



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
FACULTAD DE QUÍMICA/ICES- BIOQUÍMICA CLÍNICA

ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DEL RECEPTOR LRP1 EN PACIENTES CON
HIPERTENSION ARTERIAL CON ENGROSAMIENTO DE LA ÍNTIMA MEDIA
ARTERIAL EN POBLACIÓN MEXICANA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

EBC. MARÍA JOSÉ JARAMILLO ESTRELLA

TUTORA

DRA. CLAUDIA HUESCA GÓMEZ
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MÉXICO D.F OCTUBRE 2014



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: Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta

VOCAL: Dra. Claudia Huesca Gómez

VOCAL: Dr. Ricardo Gamboa Ávila

VOCAL: Dra. María Teresa Villarreal Molina

SECRETARIO: Dr. Samuel Cañizales Quinteros

SITIO DONDE SE REALIZÓ EL TRABAJO:

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA “IGNACIO CHÁVEZ”

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

TUTORA:

DRA. CLAUDIA HUESCA GÓMEZ

SUSTENTANTE:

EBC. MARÍA JOSÉ JARAMILLO ESTRELLA

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

DEDICATORIA

Este trabajo quiero dedicar con mucho amor:

A mis padres, por su amor infinito, confianza inquebrantable y apoyo incondicional, por ser mis mejores amigos, los pilares, la fuerza, la luz y la guía en este largo caminar.

A mis hermanos, quienes me han brindado su cariño eterno y con quienes comparto todo, son los guardianes de mis pasos y compañeros de vida, “les adoro monstruitos”.

A toda mi familia, por estar pendientes a cada instante de mis estudios y alegrarse con mis triunfos.

A mis amigas, amigos, compañeras y compañeros, por haber compartido momentos de distracción, alegría y compañerismo, por estar en los momentos tristes, en los días difíciles y formar parte de mi familia en México.

A mis amigas y amigos en Ecuador, a pesar de la distancia han estado ahí, con su amistad, y siempre con una palabra de aliento para no desmayar.

A quien ha sido el motor que me empuja para continuar con mis sueños, quien con su paciencia, cariño y apoyo desinteresado se convirtió en mi soporte durante esta larga etapa y fue el editor oficial de esta tesis.

Dedico además este trabajo a todos los colegas profesionales y estudiantes por tener la fuerza, la resistencia y la convicción necesaria para hacer y brindar un valor agregado a aquello que más nos apasiona “La Ciencia”.

AGRADECIMIENTO

A Dios por brindarme la oportunidad de cumplir mis sueños y permitirme estar donde estoy.

A mis padres por ser mi fuente de inspiración, estar siempre a mi lado y brindarme todo su amor incondicional.

A Conacyt contribuyente fiscal, por concederme el apoyo económico mediante la beca número 279956.

A la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, fuente de sapiencia, y testigo silencioso de tanto sacrificio y constancia, por guardar tantas risas y lágrimas que han sido parte de este proceso.

A todos los profesores por su sabiduría, conocimiento y paciencia, por brindarme su apoyo y hacerme entender los misterios de la ciencia y a la vez de la vida.

A la Dra. Claudia Huesca, mi tutora y amiga, gracias por colaborar, guiarme, consentirme y ser parte fundamental en la elaboración de este trabajo investigativo.

Al Dr. Ricardo Gamboa quien forma parte del equipo investigativo del Laboratorio de Fisiología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, por su ayuda, colaboración y consejos prácticos para enaltecer la investigación.

A la Dra. Rocío Martínez, gracias a su contribución y compromiso fue posible la culminación de este trabajo.

Un especial agradecimiento a la Dra Vicenta Llorente y a todo su equipo del Centro de Investigación Cardiovascular CSIC-ICCC del Hospital Sant Pau en Barcelona-España, por la apertura, colaboración e innumerables sugerencias y comentarios científicos.

A los miembros del jurado, quienes se tomaron el tiempo necesario para revisar esta tesis, muchas gracias por sus comentarios y sugerencias que han sido un gran aporte.

A mis amigas y amigos del cuarto y séptimo piso por todo el tiempo compartido dentro y fuera del laboratorio.

Mi gratitud para México, país que abrió sus puertas, me acogió y ha sido mi hogar durante cuatro años. ¡Mil Gracias

RESUMEN

La hipertensión arterial (HTA) es una enfermedad crónica, poligénica y multifactorial, es uno de los principales factores de riesgo para desarrollar aterosclerosis, enfermedad cardiovascular, cerebrovascular y falla renal, que a su vez son importantes causas de mortalidad en México. Por otro lado, la aterosclerosis es una enfermedad compleja crónica que se define como una respuesta local inflamatoria fibroproliferativa a múltiples formas de lesión endotelial. Las lesiones endoteliales evolucionan y se van complicando por el impacto de factores de riesgo entre los que se encuentra la hipertensión y la hipercolesterolemia.

Estos factores de riesgo alteran en primer lugar la funcionalidad del endotelio, provocando un daño directo, que facilita la entrada y retención de LDL en el espacio subendotelial. Una vez que la LDL queda retenida en la íntima arterial, sufre modificaciones como oxidación y agregación que facilitan la captación de LDL por receptores celulares que no están regulados a la baja por las concentraciones intracelulares de colesterol. En las células musculares lisas, monocitos y macrófagos, la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1) es el principal receptor transmembrana multiligando.

El objetivo de este estudio fue determinar la relación entre el engrosamiento de la íntima media arterial y la hipertensión arterial a través de la expresión específica del LRP1 en monocitos humanos y el análisis de sus polimorfismos. En este trabajo se analizó a 201 sujetos mexicanos, 91 normotensos y 110 hipertensos. Se observó una sobreexpresión del receptor LRP1 en monocitos de pacientes mexicanos hipertensos tanto a nivel de RNAm como de proteína. Además, el valor promedio del grosor de la íntima media fue superior en los sujetos hipertensos y se asoció a la sobreexpresión de LRP1 en los monocitos circulantes de estos pacientes. Por otro lado, la presencia del genotipo GG del polimorfismo rs1800164, podría estar asociado con un incremento en el riesgo de padecer hipertensión arterial en nuestra población de estudio.

Palabras clave: Hipertensión arterial, aterosclerosis, expresión, polimorfismos, *LRP1*

ÍNDICE DE CONTENIDO

JURADO ASIGNADO	1
DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTO	5
RESUMEN	6
ÍNDICE DE CONTENIDO	7
ABREVIATURAS	10
ÍNDICE DE TABLAS	12
ÍNDICE DE FIGURAS	13
ÍNDICE DE GRAFICOS	14
ÍNDICE DE CUADROS	15
MARCO TEÓRICO	16
1.1 ATEROSCLEROSIS	16
1.1.1 LESIÓN ATEROSCLERÓTICA	16
1.1.2 PROGRESIÓN DE LESIÓN ATEROSCLERÓTICA	17
1.1.3 GROSOR DE LA ÍNTIMA MEDIA ARTERIAL	20
1.1.4 FACTORES DE RIESGO DE ATEROSCLEROSIS	21
1.2 HIPERTENSIÓN ARTERIAL	21
1.2.1 CLASIFICACIÓN	21
1.2.2 DIAGNÓSTICO	23
1.2.3 TRATAMIENTO	24
1.3 PARTICIPACIÓN DE RECEPTORES EN ATEROSCLEROSIS	24
1.4 RECEPTOR LRP1	25
1.5 POLIMORFISMOS DEL LRP1	28

<u>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u>	<u>30</u>
<u>JUSTIFICACIÓN</u>	<u>31</u>
<u>OBJETIVOS E HIPÓTESIS</u>	<u>33</u>
4.1 OBJETIVO GENERAL	33
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4.3 HIPÓTESIS	33
<u>METODOLOGÍA</u>	<u>34</u>
5.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN	34
5.2 TAMAÑO DE MUESTRA	34
5.3 POBLACIÓN Y MUESTRA	34
5.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN	34
5.5 VARIABLES	35
5.6 DEFINICIÓN DE VARIABLES	36
5.7 DISEÑO EXPERIMENTAL	38
5.7.1 TOMA DE MUESTRA	38
5.7.2 DETERMINACIONES ANTROPOMÉTRICAS ESTANDARIZADAS	38
5.7.3 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS	40
5.7.4 MEDICIÓN DE LA ÍNTIMA MEDIA ARTERIAL	40
5.7.5 SEPARACIÓN DE MONOCITOS	41
5.7.6 EXTRACCIÓN DE RNA Y PROTEÍNA Y ANÁLISIS DE WESTERN BLOT	41
5.7.7 EXTRACCIÓN DE DNA	42
5.7.8 DETERMINACIÓN GENOTÍPICA DEL LRP1	42
5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	43
<u>RESULTADOS</u>	<u>44</u>
<u>DISCUSIÓN</u>	<u>63</u>
<u>CONCLUSIONES</u>	<u>67</u>
<u>PERSPECTIVAS</u>	<u>68</u>

<u>ANEXOS</u>	<u>69</u>
ANEXO 1: SEPARACIÓN DE MONOCITOS	66
ANEXO 2: EXTRACCIÓN DE DNA	70
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>71</u>

