs 103.3,  $P=0.014$ ) en el grupo de HTA con respecto a los controles homocigotos para A, en este mismo genotipo se encontraron disminuidos los niveles de HDL (43.7 vs 51.2,  $P=0.032$ ) en pacientes hipertensos. En el genotipo heterocigoto hubo una disminución

en valores de HDL (45.3 vs 53.9,  $P=0.014$ ), y un aumento en valores de AgII (0.2483 vs 0.2224,  $P=0.037$ ) y GIM (0.7324 vs 0.6300,  $P=0.010$ ). Al mismo tiempo los homocigotos para el alelo G también mostraron una disminución en HDL (46.2 vs 56.1,  $P=0.008$ ).

**Tabla 16. Características clínicas por genotipo del SNP rs1140648**

Variable	Genotipo					
	A A	A G	G G	A A	A G	G G
	HTA			Controles		
Sexo (F/M)	8/7	7/19	5/13	6/6	9/15	5/15
Edad	47.9 ± 14.5	48.9 ± 9.1	47.0 ± 9.0	42.4 ± 11.8	46.3 ± 10.4	44.9 ± 8.5
IMC	27.7 ± 4.4	28.4 ± 3.0	29.3 ± 2.7	29.0 ± 5.3	27.5 ± 4.1	25.9 ± 3.0
CT	214.7 ± 39.6 ∞	203.4 ± 29.8	205.6 ± 37.3	167.7 ± 40.9	189.6 ± 39.9	206.4 ± 31.8
TG	222.1 ± 16.0 ∞	225.1 ± 21.9	230.5 ± 19.8	198.9 ± 112.8	219.0 ± 19.9	230.5 ± 19.8
HDL	43.7 ± 8.9 ∞	45.3 ± 8.8 §	46.2 ± 8.6 ϕ	51.2 ± 10.4	53.9 ± 16.3	56.1 ± 15.4
LDL	132.1 ± 29.8 ∞	121.3 ± 34.3	124.8 ± 25.0	103.3 ± 24.3	108.4 ± 27.3	117.9 ± 26.2
AgII	0.2368 ± 0.1	0.2483 ± 0.1 §	0.2118 ± 0.1	0.2192 ± 0.1	0.2224 ± 0.1	0.1962 ± 0.1
GIM	0.6096 ± 0.0 ∞	0.7324 ± 0.2 §	0.7790 ± 0.4	0.4940 ± 0.1	0.6300 ± 0.2	0.4583 ± 0.1

Los valores se expresan como media ± DE. Prueba de *t* de Student para variables independientes en caso de las variables con distribución normal, y prueba de *U* de Mann-Whitney para las variables no paramétricas,  $P<0.05$ . M, masculino; F, femenino; IMC, Índice de masa corporal; CT, colesterol total; TG, triglicéridos; HDL, lipoproteína de alta densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; AgII, angiotensina II; GIM, grosor íntima media. ∞ Diferencia estadísticamente significativa al comparar los genotipos A-A de pacientes HTA contra controles, § Diferencia estadísticamente significativa al comparar los genotipos A-G de pacientes HTA contra controles, ϕ Diferencia estadísticamente significativa al comparar los genotipos G-G de pacientes HTA contra controles.

En la tabla 17 se muestran las características clínicas de las poblaciones en estudio del SNP: rs1800164. Se encontró un aumento con diferencias significativas en los pacientes HTA con el genotipo A-A comparados con los controles, un aumento en niveles de TG (228.4 ± 20.6 vs 212.2 ± 18.4,  $P=0.027$ ) y GIM (0.7242 vs 0.4583,  $P=0.005$ ); y una disminución en HDL (45.3 vs 57.7,  $P=0.029$ ). Los heterocigotos HTA tuvieron una menor cantidad de HDL (46.3 vs 51.6,  $P=0.011$ ) y los homocigotos G-G, tuvieron una mayor cantidad de niveles de AgII (0.2041 vs 0.2481,  $P=0.022$ ).

**Tabla 17. Características clínicas por genotipo del alelo rs1800164**

Variable	Genotipo					
	AA	AG	GG	AA	AG	GG
	HTA			Controles		
Sexo (F/M)	7/17	6/15	7/7	7/16	11/14	2/6
Edad	47.6 ± 8.0	44.3 ± 10.8	48.4 ± 11.8	47.7 ± 11.3	43.9 ± 7.8	49.6 ± 16.5
IMC	30.0 ± 2.7	27.9 ± 3.4	28.2 ± 4.5	26.2 ± 3.4	27.2 ± 3.4	26.8 ± 5.3
CT	205.0 ± 38.2	185.6 ± 39.0	192.8 ± 28.0	193.9 ± 37.1	204.0 ± 34.9	205.2 ± 48.1
TG	228.4 ± 20.6 ∞	221.3 ± 24.3	230.1 ± 20.0	212.2 ± 18.4	223.0 ± 20.6	220.0 ± 21.8
HDL	45.3 ± 8.8 ∞	46.3 ± 7.4 §	43.2 ± 10.3	57.7 ± 14.5	51.6 ± 14.5	52.4 ± 15.9
LDL	121.5 ± 35.1	115.2 ± 27.8	114.5 ± 23.8	113.4 ± 29.8	119.1 ± 25.8	117.9 ± 35.8
AgII	0.2041 ± 0.1	0.2757 ± 0.1	0.2261 ± 0.1 ϕ	0.2017 ± 0.1	0.2481 ± 0.1	0.1253 ± 0.1
GIM	0.7242 ± 0.2 ∞	0.7106 ± 0.3	0.7079 ± 0.3	0.4583 ± 0.1	0.5760 ± 0.2	0.5950 ± 0.2

Los valores se expresan como media ± DE. Prueba de *t* de Student para variables independientes en caso de las variables con distribución normal, y prueba de *U* de Mann-Whitney para las variables no paramétricas,  $P < 0.05$ . M, masculino; F, femenino; IMC, Índice de masa corporal; CT, colesterol total; TG, triglicéridos; HDL, lipoproteína de alta densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; AgII, angiotensina II; GIM, grosor íntima media. ∞ Diferencia estadísticamente significativa al comparar los genotipos A-A de pacientes HTA contra controles, § Diferencia estadísticamente significativa al comparar los genotipos A-G de pacientes HTA contra controles, ϕ Diferencia estadísticamente significativa al comparar los genotipos G-G de pacientes HTA contra controles.

## 9.7 Resultados de regresión logística binaria

Para observar si los SNP se asocian directamente con la hipertensión, se realizó un ajuste de perfil lipídico (CT, TG, HDL, LDL), así como de AgII y GIM; por medio de regresión logística binaria, y únicamente el SNP rs11172113 mostró una asociación significativa con la HTA con el modelo dominante (C-C frente a C-T + T-T).

**Tabla 18. Asociación de SNP y HTA en población mexicana.**

SNP	Grupo	Frecuencias genotípicas		p	OR	IC 95%
rs11172113	HTA	C-C 0.101	C-T + T-T 0.899	0.030	1.289	0.6178-2.689
	CTRL	C-C 0.250	C-T + T-T 0.750			

Regresión logística binaria por ajuste de perfil lipídico, AgII y GIM. HTA, pacientes hipertensos; CTRL, controles sanos; C, citosina; T, timina. OR, Odds Ratio; IC95%, Intervalo de Confianza del 95%;

## 10. Discusión

La HTA y las dislipidemias son entidades que afectan a casi un 40% de la población mexicana adulta con porcentajes en aumento<sup>15</sup>, estos dos factores aislados o en conjunto con otras patologías, aumentan el riesgo de engrosamiento de la pared arterial y/o lesión de la misma, lo que puede desencadenar ECV como una enfermedad inflamatoria crónica.

Dado que el receptor LRP1 está involucrado en el proceso aterosclerótico y que no se ha esclarecido totalmente el papel que desempeña este receptor en conjunto con otros factores, es un gen blanco para el estudio del proceso aterosclerótico. Algunos SNP del gen del LRP han sido estudiados en enfermedad de Alzheimer, sin embargo pocos son los estudios realizados en enfermedades tipo cardiovascular y/o coronaria.

Para la realización de este trabajo se seleccionaron 5 SNP de los más de 1900 SNP reportados para el gen del LRP1, la selección se realizó de acuerdo al alelo menos frecuente. Tres de los SNP se ubican en regiones intrónicas: rs11172113 entre los exones 1 y 2, rs1466535 entre los exones 2 y 3, y rs1800164 entre los exones 83 y 84, y 2 SNP en regiones exónicas: rs1800194 posición 4012 y rs1140648 posición 10249, estos últimos siendo SNP sinónimos.

Para saber si existían valores de desequilibrio de ligamento en nuestros haplotipos estudiados, se obtuvo un valor de  $LD' < 90$  (figura 15), lo que nos indica que nuestros SNP no segregan en conjunto, lo cual explica las diferencias de nuestros resultados tanto en frecuencia como en relación con algunos valores lipídicos ya reportados.<sup>59, 78</sup>

La población de nuestro estudio fue adulta con un rango de edad que iba desde los 18 hasta los 73 años; y sujetos de todas las edades se encuentran equilibrados en ambas poblaciones. A pesar de que un 70% de nuestra población era de género femenino, esta población femenina se repartió equitativamente en controles y pacientes HTA. Para determinar que nuestra población estuviera en equilibrio al ser seleccionada al azar, no sometida a migración o deriva génica, se realizó una prueba de equilibrio de poblaciones de acuerdo a la ley de Hardy-Weinberg, esta prueba se realizó en las poblaciones juntas y por separado (HTA y CTRL).

Al analizar nuestra población total del estudio, se presentaron valores de IMC que se consideran de obesidad coincidiendo con los altos índices presentes en México<sup>1</sup> como se ha reportado en diversos estudios, donde además se reporta a la obesidad como resultado de la combinación de factores tanto genéticos como ambientales y que esta prevalencia fluctúa entre un 20 al 25% en países latinoamericanos, lo cual se ha convertido en un problema de salud pública serio principalmente en mujeres y que va en incremento en nuestro país. La ENSANUT (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, 2006)<sup>15</sup>, reveló que el 30% de los adultos se encuentra dentro de niveles de obesidad en ambos sexos, lo cual concuerda con nuestros datos.

La población total también mostró niveles altos de CT, TG y LDL, lo que concuerda con los altos índices de dislipidemias en nuestro país (figura 2). Los altos porcentajes de dislipidemias que encontramos sumadas a un problema de obesidad o sobrepeso incrementan la probabilidad de padecer una patología cardiovascular.