ABREVIATURAS

A2M: alfa 2 macroglobulina	HPRT1: Hipoxantina fosforribosil transferasa 1
A2MR: receptor de alfa 2 macroglobulina	HT: Hipertensos
AMF: alelo menos frecuente	HTA: Hipertensión arterial
ANG II: Angiotensina II	IGF-1: Factor de crecimiento tipo insulina
cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario	IMC: Índice de masa corporal
c-HDL: Colesterol de lipoproteínas de alta densidad	INF-gamma: Interferón gamma
c-LDL: Colesterol de lipoproteínas de baja densidad	IL: Interleucina
CML: Células musculares lisas	JNC7: The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure por sus siglas en inglés
CMLV: Células musculares lisas vasculares	kDA: Kilo-Daltones
CE: Colesterol esterificado	LDL-ag: Lipoproteínas de baja densidad agregadas
CT: Colesterol total	LDL-mod: Lipoproteínas de baja densidad modificadas
DNA: Ácido desoxirribonucleico	LDL-ox: Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
DS: Desviación estándar	LRP1: Low density lipoprotein receptor-related protein
EAC: Enfermedad arterial coronaria	MCP1: Proteína quimio-atrayente de monocitos 1
ECV: Enfermedad cardiovascular	
EGF: Factor de crecimiento epidérmico	
FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos	
GIM: grosor de la íntima media	

MCSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos

NT: Normotensos

ON: Óxido nítrico

OR: odds ratio/razón de momios

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RNA: Ácido ribonucleico

RNAm: Ácido ribonucleico mensajero

TG: Triglicéridos

TNF-alfa: Factor de necrosis tumoral alfa

ug: Microgramo

VCAM-1: Molécula de adhesión vascular
1

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de Hipertensión arterial por la JNC7 _____	22
Tabla 2. Clasificación de presión arterial según la OMS _____	22
Tabla 3. Polimorfismos seleccionados _____	29
Tabla 4. Definición y operacionalización de variables _____	37
Tabla 5. Sondas de amplificación para cada polimorfismo del <i>LRPI</i> _____	42
Tabla 6. Características clínicas de la población _____	45
Tabla 7. Parámetros clínicos de riesgo para Hipertensión _____	46
Tabla 8. Parámetros clínicos de riesgo para Hipertensión por género _____	47
Tabla 9. Características clínicas de la población por género; Comparación entre mujeres y varones dentro del mismo grupo _____	48
Tabla 10. Características clínicas de la población por género; Comparación de mujeres y varones entre los dos grupos de estudio _____	49
Tabla 11. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del <i>LRPI</i> _____	54
Tabla 12. Tabla de frecuencias alélicas de otras poblaciones previamente reportadas ____	55
Tabla 13. Características clínicas por genotipo del polimorfismo rs11172113 _____	58
Tabla 14. Características clínicas por genotipo del polimorfismo rs1466535 _____	59
Tabla 15. Características clínicas por genotipo del polimorfismo rs1800194 _____	60
Tabla 16. Características clínicas por genotipo del polimorfismo rs1140648 _____	61
Tabla 17. Características clínicas por genotipo del polimorfismo rs1800164 _____	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Composición de una arteria normal _____	16
Figura 2. Esquema de la progresión de la lesión aterosclerótica _____	17
Figura 3. Función de las LDL en la aterosclerosis _____	18
Figura 4. Esquema de la formación de placa ateromatosa _____	19
Figura 5. Ecografía arterial _____	20
Figura 6. Receptor LRP1 _____	25
Figura 7. Localización cromosómica del gen <i>LRP1</i> _____	25
Figura 8. Síntesis de LRP1 _____	26
Figura 9. Receptores de la familia de las LDL y sus dominios _____	27
Figura 10. Curvas de amplificación típicas _____	52
Figura 11. Discriminación alélicas _____	52
Figura 12. Bloque de Haplotipos para <i>LRP1</i> _____	53
Figura 13. Obtención de monocitos por gradiente de densidad. _____	69

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfica 1. Distribución de la población normotensa e hipertensa por género _____	45
Gráfica 2. Cuantificación de la expresión de LRP1 _____	50
Gráfica 3. Correlación entre los niveles de expresión de RNAm y de proteína del LRP1 y el GIM en el grupo de hipertensos. _____	51

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Interrelación de variables	38
--------------------------------------	----

MARCO TEÓRICO

1.1 ATEROSCLEROSIS

La Aterosclerosis es una enfermedad compleja crónica que se define como una respuesta local inflamatoria fibroproliferativa de múltiples formas de lesión endotelial [2]. Es la causa de la mayor parte de los episodios cardiovasculares entre los que incluye la enfermedad arterial coronaria (EAC) y otras complicaciones de tipo vascular (infarto cerebral, enfermedad vascular periférica) [3].

Se considera una enfermedad sistémica con componente de predisposición genética que involucra alteraciones metabólicas, tróficas e inflamatorias, sin descartar la participación de agentes inmunológicos e infecciones en su génesis [4, 5]. Es la complicación más frecuente de otras enfermedades como diabetes [6], hipertensión arterial [7] y dislipidemia [8].

1.1.1 LESIÓN ATEROSCLERÓTICA

La aterosclerosis se caracteriza por el desarrollo de una placa fibrolipídica en la superficie interior de la arteria [9]. Las arterias están conformadas por tres capas (Figura 1) una capa interior o íntima formada por células endoteliales, una capa intermedia donde se encuentran células musculares lisas y fibras elásticas y una última capa exterior o adventicia rica en fibras elásticas y de colágeno [10].

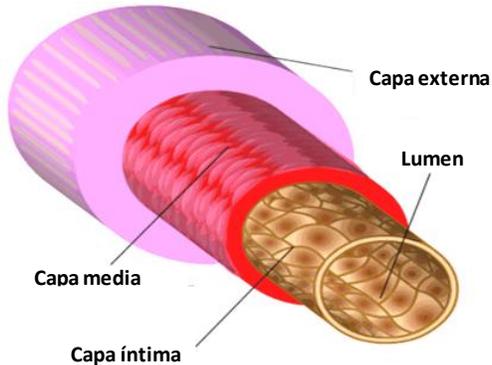


Figura 1. Composición de una arteria normal [11]

Las alteraciones del endotelio se consideran como un proceso causal en el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas. Cuando se produce un daño a nivel endotelial inducido por diversos factores como tabaquismo, hipertensión arterial, dieta alta en grasas y/o azúcares se favorece la retención de lípidos y células inflamatorias como monocitos en la pared arterial [12], en este proceso se compromete la capacidad de las células endoteliales para regular su función y mantener la homeostasis de la pared vascular [13]. También el estrés oxidativo deriva a una disfunción endotelial promoviendo una proliferación de células musculares lisas (CML), inflamación, activación de plaquetas y proteólisis de la matriz extracelular [14].

1.1.2 PROGRESIÓN DE LESIÓN ATEROSCLERÓTICA

Varios estudios han puesto en evidencia que la aterosclerosis se inicia en la primera década de la vida con la aparición de “estrías grasas” denominadas así por su aspecto sub-endotelial, que aparecen inicialmente en las paredes de la aorta torácica, a manera de pequeñas placas confluentes amarillo-grisáceas conformadas por cúmulos de macrófagos que han fagocitado elementos lipídicos y constituyen las llamadas células espumosas [9, 15].

Esta estría grasa puede evolucionar a una lesión intermedia o fibroadiposa, formada por una extensa matriz de tejido conectivo fibroso y por CML que migran de la capa media hacia la íntima, aumentando el número de células espumosas y células T, formando capas que pueden estabilizarse o progresar a lesiones más complejas. (Figura 2).

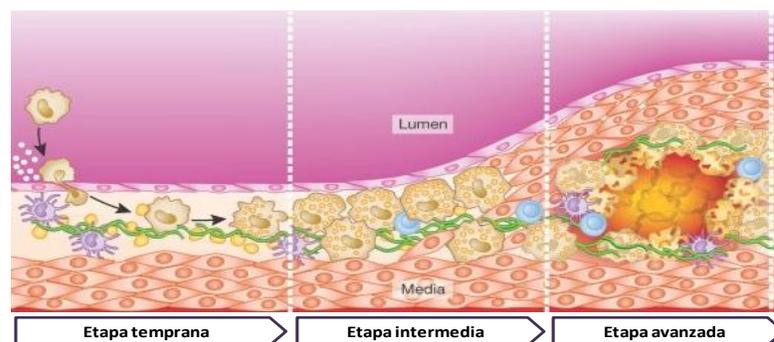


Figura 2. Esquema de la progresión de la lesión aterosclerótica [16]

Uno de los principales factores que determina la formación de la estría grasa es el cúmulo de colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (c-LDL) en la pared vascular, provocando una alteración en la actividad biológica de la membrana, aumentando el tráfico de LDL a través del endotelio, estas lipoproteínas son transportadas rápidamente y se unen a los proteoglicanos que conforman la matriz extracelular [17, 18].

Para que las LDL puedan ejercer su potencial aterogénico, deben ser modificadas en su estructura química, mediante la oxidación de sus lípidos y de la apolipoproteína B-100 (apo B-100), esta oxidación se produce por radicales de oxígeno como el radical súper-óxido y otras formas reactivas de oxígeno [19]. Las LDL oxidadas (LDL-ox) expresan moléculas de adhesión, la proteína 1 quimio-atrayente de monocitos (MCP-1) y el factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF), los cuales van a facilitar la migración y adhesión de los monocitos al endotelio [20], una vez dentro del espacio subendotelial los monocitos se diferencian a macrófagos. Este cambio químico que sufren las LDL permite que estas lipoproteínas sean captadas por los macrófagos mediante endocitosis mediados por receptores no regulados como los receptores tipo basurero (scavenger) (SRBI/II y SRAI/II) transformándolos en células espumosas [21].

La Figura 3 esquematiza la función de las LDL en el proceso de formación de ateromas.