Por lo que, para conocer el impacto de los factores clínicos sobre el problema de la HTA se compararon ambos grupos, encontrándose diferencias significativas en valores de HDL, AgII y GIM. Estos datos correlacionan positivamente con la HTA, lo cual apoya la evidencia de que un alto porcentaje de personas con valores de IMC por arriba de 25 kg/m<sup>2</sup> presentan diabetes o hipertensión aun sin estar diagnosticadas, como lo muestran diferentes estudios.

84,85

Estos datos nos muestran que la HTA tiene una estrecha relación la obesidad o sobrepeso, las dislipidemias y la predisposición genética, lo cual determina su magnitud y velocidad de daño hacia enfermedades principalmente de tipo cardiovascular; como lo demuestra el GIM elevado encontrado en los pacientes HTA, lo que cual indica la acumulación de colesterol en la íntima media, lo que desencadenará en una lesión aterosclerótica en estos pacientes.

Debido a que el LRP1 tiene un papel importante en el metabolismo de los lípidos y que el gen puede presentar mutaciones que afectan la homeostasis de colesterol, lo cual pudiese afectar el metabolismo de los lípidos y como consecuencia un riesgo de enfermedad cardiovascular; se hizo una selección de 5 SNP según su MAF.

Para analizar las interacciones entre los SNP y las características clínicas del estudio, se realizó una comparación de estas características de acuerdo al genotipo, y al grupo

perteneciente (HTA o CTRL). Todas las comparaciones fueron entre los mismos genotipos correspondientes a HTA o CTRL. Estas diferencias se resumen en la tabla 19.

**Tabla 19. Relación entre el genotipo y las características clínicas**

	SNP				
	rs11172113	rs1466535	rs1800194	rs1140648	rs1800164
<b>GIM</b>	(C-T) 0.016	(C-T) 0.008	(T-T) 0.003	(A-G) 0.010	(A-A) 0.005
<b>TG</b>	(C-C) 0.006			(A-A) 0.049	(A A) 0.027
<b>AgII</b>	(C-T) 0.019	(C-T) 0.008	(C-C) 0.027	(A-G) 0.037	(G G) 0.003
<b>HDL</b>	(C-C) 0.002	(C-T) 0.004	(T-T) 0.008	(G-G) 0.008	(A G) 0.011
<b>LDL</b>	(T-T) 0.008			(A-A) 0.014	
<b>CT</b>				(A-A) 0.012	

Resultados mostrados como (Genotipo) y valor de  $P < 0.0$ ,. GIM, grosor íntima; TG, triglicéridos; AgII, angiotensina II; HDL, lipoproteína de alta densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; CT, colesterol total.

En la comparación de las frecuencias alélicas de los pacientes HTA contra los CTRL, únicamente se encontró una diferencia significativa para el SNP rs11172113 y aunque el valor de razón de momios no alcanzó una diferencia significativa, al analizar las características clínicas de este SNP, se sugiere que el alelo T podría fungir como alelo protector; sin embargo es necesario aumentar la n para poder confirmar esta hipótesis.

Pocos son los trabajos en donde se ha estudiado a este receptor <sup>42</sup> propusieron que la expresión de algunos receptores lipoprotéicos pudieran estar relacionados con la acumulación de lípidos lo cual puede contribuir a una disfunción contráctil y como consecuencia a una hipertensión arterial y ECV. De tal forma que el LRP1 pudiese ser un blanco terapéutico para prevenir la acumulación de colesterol y por ende el desarrollo de la HTA y ECV. El receptor LRP1, como ya se explicó anteriormente, regula la respuesta inflamatoria gracias a su actividad endocítica y de ligando dependiente; sin embargo ante factores como dislipidemias y/o procesos inflamatorios crónicos como la HTA este proceso se puede ver alterado.

Se ha demostrado que niveles elevados de AgII favorecen el desarrollo y progresión de la aterosclerosis <sup>57</sup>, ya que al tener una actividad vasoconstrictora altera el estrés del flujo sanguíneo promoviendo una disfunción endotelial, además de provocar una sobreexpresión

del receptor LRP1. Por su parte la hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, así como la prolongación del estado inflamatorio de la HTA, inducirán la expresión del receptor LRP1.

Nuestros resultados parecen indicar que la presencia del alelo C del SNP intrónico rs11172113 (c.67+4469T>C) se asocia con un aumento del riesgo de sufrir hipertensión. Dado que la funcionalidad del SNP no se ha demostrado, una hipótesis que podría explicar este resultado es que el alelo C podría estar modificando los niveles de expresión del LRP1 y un importante aumento del GIM, y como consecuencia un aumento de riesgo cardiovascular en los pacientes HTA.

Nuestra población al ser mayormente dislipidémica y al contar con niveles elevados de AgII ya aporta factores de riesgo que alteran la expresión del LRP1, sin embargo la presencia de un genotipo heterocigoto C-T parece tener una función protectora, ya que las diferencias significativas para este genotipo muestran una reducción de GIM y AgII. Simultáneamente el genotipo T-T del mismo SNP muestra una disminución en valores de LDL, lo cual evitará una acumulación y oxidación de estos, y al mismo tiempo reducirá la disponibilidad para la internalización dentro de la lesión aterosclerótica por el receptor LRP1. El fenotipo de estas lipoproteínas tendría que ser evaluado, ya que como se ha mencionado las LDL de tamaño pequeño son más rápidamente depuradas, y por lo tanto son menos retenidas en el espacio subendotelial; y por lo mismo son menos susceptibles a la oxidación haciéndolas menos teratogénicas.<sup>21</sup>

Los valores de TG, CT, GIM y AgII se encuentran estadísticamente elevados en sujetos HTA homocigotos para el alelo C con respecto a los sujetos no HTA, y significativamente disminuidos para valores de HDL; lo cual en conjunto conducirá a un cambio en el microambiente inflamatorio, sobreexpresando el receptor LRP1 el cual conducirá a una mayor formación y progresión de la placa aterosclerótica y por consecuencia una mayor probabilidad de sufrir HTA.

Esta hipótesis se apoya cuando al realizar la prueba de regresión logística se observa que el alelo C mostró una asociación significativa con la HTA con el modelo dominante (C-C frente a C-T + T-T), lo cual nuevamente concuerda con los parámetros clínicos reportados.

Con respecto a los otros SNP se encontraron diferencias significativas en parámetros clínicos, sin embargo no se encontró una asociación directa con la HTA relacionada a algún genotipo.

Los países latinoamericanos poseen los índices más elevados de HTA<sup>86</sup> (figura 16, anexo), entre ellos México con un 40% aproximadamente y la población mexicana al tener una elevada frecuencia del alelo de riesgo, sumado a los altos índices de dislipidemias, podría tener un aumento en disposición para sufrir HTA.

En todos los SNP estudiados, excepto el SNP rs1140648 se encontraron datos de frecuencia alélica y MAF de población de origen mexicano, residentes de la ciudad de Utah, y en ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Al comparar nuestra población mexicana con las mundiales se encontró que para el SNP rs11172113 hay diferencias estadísticamente significativas en frecuencias alélicas con las poblaciones de Japón y China, estas diferencias se mantienen al comparar el alelo menos frecuente, pero además se encontró una diferencia en MAF para la población de África.

Para el SNP rs1466535 se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las MAF de las poblaciones de Japón y África, pero solo la diferencia en frecuencia alélica se mantiene con la población de África. Con respecto a las frecuencias alélicas se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las poblaciones de Europa, China y África.

En el SNP rs1800194 solo se encontraron datos de frecuencias alélicas para las poblaciones de Europa, África y España, siendo las últimas dos diferentes estadísticamente, con respecto al MAF se encontraron datos de población de México, Europa y África, siendo únicamente África diferente estadísticamente.

Con respecto al SNP rs1140648 se encontraron diferencias estadísticamente significativas en frecuencias alélicas para las poblaciones de Europa, China, África y España, manteniendo diferencia en MAF únicamente la población de África.

Para el SNP rs1800164 se encontraron diferencias estadísticamente significativas en frecuencia alélica en las poblaciones de Europa, China, Japón y España, y una diferencia estadísticamente significativa en MAF para la población de África.



Nuestra población mexicana presenta una mayor similitud con la población de Japón, ya que a pesar de que tiene diferencias estadísticamente significativas en los SNP: rs111721113 y rs1800164, los MAF no se muestran diferente estadísticamente. La población de Japón al igual que la población mexicana muestra índices elevados de HTA con datos de aproximadamente 40%.

## 11. Conclusiones

Este es el primer trabajo realizado en nuestro país en el que se estudia la relación de algunos SNP del gen LRP1 (rs11172113, rs1466535, rs1800194, rs1140648 y rs1800164) asociados a HTA y a enfermedades cardiovasculares.

Se lograron obtener las frecuencias genotípicas y alélicas de los SNP seleccionados del gen LRP1 correspondientes a nuestra población mexicana, tanto de pacientes HTA como de sujetos sanos, ambas poblaciones cumplen con los criterios de una selección azarosa y en equilibrio.

Nuestras poblaciones presentaron niveles de IMC que caen dentro del rango de obesidad, también valores que superan la referencia en TG y GIM, además la población de HTA presentó niveles de HDL en el límite inferior y valores de GIM muy lejanos a los límites de referencia, lo que concuerda con estudios previos que han demostrado que concentraciones elevadas de TG, así como remanentes de quilomicrones, están implicados en la obesidad. Además la población de HTA presentó niveles de HDL bajos y valores de GIM aumentados, lo que correlaciona con los previamente reportado, una correlación inversa entre el GIM y el HDL. Estas tres variables TG, GIM y HDL se asocian positivamente con la HTA.

Estos valores fuera de rango corresponden con la literatura, sin embargo, también resulta alarmante dado que la presencia de estos factores sumado a otros muy frecuentes en los mexicanos, como vida sedentaria y dislipidemias; podrían resultar en el desarrollo de una enfermedad inflamatoria crónica. En adición, al comparar nuestros índices de HTA nacional con los mundiales nos damos cuenta que Latinoamérica, incluido México, posee los índices más altos de HTA, lo cual podría hablar de una susceptibilidad a nivel genético para padecer este tipo de enfermedades; y a menos de que exista una mayor consciencia y prevención nacional, estaremos sentenciados a continuar con una alta prevalencia de HTA.

Al comparar las características clínicas de la población HTA contra la población control divididas por su genotipo se encontraron diferencias significativas en todos los SNP estudiados; sin embargo, la presencia del alelo C en el SNP intrónico rs11172113 actúa como alelo de riesgo al asociarse directamente con la presencia de HTA. Este SNP mostró diferencia estadísticamente significativa entre las frecuencias de sujetos HTA contra CTRL, además de diferencias estadísticamente significativas en valores de GIM, TG, AgII y HDL.