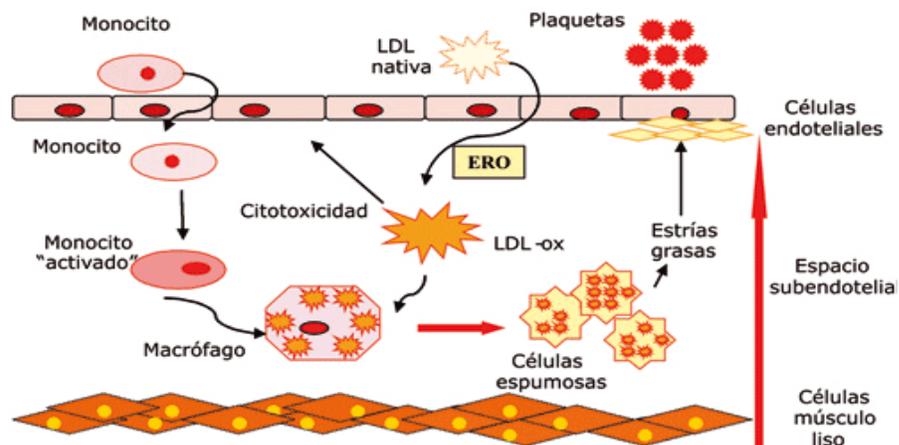


Figura 3. Función de las LDL en la aterosclerosis [22]

La estría grasa puede avanzar hasta la formación de placa aterosclerótica o bien puede involucionar. El progreso de la lesión depende de la proliferación de CML y de la acumulación lipídica en macrófagos [23].

La placa fibrosa o lesión complicada tiene una cubierta fibrosa de espesor variable formada por varias capas de músculo liso y tejido conectivo con alto contenido de fibras colágenas, fibras elásticas y proteoglicanos. Por debajo de esta cubierta se encuentra tejido conectivo menos denso y cúmulo de células espumosas llenas de lípidos y células T, ésta cubierta es la responsable de dar la estabilidad a la placa [24].

La Figura 4 representa la formación de la estría grasa con la participación de diversas citocinas como IL-1, IL-2, IL-12, IL-18, Interferón-gamma (INF- γ) y factores de crecimiento como el factor de necrosis tumoral -alfa (TNF- α), FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), IGF-1 (factor de crecimiento tipo insulina), que favorecen la acumulación de lípidos en el espacio sub-entotelial, la proliferación celular y la consecuente disminución del lumen arterial [25].

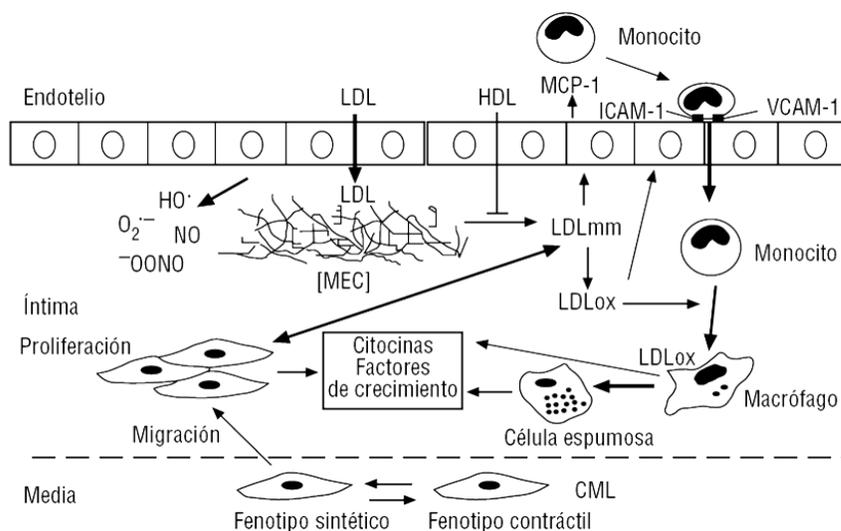


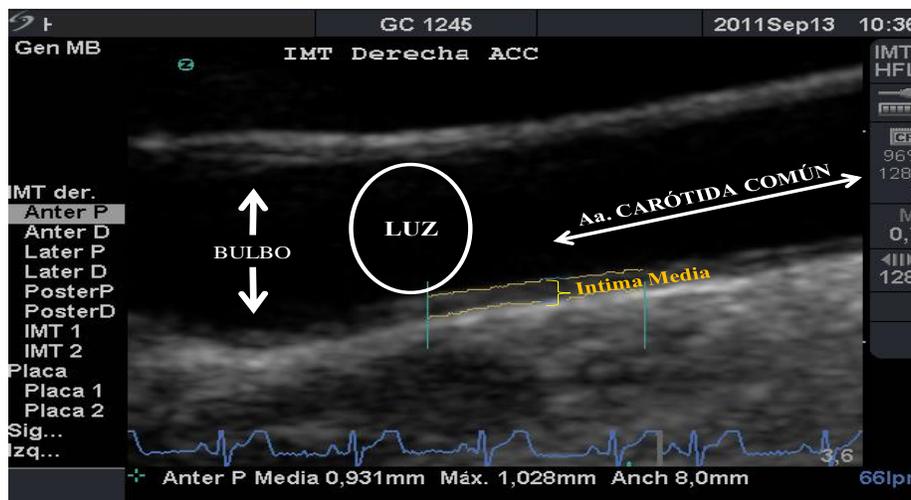
Figura 4. Esquema de la formación de placa aterosclerótica [26]

1.1.3 GROSOR DE LA ÍNTIMA MEDIA ARTERIAL

La íntima-media arterial está representada por el área de tejido que inicia desde el borde luminal de la arteria y termina en el límite entre la media y la adventicia. El engrosamiento de la íntima-media puede generarse por aterosclerosis, presión arterial alta y factores genéticos [27].

El grosor de la íntima media (GIM) se puede visualizar por ultrasonido o por ecotomografía de las paredes de la arteria carótida a través de una imagen longitudinal y se define como un patrón de líneas dobles paralelas que corresponden a los límites de interfaz lumen-íntima y media-adventicia [28].

La presencia de placa en las arterias se define como una estructura focal que irrumpe el lumen arterial al menos 0.5mm o el 50% del valor del grosor de la íntima media adyacente o un grosor de 1.5mm medido desde el interfaz de la media-adventicia a la interfase íntima-lumen [29] (Figura 5).



Gráfica 5. Ecografía arterial: vista longitudinal de la arteria carótida común con engrosamiento de la íntima media

Se ha demostrado previamente la asociación del GIM con aterosclerosis [31, 32], con factores de riesgo cardiovascular [33] y con prevalencia de enfermedad cardiovascular [34-36]. Por ello, se ha propuesto que el GIM es una medición ideal para el diagnóstico de aterosclerosis [37]

1.1.4 FACTORES DE RIESGO DE ATEROSCLEROSIS

Los factores de riesgo que tienen una fuerte asociación con la aterosclerosis son los antecedentes familiares de enfermedad aterosclerosa, niveles de colesterol total (CT) y c-LDL elevados [38], colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) disminuido, edad, género masculino, sedentarismo, tabaquismo e hipertensión arterial (HTA) [39-41].

En nuestro estudio se considera a la hipertensión arterial como un factor de riesgo por su asociación al desarrollo de aterosclerosis y al incremento de la morbilidad y mortalidad de diversas enfermedades vasculares a nivel cerebral, cardíaco, renal y periférico, debido a la disfunción endotelial e hipertrofia de la musculatura vascular [42].

1.2 HIPERTENSIÓN ARTERIAL

La hipertensión arterial (HTA) es una enfermedad crónica caracterizada por un incremento continuo en las cifras de presión sanguínea en las arterias [21] (Tabla 1 y 2), su diagnóstico es fácil de determinar. La hipertensión se ha asociado a tasas de mortalidad notablemente elevadas por lo que está considerada como un problema importante de salud pública.

La hipertensión arterial crónica se considera un factor de riesgo para el desarrollo de EAC [43, 44]. La HTA produce cambios en el flujo sanguíneo de manera silente a nivel macrovascular y microvascular. La hipertensión arterial además de tener un componente genético [45], tiene un componente dietético muy importante en relación con la ingesta de sal y edulcorantes [46, 47].

1.2.1 CLASIFICACIÓN

De acuerdo a la Asociación Norteamericana del Corazón en el Séptimo Reporte del Comité Nacional Conjunto de Prevención, Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipertensión Arterial (JNC7, por sus siglas en inglés) [48], la clasificación de la hipertensión está basada en el promedio de más de dos medidas de presión arterial en

posición sentado, de acuerdo a esto ha dividido a la Hipertensión en estadios 1 y 2, como se muestra en la Tabla 1. El JNC7 ha definido la presión sanguínea normal como < 120 y < 80 mmHg. Los niveles intermedios, 120 a 139 y 80 a 89 mmHg, están definidos ahora como pre-hipertensión [49].

Tabla 1. Clasificación de Hipertensión arterial por la JNC7

Nivel de Presión Arterial (mmHg)			
Categoría	Sistólica		Diastólica
Normal	< 120	y	< 80
Pre-hipertensión	120-139	ó	80-89
Hipertensión arterial			
Hipertensión estadio 1	140-159	ó	90-99
Hipertensión estadio 2	≥ 160	ó	≥ 100

Existe otra clasificación para la Hipertensión arterial según los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en donde la hipertensión arterial se estratifica en leve, moderada, severa y sus subgrupos. La Tabla 2 muestra la clasificación de la hipertensión según la Organización Mundial de la Salud OMS.