Por lo que se propone que la presencia del alelo C representa un mayor riesgo de sufrir ECV en los pacientes HTA por una posible modificación en los niveles de expresión del receptor LRP1 asociadas a factores de riesgo de ECV.

En cuanto a los otros SNP estudiados se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las características clínicas, sin embargo no se encontró una asociación directa entre los genotipos y la HTA.

Nuestra similitud en al menos estos 5 SNP estudiados sería con la población de Japón, la cual también al igual que nuestro país, posee índices elevados de HTA. La suma de factores de riesgo genéticos, asociados a una alta disponibilidad en dietas “rápidas” ricas en alto contenido calórico, podría ser justificación para este tipo de padecimientos.

En nuestra población se tienen altos índices de dislipidemias e HTA, ya que a pesar de ser un país en vías de desarrollo, aun se cuenta con una pobre educación alimentaria, una falta de actividad física, y pocos cuidados de los factores de riesgo que conllevan este estilo de vida; y a menos de que nuestra población tenga una mayor consciencia y educación en el tema, se encuentra condicionado a sufrir este tipo de padecimientos.

## 12. Bibliografía

1. NOM-030-SSA2-2009. (2009).
2. Narro Robles, J., Rivero Serrano, O. & López Barcena, J. J. *Hipertensión Arterial. Diagnóstico y tratamiento en la práctica médica* 371–377 (Manual Moderno/UNAM: Ciudad de México, 2011).
3. Krupp, M. A., Tierney Jr., L. M., Roe, R. L. & Camargo, C. A. *Diagnóstico Clínico y de Laboratorio*. 50–275 (Manual Moderno: Ciudad de México, 1986).
4. Brauwald, E. Los efectos de la dieta en la presión arterial. *Avances en Enfermedades Cardiovasculares* 77–82 (2003).
5. Ornish, D. Cambios intensivos de los hábitos de vida para tratar la enfermedad coronaria. *Avances en Enfermedades Cardiovasculares* 46–61 (2003).
6. Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M. & Flower, R. J. *Farmacología*. 250–436 (Elsevier Inc.: España, 2008).
7. Coronary Risk Factors, Endothelial Function, and Atherosclerosis: A Review. *Clinical Cardiology* 432, 426–432 (1997).
8. Lahoz, C. & Mostaza, J. M. La Aterosclerosis como enfermedad sistémica. *Revista Española de Cardiología* 60, 184–195 (2007).
9. Huerta Robles, B. Factores de riesgo para la hipertensión arterial. *Archivos de Cardiología de México* 71, 208–210 (2001).
10. Casani Arazo, L. Prevención de la Arterioesclerosis: Efectos celulares y moleculares de intervenciones dietéticas y farmacológicas. 31–34 (2006).
11. *Atherosclerosis, Molecular and Cellular Mechanisms*. (Wiley-VCH: Reino Unido, 2010).
12. Lusis, A. J. Atherosclerosis. *Nature* 407, 233–241 (2000).
13. Attie, F. *Cardiopatías congénitas en el adulto*. Capítulo 17 (Elsevier Inc.: España, 2002).
14. Posadas Romero, C. *Dislipidemias y Aterosclerosis*. (McGraw-Hill Interamericana de España S.A.de España S.L.: España, 1995).
15. *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición*. (2006).
16. Lara, A. *et al.* Hipercolesterolemia e hipertensión arterial en México. Consolidación urbana actual con obesidad, diabetes y tabaquismo. *Archivos de Cardiología de México* 74, 231–345 (2004).
17. Rosas Peralta, M. La hipertensión arterial en México y su relación con otros factores de riesgo. *Archivos de Cardiología de México* 73, 137–140 (2003).
18. Salud, S. N. de I. en <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/>. *Ene*. 2013
19. Otto, C. M. El eslabón entre la esclerosis aórtica y la aterosclerosis. *Avances en Enfermedades Cardiovasculares* 25–30 (2003).