Tabla 2. Clasificación de presión arterial según la OMS, 1999

Categoría	Sistólica (mmHg)	Diastólica (mmHg)
Óptima	< 120	< 80
Normal	< 130	< 85
Normal alta	130-139	85-89
Grado 1, hipertensión leve	140-159	90-99
Subgrupo: limítrofe	140-149	90-94
Grado 2, hipertensión moderada	160-179	100-109
Grado 3, hipertensión severa	≥ 180	≥ 110
Hipertensión sistólica aislada	≥ 140	< 90
Subgrupo: limítrofe	140-149	< 90

La presión arterial es producto tanto del gasto cardíaco como de la resistencia vascular sistémica, por lo tanto, los factores determinantes de la presión arterial afecta al gasto cardíaco, así como a la estructura y fisiología de las arterias. La HTA perjudica muchos órganos en cuanto a su estructura y función, entre los principales órganos diana se encuentra el sistema nervioso central, arterias periféricas, corazón y riñones [48].

En el mundo, las enfermedades cardiovasculares son responsables de aproximadamente 17 millones de muertes por año, casi un tercio del total [50]. Entre ellas, las complicaciones de la hipertensión causan anualmente 9,4 millones de muertes [51]. La hipertensión es la causa de por lo menos el 45% de las muertes por cardiopatías y el 51% de las muertes por accidente cerebrovascular [50].

1.2.2 DIAGNÓSTICO

La presión arterial se basa en dos medidas, la primera es la presión arterial sistólica que se refiere a la presión en las arterias durante un latido cardíaco y la segunda corresponde a la presión arterial diastólica referida a la presión entre dos latidos [52].

La detección de la hipertensión arterial requiere de la medición de la presión arterial con una técnica apropiada que considera algunos elementos: hay que asegurarse de que el paciente haya descansado por lo menos 5 minutos antes de la medición, el paciente debe estar sentado con el brazo apoyado al nivel del corazón y sin haber fumado o consumido cafeína en los 30 minutos previos a la toma de la presión, se iniciará la medición preferentemente con un esfigmomanómetro de columna de mercurio. Se realizan 2 o más mediciones de la presión separadas aproximadamente por 2 minutos y se promedian las presiones [48].

El diagnóstico de hipertensión arterial se establece con la elevación sostenida de la presión arterial sistémica con cifras iguales o superiores de 140/90 mmHg. Es conveniente tomar la presión arterial 2 veces en cada consulta, al menos en tres consultas con un intervalo semanal como mínimo [53].

1.2.3 TRATAMIENTO

El tratamiento para la hipertensión arterial no solamente se basa en parámetros farmacológicos sino también en cambios en el estilo de vida. En el tratamiento farmacológico se utilizan inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), antagonistas de receptores de angiotensina II (ARA II), beta-bloqueadores que afectan los canales de calcio, entre otros fármacos [54, 55]

Complementariamente al tratamiento farmacológico se recomienda una alimentación con elevación en la ingesta de potasio, calcio y magnesio, la reducción del consumo de sal, de grasas saturadas [56, 57], de bebidas alcohólicas [58], cesar el consumo de cigarrillos e incrementar la actividad física [59-61].

1.3 PARTICIPACIÓN DE RECEPTORES EN ATEROSCLEROSIS

En los tres tipos celulares que participan dinámicamente en el desarrollo y progreso de la lesión celular: endotelio, monocito-macrófago y las células musculares lisas existen receptores que captan lípidos o sus derivados que contribuyen a la formación de la placa aterosclerótica [24].

Entre los receptores se encuentran receptores basurero “scavenger” (CD36 y SR-BI/II, SR-AI/II) y los miembros de la familia del receptor de LDL (rLDL) que actúan como traductores de señales intracelular y juegan un papel importante en el transporte del colesterol celular. El receptor “Low density lipoprotein receptor-related protein” LRP1 es un miembro de la familia del receptor de las LDL que se une a varios ligandos relacionados con el metabolismo de lípidos y lipoproteínas [62].

El mecanismo de entrada de colesterol hacia las células vasculares por estos receptores facilita en gran medida la formación de células espumosas en la pared vascular [24]. Si bien en el macrófago la captación de LDL modificada tiene lugar por múltiples receptores “scavenger” [63], en las células musculares lisas, la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1) es el principal receptor transmembrana multiligando [64] perteneciente a la familia de LDLR implicado en la captación de LDL modificada (LDL-mod) por agregación [65].

1.4 RECEPTOR LRP1

El receptor “Low density lipoprotein receptor-related protein” (LRP1) es una proteína que se localiza en la membrana plasmática de las células que participan en endocitosis mediada por el receptor [1], este receptor está representado en la Figura 6.

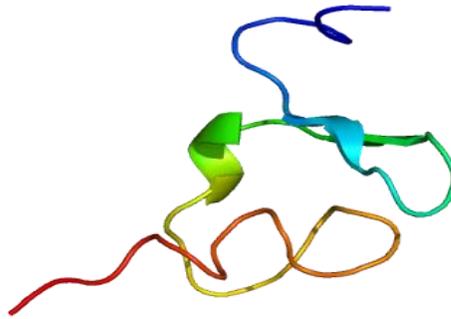


Figura 5. Receptor LRP1[66]

Esta proteína en los humanos esta codificada por el gen *LRP1* localizado en el cromosoma 12 (Figura 7) en la posición 12q13-q14, compuesto de 90 kb y comprende 89 exones[1].

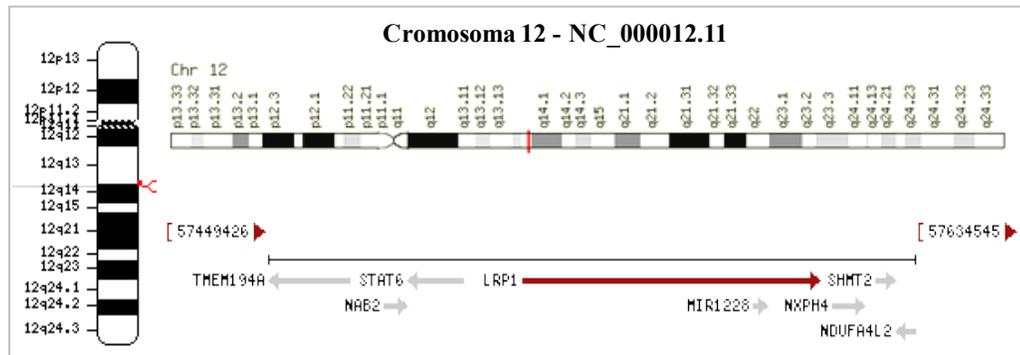


Figura 6. Localización cromosómica del gen *LRP1*[1]

Este receptor se le conoce con varios nombres: receptor de lipoproteína de baja densidad relacionado con la proteína 1 (LRP1), receptor alfa-2-macroglobulina (A2MR), receptor de apolipoproteína-E (APOER), CD91 y CED1 [67, 68].

El LRP1 se sintetiza como precursor de una glicoproteína transmembranal de 600-kD que se escinde por la furina para generar una subunidad de 515-kD alfa y una subunidad beta de 85-kD (ver Figura 8) [67, 69]. Las subunidades alfa y beta asociadas no covalentemente permanecen unidas durante el transporte del LRP1 a la membrana celular [70].

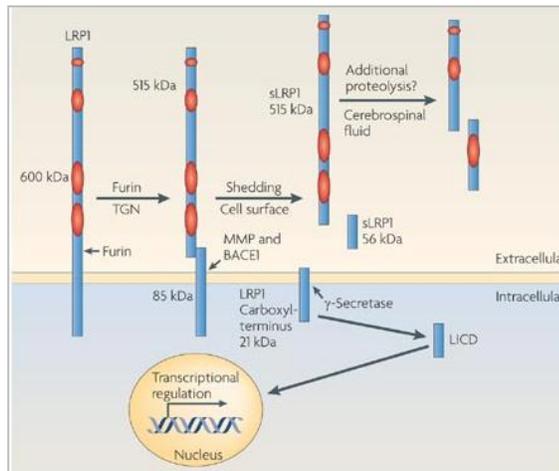


Figura 7. Síntesis de LRP1 (Nature Reviews) [71]

La proteína codificada por este gen es un receptor endocítico para más de 40 ligandos incluyendo múltiples proteasas, que participa en varios procesos celulares, incluyendo señalización intracelular, homeostasis de lípidos y aclaramiento de las células apoptóticas [67, 72]. Además, la proteína codificada es necesaria para el aclaramiento de alfa-2-macroglobulina (A2M), precursor de amiloide y beta-amiloide, principales componentes de las placas amiloides encontradas en los pacientes de Alzheimer. La expresión de este gen disminuye con la edad y se ha encontrado niveles bajos de expresión en el tejido cerebral de pacientes con Alzheimer [73].

El LRP1 tiene cinco dominios: el dominio de unión a ligando que media la unión a apoB100 y apoE, el dominio de homología para precursor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), dominio de azúcar unido a oxígeno, un dominio transmembrana que asegura el anclaje del LRP1 a la membrana plasmática.

Y un dominio citosólico que contiene la secuencia NPXY característica para interactuar con dominios de fosfotirosina de unión a proteínas celulares importantes para la endocitosis de LDL y su transporte intracelular subsecuente [74-76] (Figura 9).

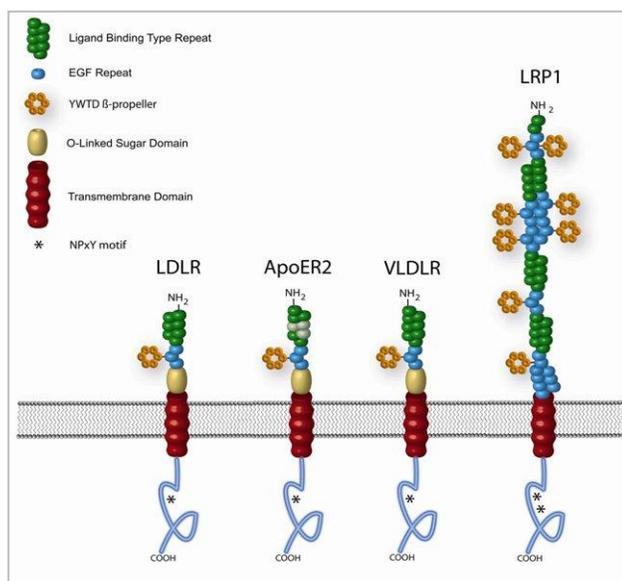


Figura 8. Receptores de la familia de las LDL y sus dominios (Rebeck, et al, 2006) [77]

Experimentalmente se ha observado que la hipercolesterolemia incrementa la expresión del *LRP1* en la pared vascular [65]. A diferencia del receptor de LDL (rLDL), el *LRP1* no se regula a la baja por el aumento de la concentración de colesterol intracelular. Aunque es claro que la expresión del *LRP1* está elevada en las placas ateroscleróticas avanzadas [64, 78], poco se conoce acerca de la sobre-regulación del *LRP1* durante la progresión de la lesión aterosclerótica.

Se ha descrito que el *LRP1* está sobre-expresado en placas ateroscleróticas tanto en modelos animales como en modelos humanos [78-80]. Además la expresión del gen *LRP1* está incrementada en células mononucleares de pacientes con obstrucción coronaria [81, 82]. En los macrófagos el *LRP1* también contribuye a la captación de LDL modificada por agregación [83, 84].

La expresión del *LRP1* en monocitos puede ser modulada por diversos factores, un grupo de investigación ha referido que la dieta mediterránea modula la expresión de diversos genes involucrados en procesos ateroscleróticos entre ellos el *LRP1*, describiendo que el consumo de aceite de oliva impide la sobreexpresión en monocitos del *LRP1* en una población con alto riesgo cardiovascular [85].

Asimismo, se ha descrito que pacientes diabéticos con un buen control de glicemia sobreexpresan genes anti-inflamatorios y anti-apoptóticos, reduciendo la progresión de aterosclerosis, por lo tanto la glicemia también modula la expresión en monocitos del *LRP1* [86]. A pesar que se ha reseñado el efecto de la angiotensina II (AngII) en la sobreexpresión del *LRP1* en células musculares lisas vasculares (CMLV) humanas [87], así como el papel que desempeña la hipercolesterolemia y la hipertensión (factores de riesgo cardiovascular) en la modulación de la expresión del *LRP1* en el miocardio [65, 87, 88], el efecto que tiene la hipertensión sobre la expresión del *LRP1* en monocitos humanos, aún no ha sido descrita.

1.5 POLIMORFISMOS DEL *LRP1*

La aterosclerosis y la hipertensión son desórdenes complejos multifactoriales que resultan de la interacción entre factores genéticos y medio ambientales [89, 90]. Los factores genéticos juegan un papel muy importante en la patogénesis de casi todas las enfermedades, tomando en cuenta que existe un gran componente genético asociado a la aterosclerosis [91, 92] y a la hipertensión [93, 94], es de consideración el análisis de variantes génicas involucradas en estas patologías.

El gen del *LRP1* se ha asociado a procesos inflamatorios [95, 96]. La inflamación es una característica molecular de la aterosclerosis [97] y de la hipertensión [98].

Se han descrito alrededor de 2214 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's) para el gen del *LRP1*, varios de estos SNP se han relacionado a diversas enfermedades como Síndrome de Alzheimer [99], esquizofrenia [100], migraña [100], deterioro cognitivo [101, 102], cáncer de seno [103], alergias alimentarias [104] y eventos cardiovasculares [105-108].

Pero existen pocos estudios que determinen la influencia de SNP de este gen en la aterosclerosis y la hipertensión, y no existe ningún estudio en población mexicana.

Para distinguir al SNP y su asociación con enfermedades similares a HTA, se seleccionaron 5 polimorfismos de acuerdo al alelo menos frecuente (AMF) que se detallan en la Tabla 3.

Tres polimorfismos se encuentran en región intrónica, el SNP rs11172113 entre los exones 1 y 2, el rs1466535 entre los exones 2 y 3, el rs1800164 entre los exones 83 y 84 y dos polimorfismos en región exónica, el rs1800194 en el exón 22 y el rs1140648 en el exón 61 estos 2 SNP son sinónimos.

Tabla 3. Polimorfismos seleccionados

SNP	Cambio de Nucleótido	Consecuencia funcional	Alelo Ancestral	Localización (chr 12)	Localización	AMF
rs11172113 c.67+4469 T>C	T>C	Mutación silenciosa	C	57133500	Intrónica (exon1-2)	C=0,389
rs1466535 c.191-687 G>A	G>A	Mutación silenciosa	C	57140687	Intrónica (exón 2 y 3)	A=0,272
rs1800194 c.3546 C>T	TGC>TGT	Cys>Cys	C	57173979	Exón 22	T=0,405
rs1140648 c.9783G>A	ACA>ACG	Thr>Thr	G	57199318	Exón 61	G=0,452
rs1800164 c.12916+140A>G	A>G	Mutación silenciosa	A	57211019	Intrónica (exón 83 y 84)	G=0,494

SNP: polimorfismo de un solo nucleótido; C:citosina; T:timina; A:adenina; G:guanina; Cys: cisteína; Thr:treonina, AMF: alelo menos frecuente.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La aterosclerosis actualmente es considerada una enfermedad de salud pública por su comportamiento silencioso y su estrecha relación con la enfermedad arterial coronaria, que constituye la primera causa de muerte en México (INEGI, 2010). Esto ha generado desde hace mucho tiempo el interés de estudiar con mayor detenimiento y profundidad diversos factores asociados a patologías cardíacas.

El interiorizar en el estudio de la aterosclerosis desde el punto de vista bioquímico y genético proporcionará una visión de lo que sucede a nivel fisiológico y clínico, a su vez se podrá analizar y valorar la repercusión a nivel social y económico.

El propósito de estudiar la aterosclerosis como enfermedad de salud pública desde un foco bioquímico-genético es contribuir al estudio tanto en la desaceleración de la progresión de la enfermedad como en la prevención de la misma y proporcionar a largo plazo una mejor calidad de vida en la población.

Muchos estudios se han enfocado en buscar marcadores pronósticos y diagnósticos, así como también el estudio de diversos factores de riesgo, que permitan abordar de una mejor manera a la enfermedad. Un posible marcador es el receptor LRP1, a pesar de que se ha descrito el papel que desempeña en el proceso aterosclerótico, el efecto que tiene la hipertensión (factor de riesgo) sobre el LRP1 aún no es del todo claro. Por lo que se considera de suma importancia investigar la función que desempeña el LRP1 sobre la aterosclerosis en pacientes con hipertensión arterial.

JUSTIFICACIÓN

La investigación epidemiológica en los últimos años ha establecido un incremento en el número de factores de riesgo comunes en pacientes que presentan enfermedad cardiovascular [116]. La presencia de uno o varios de estos factores incrementa la incidencia de enfermedad arterial coronaria (EAC) y promueve la manifestación de la enfermedad a una edad temprana, una vez que la patología aterosclerótica es clínicamente aparente contribuyen a acelerar su progresión [116, 117].

La hipertensión arterial (HTA) es un factor de riesgo de EAC, cuya importancia ha sido demostrada en diversas poblaciones y su prevalencia mundial es muy alta [42]. La HTA se caracteriza por un aumento en la resistencia vascular periférica, esta alteración en la presión arterial favorece al desarrollo de EAC [54]. La EAC ocupa actualmente los primeros lugares de causas de morbilidad y mortalidad en México con un 25% de las muertes registradas [118], afectando principalmente a las personas de edad adulta. Los cambios estructurales pueden ser un fenómeno de adaptación, en el cual la pared arterial se engruesa en respuesta al aumento en la presión arterial [119] y como consecuencia, la hipertensión predispone al individuo a enfermedades cardiovasculares como: infarto al miocardio, accidente vascular cerebral, falla renal y aceleración de la aterosclerosis [120, 121].

Debido a que el LRP1 se une a varios ligandos incluyendo lipoproteínas nativas y/o modificadas, es un receptor sumamente importante en la captación e internalización de las LDLs responsables de la formación de células espumosas derivadas de macrófagos y células musculares lisas [84, 86].

La utilización de monocitos para el estudio clínico de la expresión del *LRP1* se justifica por su papel crucial en el proceso inicial de la aterosclerosis, debido a que las lesiones ateroscleróticas comienzan con una adhesión de los monocitos que migran a la pared arterial como una respuesta inflamatoria a la acumulación de LDL modificadas [126].

Además tiene la ventaja de que estas células debido a su fácil acceso y a su extracción no invasiva pueden utilizarse como herramienta diagnóstica [127]. La accesibilidad de las células mononucleares circulantes las hace muy útiles en la búsqueda de biomarcadores de enfermedad cardiovascular [127, 128].

Por lo anterior, el estudio de los mecanismos de la expresión *LRPI* por diferentes factores pro-aterogénicos como la hipertensión arterial servirá para entender la regulación transcripcional de este importante receptor, y permitirá una detección temprana y una mejor estratificación del riesgo cardiovascular, con lo que el clínico puede actuar de manera inmediata enfocándose en un tratamiento preventivo evitando el desarrollo y/o complicaciones de estas patologías.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación entre el engrosamiento de la íntima media arterial y la hipertensión arterial a través de la expresión específica del LRP1 en monocitos humanos de sangre venosa de pacientes mexicanos con hipertensión y el análisis de sus polimorfismos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer la asociación de la expresión del receptor LRP1 y el grosor de la íntima media (GIM) en pacientes con hipertensión arterial.
2. Establecer si existe una correlación entre las 5 variantes genéticas seleccionadas del *LRP1* con los niveles de expresión del LRP1 en pacientes con hipertensión arterial.
3. Buscar asociaciones entre los distintos polimorfismos del *LRP1* con los parámetros clínicos y bioquímicos.
4. Comparar las frecuencias genotípicas y alélicas del gen *LRP1* de la población mexicana con otras poblaciones previamente reportadas.