20. Glass, C. K. & Witztum, J. L. Atherosclerosis : The Road Ahead Review. 104, 503–516 (2001).
21. Llorente, V. & Badimon, L. Bases celulares y moleculares de la acumulación de colesterol en la pared vascular y su contribución a la progresión de la lesión aterosclerótica CHOLESTEROL ACCUMULATION IN THE. *Revista española de cardiología* 51, 633–641 (1998).
22. Jarauta, E., Mateo-gallego, R., Bea, A., Burillo, E. & Calmarza, P. Grosor íntima-media carotídeo en sujetos sin factores de riesgo cardiovascular. *Revista Española de Cardiología* 63, 97–102 (2010).
23. Junyent, M. *et al.* Ecografía carotídea en la evaluación de aterosclerosis preclínica . Distribución de valores del grosor íntima-media y frecuencia de placas de ateroma en una cohorte comunitaria española. 125, 770–774 (2008).
24. Chain, S., Luciardi, H. L., Feldman, G. & Valberdi, A. El espesor íntima-media carotídeo, un marcador de aterosclerosis subclínica y riesgo cardiovascular. Importancia de su valoración y dificultades en su interpretación. *Rev. Fed. Arg. Cardiol.* 34, 392–402 (2005).
25. Izcovich, E. D., Darú, V. D. & Baratta, S. J. El espesor íntima-media carotídeo como predictor de placas ateroscleróticas en la aorta torácica. *Diagnóstico no invasivo* 72, 192–196 (2004).
26. Badimon, J. J. & Badimon, L. Fisiopatología de la enfermedad aterotrombótica coronaria. *Clinical Investigation Arteriosclerosis* 14, (2012).
27. Badimón, L., Vilahur, G. & Padró, T. Lipoproteínas , plaquetas y aterotrombosis. *Revista Española de Cardiología* 1161–1178 (2012).
28. Martínez-gonzález, J., Llorente-cortés, V. & Badimon, L. Biología celular y molecular de las lesiones ateroscleróticas. *Revista española de cardiología* 54, 218–231 (2001).
29. Carillo Calvillo, J. & Bear Sandoval, I. R. Aterosclerosis: Un proceso inflamatorio . *Archivos de Cardiología de México* 74, s379–s384 (2004).
30. Sánchez-recalde, Á. & Carlos, J. Diabetes mellitus , inflamación y aterosclerosis coronaria : perspectiva actual y futura. *Revista Española de Cardiología* 54, 751–763 (2001).
31. Tesone, P. P. A. Aterosclerosis y Diabetes . Una revisión. XV, 24–29 (2007).
32. Holvoet, P. *et al.* Oxidized low-density lipoprotein correlates positively with toll-like receptor 2 and interferon regulatory factor-1 and inversely with superoxide dismutase-1 expression: studies in hypercholesterolemic swine and THP-1 cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26, 1558–65 (2006).
33. Vanhoutte, P. M. [Endothelial dysfunction and atherosclerosis]. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux* 90 Spec No, 9–19 (1997).
34. Weber, C. & Noels, H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nature medicine* 17, 1410–22 (2011).
35. Weber, C., Zernecke, A. & Libby, P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nature reviews. Immunology* 8, 802–15 (2008).
36. Hansson, G. K. & Hermansson, A. The immune system in atherosclerosis. *Nature immunology* 12, 204–12 (2011).

37. Rader, D. J. & Daugherty, A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature* 451, 904–13 (2008).
38. Llorente-Cortés, V. & Badimon, L. LDL receptor-related protein and the vascular wall: implications for atherothrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25, 497–504 (2005).
39. Llorente-Cortés, V. Human Coronary Smooth Muscle Cells Internalize Versican-Modified LDL Through LDL Receptor-Related Protein and LDL Receptors. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 22, 387–393 (2002).
40. Llorente-Cortés, V., Otero-Viñas, M., Camino-López, S., Costales, P. & Badimon, L. Cholesteryl esters of aggregated LDL are internalized by selective uptake in human vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26, 117–23 (2006).
41. Llorente-Cortés, V., Martínez-González, J. & Badimon, L. LDL Receptor-Related Protein Mediates Uptake of Aggregated LDL in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 20, 1572–1579 (2000).
42. Cal, R. *et al.* Low density lipoprotein receptor-related protein 1 expression correlates with cholesteryl ester accumulation in the myocardium of ischemic cardiomyopathy patients. *Journal of translational medicine* 10, 160 (2012).
43. Moore, K. J. & Tabas, I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* 145, 341–55 (2011).
44. Yang, Z., Strickland, D. K. & Bornstein, P. Extracellular matrix metalloproteinase 2 levels are regulated by the low density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2. *The Journal of biological chemistry* 276, 8403–8 (2001).
45. Hansson, G. K. & Libby, P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature reviews. Immunology* 6, 508–19 (2006).
46. Fishbein, G. A. & Fishbein, M. C. Rethinking the Current Classification. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 133, 1309–1316 (2009).
47. Guyton, A. C. & Hall, J. E. *Tratado de Fisiología Médica*. (Elsevier Inc.: España, 2006).
48. Boucher, P. & Herz, J. Signaling through LRP1: Protection from atherosclerosis and beyond. *Biochem Pharmacol* 81, 1–5 (2012).
49. Kounnas, M. Z. *et al.* LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation. *Cell* 82, 331–40 (1995).
50. Hu, L. *et al.* Macrophage low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency enhances atherosclerosis in ApoE/LDLR double knockout mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26, 2710–5 (2006).
51. Lillis, A. P., Duyn, L. B. V. A. N., Murphy-ullrich, J. E. & Strickland, D. K. LDL Receptor-Related Protein 1: Unique Tissue-Specific Functions Revealed by Selective Gene Knockout Studies. *Physiology Rev* 887–918 (2008).doi:10.1152/physrev.00033.2007.
52. Basford, J. E., Moore, Z. W. Q., Zhou, L., Herz, J. & Hui, D. Y. Smooth muscle LDL receptor-related protein-1 inactivation reduces vascular reactivity and promotes injury-induced neointima formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29, 1772–8 (2009).