4.3 HIPÓTESIS

Si el receptor LRP1 modula la respuesta inflamatoria asociada con la hipertensión y el GIM; se espera encontrar en los pacientes hipertensos un GIM aumentado, una sobreexpresión del LRP1 en los monocitos extraídos de sangre periférica, así como también una alta frecuencia del alelo menor en cada una de las 5 variantes estudiadas.

METODOLOGÍA

5.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

Estudio de casos y controles

5.2 TAMAÑO DE MUESTRA

El tamaño de la muestra fue calculado de acuerdo a proporciones de muestras independientes tomando en consideración una incidencia del gen LRP1 aproximadamente de 0.08 en los casos y de 0.02 en los controles con una $\Delta=0.06$, con un poder estadístico del 95% $p<0.05$.

$$n = \frac{p_o q_o \left[z_{\alpha} + z_{\beta} \sqrt{\frac{p_i q_i}{p_o q_o}} \right]^2}{(p_i - p_o)^2}$$

N= 79 sujetos

5.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

Se estudiaron a 201 sujetos que acudieron a consulta externa en el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, de los cuales 91 fueron normotensos y 110 hipertensos.

5.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN

5.4.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

A) GRUPO CONTROL

- Presión normal hasta 120/80mmHg.
- Ser mexicano de nacimiento.
- Estar de acuerdo en participar en el protocolo de investigación.

B) GRUPO HIPERTENSOS

- Presión arterial >140/90mmHg.
- Ser mexicano de nacimiento.
- Estar de acuerdo en participar en el protocolo de investigación.

5.4.2 CRITERIOS DE EXCLUSION

A) GRUPO CONTROL

- Tener antecedentes de enfermedad cardiovascular.
- Tener diabetes tipo 1 o diabetes tipo 2.
- Padecer alguna enfermedad crónica degenerativa.

B) GRUPO DE HIPERTENSOS

- Estar bajo tratamiento con medicamentos hipolipemiantes.
- Tener diabetes tipo 1 o diabetes tipo 2.
- Padecer alguna enfermedad crónica degenerativa.

5.4.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Volumen de sangre total insuficiente.
- Muestras hemolizadas.
- Cantidad de (monocitos) menor a 2×10^6 células en 10 ml de sangre.
- Cantidad de RNA y proteína insuficiente.

5.5 VARIABLES

- | | |
|---------------------------------|-----------------------------|
| • Género | • Colesterol total |
| • Edad | • Triglicéridos |
| • Peso | • Colesterol-HDL |
| • Estatura | • Colesterol-LDL |
| • Índice de masa corporal (IMC) | • Angiotensina II |
| • Presión arterial | • Expresión del <i>LRPI</i> |
| • Íntima media arterial | |

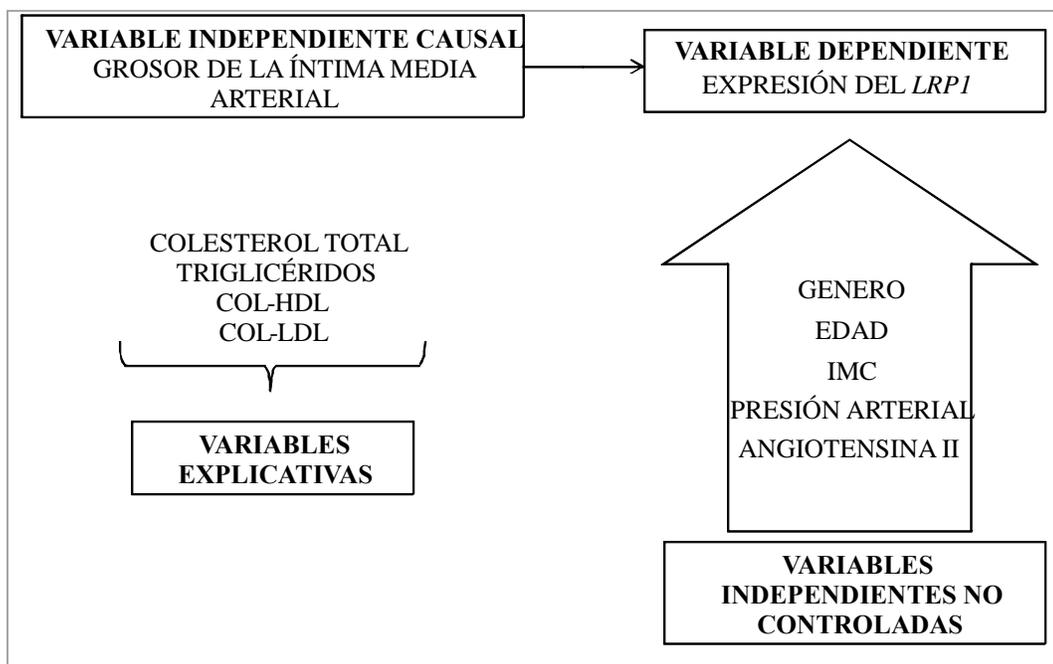
5.6 DEFINICIÓN DE VARIABLES

- **Género:** el del nombre que puede ser acompañado por atributos femeninos y que no es común ni epiceno. Lo mismo con los atributos masculinos.
- **Edad:** tiempo que una persona ha vivido, a contar desde que nació.
- **Peso:** peso corporal en kg de una persona.
- **Estatura:** altura en cm de una persona desde los pies a la cabeza.
- **Índice de Masa Corporal (IMC):** fórmula que calcula la grasa corporal a través del peso y de la altura.
- **Presión Arterial:** presión que ejerce la sangre circulante sobre las paredes de los vasos sanguíneos.
- **Grosor de la íntima media arterial:** corresponden a los límites de interfaz lumen-íntima y media-adventicia.
- **Colesterol total:** concentración de colesterol total en sangre.
- **Triglicéridos:** concentración de triglicéridos en sangre.
- **Colesterol-HDL:** concentración de colesterol en las lipoproteínas de alta densidad en sangre.
- **Colesterol-LDL:** concentración de colesterol en las lipoproteínas de baja densidad en sangre.
- **Angiotensina II:** concentración de angiotensina II en sangre.
- **Expresión LRP1:** expresión del gen LRP1 representa la información codificada por los ácidos nucleicos que se está transformando en proteína.

La Tabla 4 muestra la definición y la operacionalización de las variables implicadas en el estudio, por otro lado en el Cuadro 1 se puede apreciar la interrelación de las variables que proporcionan una orientación adecuada para la investigación.

Tabla 4. Definición y operacionalización de variables

VARIABLE	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN	INDICADOR	ESCALA
GÉNERO	Esta dado por atributos femeninos y que no es común ni epiceno. Lo mismo con los atributos masculinos.	Masculino Femenino	% de pacientes varones % de pacientes mujeres	Cualitativo
EDAD	Tiempo que una persona ha vivido, a contar desde que nació.	Años	Promedio de edad	Cuantitativo
INDICE DE MASA CORPORAL (IMC)	El IMC (índice de masa corporal) es una fórmula que calcula la grasa corporal a través del peso y de la altura	19-25 kg/m ² 26-30 kg/m ² 31-35 kg/m ² 36-40 kg/m ² ≥ 40kg/m ²	% pacientes normal % pacientes con sobrepeso % pacientes con obesidad grado I % pacientes con obesidad grado II % pacientes con obesidad mórbida	Cuantitativo
PRESION ARTERIAL	Presión que ejerce la sangre circulante sobre las paredes de los vasos	Norma: 120/80 Prehipertensión: 120-139/80-89 HTA grado 1: 140-150/90-99 HTA grado 2: >160/>100mmHg	Presión arterial de cada persona. Promedio de la presión arterial en la comunidad	Cuantitativo
GROSOR DE LA ÍNTIMA MEDIA	Límites de interfaz lumén-íntima y media-adventicia.	Normal: hasta 1,5mm	% de pacientes con grosor de íntima media normal y alto	Cuantitativo
COLESTEROL TOTAL	Concentración de colesterol en sangre	Hasta 200 mg/dl	% de pacientes con concentración de colesterol normal % de pacientes con colesterol alto	Cuantitativo
TRIGLICÉRIDOS	Concentración de triglicéridos en sangre	Hasta 150 mg/dl	% de pacientes con concentración de colesterol normal	Cuantitativo
c-HDL	Concentración de Colesterol-HDL en sangre	Normal: ≥ 40 mg/dl	% de pacientes con concentración de col-HDL normal, bajo y alto	Cuantitativo
c-LDL	Concentración de Colesterol-LDL en sangre	Normal: hasta 130 mg/dl	% de pacientes con concentración de col-LDL normal, bajo y alto	Cuantitativo
ANGIOTENSINA II	Concentración de angiotensina II en sangre	Normal: 0,01 -0,25 pmol/ml	% de pacientes con concentración de angiotensina II normal, bajo y alto	Cuantitativo
EXPRESIÓN <i>LRPI</i>	Es la expresión del gen de acuerdo a la cantidad de RNAm y de proteína		% de expresión del Gen <i>LRPI</i> RNAm y proteína	Cuantitativo



Cuadro 1. Interrelación de variables

5.7 DISEÑO EXPERIMENTAL

5.7.1 TOMA DE MUESTRA

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción venosa de todos los sujetos, después de 12 horas de ayuno en tubos con ácido etilendiaminotetracético sódico (EDTA-Na) y sin aditivo. De un tubo con EDTA-Na inmediatamente se separó el plasma mediante centrifugación para la determinación del perfil lipídico; de otros 3 tubos se hizo la separación de monocitos. De otro tubo se obtuvo la fase leucocitaria para la extracción de DNA.

5.7.2 DETERMINACIONES ANTROPOMÉTRICAS ESTANDARIZADAS

A) ESTATURA

La estatura se determinó en metros (m), se realizó con un tallímetro Healht o meter (Bridgeview, Illinois, USA. Patent: 4,083,4184,196,521) calibrado. Se utilizó como referencia el plano de Frankfort (borde inferior de la órbita del ojo en el mismo plano horizontal que el meato auditivo externo, formando un ángulo de 90°).

Para esta determinación las personas permanecieron descalzas y sin medias, manteniéndose de pie de manera que sus talones, glúteos y cabeza estaban en contacto con la superficie del tallímetro.

El ángulo del tallímetro se deslizó hasta tocar la cabeza aplicando una firme pero suave tracción hacia arriba a nivel de la apófisis mastoides, evitando que levanten los talones.

B) PESO

El peso se determinó en kilogramos, la persona estaban en ropa interior (luego se determinó el peso de la ropa interior para sustraerlo individualmente antes de procesar los datos), para efecto se utilizó una balanza Health o meter (USA. Patent 4,083,418 4,196,521) debidamente calibrada.

C) PRESIÓN ARTERIAL

La presión arterial se determinó con un esfigmomanómetro de columna de mercurio marca Tyco modelo DS44 (SN 080508143361) de Welch Allyn y un estetoscopio profesional de Welch Allyn (REF. 5079-135). La técnica de toma se basó en las recomendaciones del “VII Comité Nacional Conjunto para la Prevención, Detección, Evaluación y Tratamiento de Hipertensión Arterial” (VII JNC): en donde el paciente debe permanecer en reposo como mínimo 5 minutos, sentado en una silla con espaldar.

El manguito del tensiómetro (ancho para adulto) cubrió gran parte del brazo. El brazalete se coloca de tal manera que la parte inflable cubra perfectamente a la arteria humeral del brazo derecho; el acoplamiento fue correcto sin prendas de vestir interpuestas. Se colocó el brazalete a 4cm por encima del pliegue del codo, se palpó el pulso de la arteria humeral donde se colocó la membrana del estetoscopio a 2cm sobre el pliegue del codo y el manguito se insufló con suficiente presión para ocluir por completo a la arteria, luego se desinfló a una velocidad de unos 2-3mmHg/seg.

Se determinó la presión por el método auscultatorio. Se registró como presión sistólica al inicio de la fase I de la escala de Korotkoff y como presión diastólica al final de la fase V. Se efectuó una sola determinación, pero se repite a los 10 minutos en los casos que supera 140/90 mmHg. Se utilizó como valor de corte una presión sistólica ≥ 140 mmHg y/o una presión diastólica ≥ 90 mm Hg (22).

D) ÍNDICE DE MASA CORPORAL

El IMC se calculó mediante la fórmula:

$$\text{IMC} = \frac{\text{Peso [Kg]}}{(\text{Estatura})^2 [\text{m}^2]}$$

5.7.3 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

Las concentraciones de colesterol total y triglicéridos (CT y Tg) en sangre se determinaron por métodos enzimáticos colorimétricos comerciales. El c-HDL se midió en el sobrenadante después de haber precipitado a las lipoproteínas que contenían Apo B, por el método de precipitación con fosfotungstato de magnesio. El c-LDL se calculó con la fórmula de Friedewald (1972). Los niveles de Ang II se determinaron mediante electroforesis capilar [122].

5.7.4 MEDICIÓN DE LA ÍNTIMA MEDIA ARTERIAL

La determinación del grosor de la íntima media (GIM) de la arteria carótida de los sujetos control y de los sujetos con hipertensión con y sin tratamiento se realizó por ultrasonografía. El escaneo y la medición de las arterias carótidas fueron realizadas por un médico especializado en sonografía, se utilizó un transductor con una resolución lateral y axial. Las placas se definieron como engrosamientos focales de GIM con una altura ≥ 1.2 mm o superior al 50% del GIM adyacente.,

Se realizó una exploración en los tres segmentos principales de las arterias carótidas extracraneales: arteria carótida común, bifurcación carotidea y arteria carótida interna tanto del lado derecho como del izquierdo. El valor del GIM se determinó con el promedio de cada segmento en ambos lados. Se realizaron cinco mediciones a 1cm en el extremo proximal de la carótida interna. Además se evaluó la presencia de placa en bulbo, y en los segmentos de la carótida interna.

5.7.5 SEPARACIÓN DE MONOCITOS

Para la obtención de monocitos se utilizó sangre total recolectada en tubos con EDTA-Na después de 12 horas de ayuno. Los monocitos se obtuvieron a partir de la capa leuco-plaquetaria que se generó después de la centrifugación de sangre total entre el plasma y eritrocitos (Anexo 1)

5.7.6 EXTRACCIÓN DE RNA Y PROTEÍNA Y ANALISIS DE WESTERN BLOT

El RNA total se extrajo de los monocitos utilizando el reactivo Tripure™ (Roche Molecular Biochemicals) y posteriormente se realizó una retrotranscripción con 1ug de RNA total para la síntesis de cDNA siguiendo el protocolo del kit “HighCapacity cDNA Reverse Transcription” (Applied Biosystems), el cDNA se guardó a -20°C.

La expresión génica del *LRP1* (Hs00233899_m1) y *HPRT* (Hs99999909_m1) (gen endógeno) se cuantificaron usando un ensayo comercial “TaqMan Gene Expression” en el equipo 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Las condiciones de ciclaje fueron 2min a 50°C y 10min a 95°C seguidos por 40 ciclos de 15s a 95°C y 1min a 60°C. Los niveles de expresión se determinaron por duplicado y se normalizaron por el gen endógeno. La proteína total fue extraída de los monocitos utilizando el reactivo TriPure™ (Roche Molecular Biochemicals). Las proteínas se analizaron por inmunoelectrotransferencia (Western-blot). Las membranas se incubaron con un anticuerpo primario monoclonal contra LRP1 humano (cadena β 85kDa). Se utilizó el programa QuantityOne para cuantificar las bandas presentes en las membranas

5.7.7 EXTRACCIÓN DE DNA

La extracción de DNA se realizó mediante la técnica de expulsión salina [123] (Anexo 2).

5.7.8 DETERMINACIÓN GENOTÍPICA DEL LRP1

Se analizaron cinco polimorfismos mediante amplificación por PCR en Tiempo Real en el equipo BioRad Real Time PCR CFX-96 System, la Tabla 5 muestra las sondas utilizadas para cada polimorfismo.

Se utilizó una concentración de DNA de 10ng/ul, donde las condiciones de amplificación fueron:

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

Tabla 5. Sondas de amplificación para cada polimorfismo del *LRP1*

SNP	Fluorocromo	Sondas
rs11172113	VIC	TGTCTGAGCCTCAGGAAAGAGCCAC C GGGCAACACCCAAAATACAAAAAT
	FAM	TGTCTGAGCCTCAGGAAAGAGCCAC T GGGCAACACCCAAAATACAAAAAT
rs1466535	VIC	GGGAAGCAGGGTCCATGGCAGAGAAA C TCCAATGATAAAGAAAACTCCTTC
	FAM	GGGAAGCAGGGTCCATGGCAGAGAAA T TCCAATGATAAAGAAAACTCCTTC
rs1800194	VIC	ACGGCTCAGATGAGGGCGAGCTCTG C GGTGAGGCCTGGTCCCAGGAGAAGG
	FAM	ACGGCTCAGATGAGGGCGAGCTCTG T GGTGAGGCCTGGTCCCAGGAGAAGG
rs1140648	VIC	CCATTAACCGAGCCACAAGACCAC A GGCACCAACAAAACGCTCCTCATC
	FAM	CCATTAACCGAGCCACAAGACCAC G GGCACCAACAAAACGCTCCTCATC
rs1800164	VIC	GGCCTTATGCAGCTGAGCCAGGCC A AGCTGCTGGCGCTTCCCCACAAAGG
	FAM	GGCCTTATGCAGCTGAGCCAGGCC G AGCTGCTGGCGCTTCCCCACAAAGG

5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados en el programa SPSS versión 19 (SPSS Inc. Chicago USA), se realizó un análisis descriptivo de todas las variables. Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar (DS). La comparación entre grupos se realizó mediante la prueba de t de Student para variables continuas. El análisis de correlación fue realizado de acuerdo a Pearson. Las frecuencias genotípicas se expresaron como porcentajes. La fuerza de las asociaciones se calculó como riesgo relativo por el método de Woolf, razón de momios (OR), para lo cual se realizó una tabla de contingencia de 2 X 2, también se realizó la prueba de chi cuadrado (χ^2) para determinar la significancia estadística de las asociaciones. Un valor de $P < 0.05$ fue considerado significativo.

RESULTADOS

6.1 DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN

Se estudió una población de 201 mexicanos que acudieron a consulta externa del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” y que cumplieron con los criterios de inclusión, de los cuales 91 fueron normotensos (NT) y 110 hipertensos (HT).

La Tabla 6 muestra las principales características clínicas de normotensos e hipertensos. Se encontró una diferencia significativa en el grupo de normotensos vs hipertensos en edad (46.0 ± 11.35 vs 50.36 ± 11.57 ; $P=0.007$), así como en el IMC (26.92 ± 4.06 vs 29.36 ± 3.77 ; $P=0.000$) siendo más alto en hipertensos. El valor de la media de CT está dentro del valor de referencia muy cercano al límite superior en ambos grupos de estudio y el valor de TG fue mayor en hipertensos aunque estadísticamente estos parámetros no fueron significativos.