53. May, P., Woldt, E., Matz, R. L. & Boucher, P. The LDL receptor-related protein (LRP) family: an old family of proteins with new physiological functions. *Annals of medicine* 39, 219–28 (2007).
54. Bujo, H. & Saito, Y. Modulation of smooth muscle cell migration by members of the low-density lipoprotein receptor family. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26, 1246–52 (2006).
55. May, P. The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in inflammation. *Current opinion in lipidology* 24, 1–4 (2013).
56. Castellano, J. *et al.* La hipoxia estimula la expresión del receptor LRP1 a través del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$  en células musculares lisas de pared vascular humana. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis* 24, 115–130 (2012).
57. Sendra, J., Llorente-Cortés, V., Costales, P., Huesca-Gómez, C. & Badimon, L. Angiotensin II upregulates LDL receptor-related protein (LRP1) expression in the vascular wall: a new pro-atherogenic mechanism of hypertension. *Cardiovascular research* 78, 581–9 (2008).
58. Aledo, R. *et al.* LRP1 Gene Polymorphisms Are Associated With Premature Risk of Cardiovascular Disease in Patients With Familial Hypercholesterolemia. *Revista Española de Cardiología (English Edition)* 65, 807–812 (2012).
59. Cal, R. *et al.* Low density lipoprotein receptor-related protein 1 expression correlates with cholesteryl ester accumulation in the myocardium of ischemic cardiomyopathy patients. *Journal of translational medicine* 10, 160 (2012).
60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4035>.
61. Yancey, P. G. *et al.* Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 prevents early atherosclerosis by limiting lesional apoptosis and inflammatory Ly-6Chigh monocytosis: evidence that the effects are not apolipoprotein E dependent. *Circulation* 124, 454–64 (2011).
62. Herz, J. & Strickland, D. K. Multiligand receptors LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *Journal of Clinical Investigation* 108, 779–784 (2001).
63. Franchini, M. & Montagnana, M. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1: new functions for an old molecule. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 49, 967–70 (2011).
64. Llorente-Cortes, V., Barbarigo, V. & Badimon, L. Low density lipoprotein receptor-related protein 1 modulates the proliferation and migration of human hepatic stellate cells. *Journal of cellular physiology* 227, 3528–33 (2012).
65. Boucher, P., Gotthardt, M., Li, W.-P., Anderson, R. G. W. & Herz, J. LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science (New York, N.Y.)* 300, 329–32 (2003).
66. Willnow, T. E., Goldstein, J. L., Orth, K., Brown, M. S. & Herz, J. Low density lipoprotein receptor-related protein and gp330 bind similar ligands, including plasminogen activator-inhibitor complexes and lactoferrin, an inhibitor of chylomicron remnant clearance. *The Journal of biological chemistry* 267, 26172–80 (1992).
67. Van Leuven, F. *et al.* Sequencing of the coding exons of the LRP1 and LDLR genes on individual DNA samples reveals novel mutations in both genes. *Atherosclerosis* 154, 567–77 (2001).
68. Benes, P., Jurajda, M., Zaloudík, J., Izakovicová-Hollá, L. & Vácha, J. C766T low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) gene polymorphism and susceptibility to breast cancer. *Breast cancer research : BCR* 5, R77–81 (2003).

69. Dana B. Hancock, PhDa, B. *et al.* STAT6 and LRP1 polymorphisms are associated with food allergen sensitization in Mexican children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 129, 1673–1676 (2012).
70. Aledo, R. *et al.* LRP1 Gene Polymorphisms Are Associated With Premature Risk of Cardiovascular Disease in Patients With Familial Hypercholesterolemia. *Revista española de cardiología* 65, 807–812 (2012).
71. Castellano, J. *et al.* Hypoxia stimulates low-density lipoprotein receptor-related protein-1 expression through hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in human vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31, 1411–20 (2011).
72. McCarthy, J. J. Large scale association analysis for identification of genes underlying premature coronary heart disease: cumulative perspective from analysis of 111 candidate genes. *Journal of Medical Genetics* 41, 334–341 (2004).
73. Pocathikorn, A. *et al.* Influence of exonic polymorphisms in the gene for LDL receptor-related protein (LRP) on risk of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 168, 115–121 (2003).
74. Marchetti, G. & Mascoli, F. Contribution of low density lipoprotein receptor-related protein genotypes to coagulation factor VIII levels in thrombotic women. *The Hematology Journal* 9, 1261–1263 (2006).
75. Cunningham, N., Laffan, M. A., Manning, R. A. & O'Donnell, J. S. Low-density lipoprotein receptor-related protein polymorphisms in patients with elevated factor VIII coagulant activity and venous thrombosis. *Blood coagulation fibrinolysis an international journal in haemostasis and thrombosis* 16, 465–468 (2005).
76. Schulz, S. *et al.* The LDL receptor-related protein (LRP1/A2MR) and coronary atherosclerosis--novel genomic variants and functional consequences. *Human mutation* 20, 404 (2002).
77. Benes, P., Jurajda, M., Zaloudík, J., Izakovicová-Hollá, L. & Vácha, J. C766T low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) gene polymorphism and susceptibility to breast cancer. *Breast cancer research : BCR* 5, R77–81 (2003).
78. Aledo, R. *et al.* LRP1 Gene Polymorphisms Are Associated With Premature Risk of Cardiovascular Disease in Patients With Familial Hypercholesterolemia. *Revista española de cardiología* 65, 807–812 (2012).
79. Tenorio-López, F. A. *et al.* Simultaneous determination of angiotensins II and 1-7 by capillary zone electrophoresis in plasma and urine from hypertensive rats. *Talanta* 80, 1702–12 (2010).
80. Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J. & Daly, M. J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics (Oxford, England)* 21, 263–5 (2005).
81. Viia, S. Introducción a la PCR en Tiempo Real.
82. Biorad Applications Guide. Real-Time PCR.
83. Kitts, A. & Sherry, S. The Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) of Nucleotide Sequence Variation. *The NCBI Handbook [Internet]* Chapter 5at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21088/>>
84. Rojas-Martínez, R. *et al.* Prevalence of obesity and metabolic syndrome components in Mexican adults without type 2 diabetes or hypertension. *Salud pública de México* 54, 7–12 (2012).



85. Rojas-Martínez, R., Aguilar-Salinas, C. a & Jiménez-Corona, A. Optimal cutoff points for the detection of undiagnosed type 2 diabetes, hypertension and metabolic syndrome in Mexican adults. *Salud pública de México* 54, 13–9 (2012).
86. Kearney, P. M. *et al.* Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 365, 217–23 (2005).

## 13. Anexos

### 1. Extracción de DNA por equipo comercial

El equipo comercial utilizado fue el *Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Wisconsin)*.

**Tabla 20. Reactivos y cantidades a adicionar según el tamaño de la muestra.**

Tamaño de muestra	Solución de lisis		Solución de precipitación proteínas	Isopropanol	TE
	Celular	Nuclear			
300 µl	900 µl	300 µl	100 µl	300 µl	50 µl
1 ml	3 ml	1 ml	330 µl	1 ml	50 µl
2 ml	6 ml	2 ml	667 µl	2 ml	50 µl
3 ml	9 ml	3 ml	1 ml	3 ml	50 µl
10 ml	30 ml	10 ml	3.3 ml	10 ml	50 µl

#### Metodología:

1. Por inversión mezclar la muestra con la cantidad necesaria de solución de lisis celular en tubos Falcon apropiados a las cantidades.
2. Incubar por 10 min a temperatura ambiente.
3. Centrifugar a 2500 rpm 10 minutos.
4. Descartar sobrenadante y vortexear pellet.
5. Agregar la solución de lisis nuclear de acuerdo a la tabla y mezclar por inversión. La solución debe hacerse viscosa, si tiene cúmulos incubar a 37°C hasta por 1 hora. Si después de una hora siguen teniendo cúmulos, agregar nuevamente solución de lisis nuclear (ojo, ver notas).
6. Agregar la solución de precipitación de proteínas y vortexear por 20 segundos. (ver notas)
7. Centrifugar a 2500 rpm 10 minutos.
8. Recoger el sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo y agregar la cantidad de isopropanol puro de acuerdo a los volúmenes de la tabla.
9. Centrifugar a 2500 rpm 10 minutos.
10. Descartar el sobrenadante por decantación y agregar la misma cantidad que en el paso 8, pero de etanol al 70%

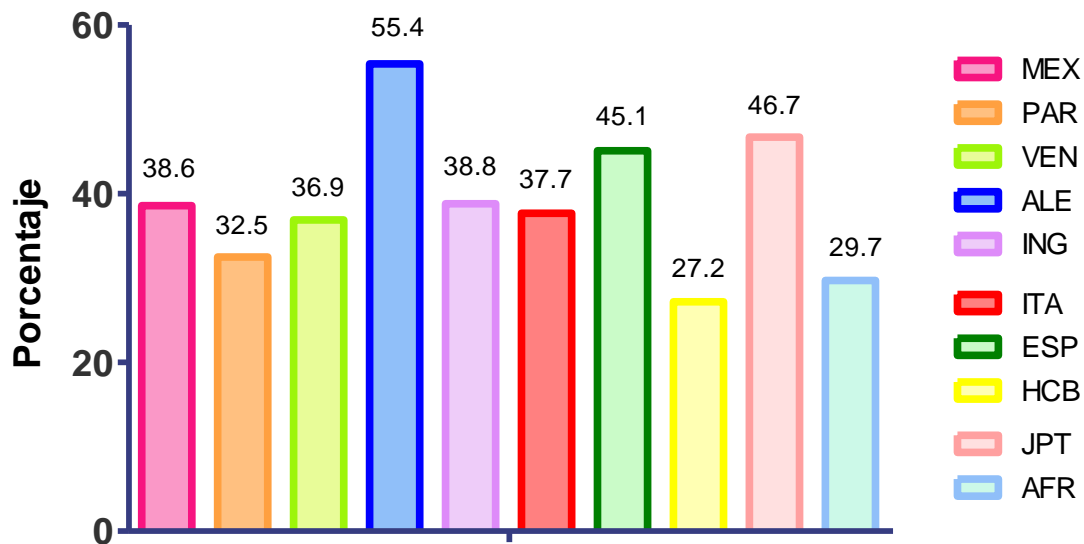
11. Centrifugar a 2500 rpm 10 minutos.
12. Decantar el etanol y dejar secar el pellet
13. Rehidratar el DNA con la solución de kit o TE.
14. Almacenar a 4°C para su posterior lectura y ajuste.

**NOTAS:**

- a) La sangre debe de estar en tubos con anticoagulante de citratos, EDTA o heparina.
- b) Si después del paso 1 no se observa el pellet blanco y pareciera que solo hay glóbulos rojos, quitar el sobrenadante y repetir los pasos del 1 al 4.
- c) Si en el paso 5 se adicionó nuevamente solución de lisis nuclear, se tiene que agregar un 21.2% más de la solución de precipitación de proteína. (Total 121.2%)

## 2. Frecuencias mundiales de HTA reportadas

Figura 16. Porcentajes de Hipertensión a nivel mundial



MEX, México; PAR, Paraguay; VEN, Venezuela; ALE, Alemania; ING, Inglaterra; GRE, Grecia; ITA, Italia; ESP, España; HCB, China; JPT, Japón; AFR, África.<sup>86</sup>