El grupo de hipertensos con respecto a los normotensos presentaron niveles bajos de c-HDL (46.66 ± 13.59 vs 52.51 ± 13.25 ; $P=0.002$), niveles altos en los índices c-LDL/c-HDL (2.76 ± 0.91 vs 2.36 ± 0.84 ; $P=0.001$), en CT/HDL (4.50 ± 1.26 vs 3.96 ± 1.20 ; $P=0.003$), en TG/HDL (4.65 ± 3.21 vs 3.62 ± 2.73 ; $P=0.017$), en angiotensina II (0.226 ± 0.12 vs 0.1950 ± 0.09), en LRP1 proteína (18.34 ± 15.49 vs 6.30 ± 9.62 ; $P=0.000$), en LRP1 RNAm (6.54 ± 8.59 vs 2.87 ± 2.72 ; $P=0.002$), en GIM promedio (0.679 ± 0.16 vs 0.587 ± 0.16 ; $P=0.002$) y en GIM máximo (0.751 ± 0.18 vs 0.664 ± 0.17 ; $P=0.008$).

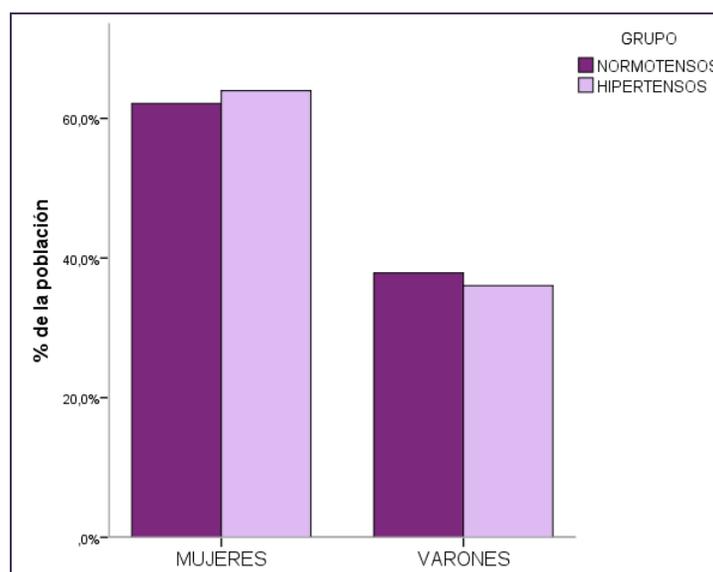
Se realizó una distribución de la población total por género donde el 63.1% fueron mujeres y el 36.9% varones. En esta población el 19.8% de normotensos y el 44.1% de hipertensos presentaron obesidad. Así también, el 32.9% de las mujeres y el 30.2% de los varones presentaron obesidad.

En la Gráfica 1 se muestra la distribución de los dos grupos de estudio por género, para el grupo de normotensos las mujeres representaron el 62.1% y los varones el 37.9%; mientras que para hipertensos las mujeres representan el 64.0% y los varones el 36.0%.

Tabla 6. Características clínicas de la población expresadas como valores de media±DS y en porcentaje

VARIABLES	NORMOTENSOS	HIPERTENSOS	P Valor
Edad (años)	46.0±11.35	50.36±11.57**	0.007
IMC (kg/m ²)	26.92±4.06	29.36±3.77***	0.000
Colesterol Total (mg/dl)	197.32±40.41	198.91±37.42	0.772
Triglicéridos (mg/dl)	166.56±94.45	192.95±98.43	0.055
c-HDL (mg/dl)	52.51±13.25	46.66±13.59**	0.002
c-LDL (mg/dl)	117.02±33.20	122.23±31.74	0.258
LDL/HDL	2.36±0.84	2.76±0.91***	0.001
Colesterol No HDL	144.80±41.28	152.67±36.54	0.154
Glucosa (mg/dl)	89.36±7.78	89.18±8.91	0.877
CT/HDL	3.96±1.20	4.50±1.26**	0.003
TG/HDL	3.62±2.73	4.65±3.21*	0.017
PAS (mmHg)	110.17±9.59	135.13±16.81***	0.000
PAD (mmHg)	71.58±7.884	86.88±12.36***	0.000
Angiotensina II (pmol/ml)	0.195±0.09	0.226±0.12*	0.046
LRP1 Proteína	6.30±9.62	18.34±15.49***	0.000
LRP1 RNA	2.87±2.72	6.54±8.59**	0.002
GIM.PROM	0.587±0.16	0.679±0.16**	0.002
GIM.MAX	0.664±0.17	0.751±0.18**	0.008

*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. Los datos se expresan como media±DS, IMC: índice de masa corporal, PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica, GIM.PROM: grosor íntima-media promedio, GIM.MAX: grosor íntima media máximo, c-HDL: colesterol de lipoproteínas de alta densidad, c-LDL: colesterol de lipoproteínas de baja densidad.



Gráfica 1. Distribución de la población normotensa e hipertensa por género

Se realizó un análisis descriptivo de las características clínicas de la población y se encontró que el grupo de hipertensos tiene una mayor prevalencia de obesidad y de dislipidemia en relación al grupo de normotensos (Tabla 7).

Tabla 7. Parámetros clínicos de riesgo para Hipertensión

	NORMOTENSOS	HIPERTENSOS	P valor
Obesidad %	19.8	44.1***	0.000
Hipercolesterolemia %	44.0	54.5	0.136
Hipertrigliceridemia %	42.7	57.3*	0.029
c-HDL bajo %	16.5	32.7***	0.000
c-LDL alto %	34.1	44.5	0.132

*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. Los datos se expresan como porcentaje. c-HDL: colesterol de lipoproteínas de alta densidad, c-LDL: colesterol de lipoproteínas de baja densidad

Al hacer el análisis descriptivo de las características clínicas por género se encontró que los varones normotensos presentan mayor prevalencia de obesidad, y que los varones tanto normotensos como hipertensos presentan una mayor prevalencia de c-HDL bajo en comparación a las mujeres.

Al comparar entre mujeres normotensas vs hipertensas se encontró que las hipertensas presentan mayor prevalencia de obesidad (P=0.000) y de c-HDL bajo (P=0.014). Al comparar entre varones normotensos vs hipertensos, los hipertensos presentan una prevalencia mayor en c-HDL bajo (P=0.000) (Tabla 8).

Tabla 8. Parámetros clínicos de riesgo para Hipertensión por género

	MUJERES (NT)	VARONES (NT)	P valor (a)	MUJERES (HT)	VARONES (HT)	P valor (b)
Obesidad %	18.2	22.6*	0.022	47.7 ^c	37.8	0.826
Hipercolesterolemia %	40.0	50.0	0.353	52.1	59.0	0.494
Hipertrigliceridemia %	36.4	50.0	0.201	50.7	69.2	0.061
c-HDL bajo %	9.1	27.8**	0.001	18.3 ^c	59.0*** ^d	0.000
c-LDL alto %	41.7	34.1	0.201	42.3	48.7	0.518

*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. Los datos se expresan como porcentaje. NT: normotensos, HT: hipertensos; a: mujeres normotensas vs varones normotensos; b: mujeres hipertensas vs varones hipertensos; c: mujeres normotensas vs mujeres hipertensas; d: varones normotensos vs varones hipertensos.

La Tabla 9 muestra las características clínicas de hombres y mujeres en los dos grupos de estudio. Se realizó la comparación entre mujeres y varones dentro de cada uno de los grupos de estudio. En el grupo de normotensos los varones presentaron valores más altos en comparación a mujeres con una diferencia estadísticamente significativa en TG, LDL/HDL, Colesterol No HDL, Glucosa, CT/HDL, TG/HDL, PAD, GIM promedio y en GIM máximo; únicamente en c-HDL las mujeres presentaron valores más altos que los varones. En el grupo de hipertensos, los varones presentaron valores más altos en comparación a las mujeres con diferencia estadísticamente significativa en TG, c-HDL, LDL/HDL, CT/HDL, TG/HDL; únicamente en c-HDL las mujeres presentaron valores más altos que los varones.

La Tabla 10 muestra la comparación entre normotensos e hipertensos por género, al comparar a mujeres normotensas vs hipertensas se obtuvo que las hipertensas presentaron valores más altos con diferencia estadísticamente significativa en edad, IMC, LDL/HDL, CT/HDL, TG/HDL, PAS, PAD, LRP1 proteína, LRP1 RNAm, GIM promedio y máximo, únicamente en c-HDL las mujeres normotensas presentaron valores más elevados.

En el caso de los varones, los hipertensos presentaron valores más altos en relación a normotensos con diferencia estadísticamente significativa en IMC, LDL/HDL, CT/HDL, PAS, PAD y en LRP1 proteína, únicamente en c-HDL los varones normotensos presentaron valores más elevados que los hipertensos.

Tabla 9. Características clínicas de la población por género; Comparación entre mujeres y varones dentro del mismo grupo expresadas como valores de media±DS y en porcentaje.

VARIABLES	MUJERES (NT)	VARONES (NT)	P valor	MUJERES (HT)	VARONES (HT)	P Valor
Edad (años)	44.71±11.63	48.22±10.64	0.141	50.97±10.76	49.24±12.98	0.461
IMC (kg/m ²)	26.43±4.65	27.79±2.57	0.136	29.11±3.95	29.78±3.42	0.389
Colesterol Total (mg/dl)	191.78±32.32	205.78±49.66	0.106	197.80±37.59	200.93±37.50	0.677
Triglicéridos (mg/dl)	147.50±74.17	195.68±114.05*	0.016	172.90±72.86	229.46±126.06**	0.003
c-HDL (mg/dl)	54.82±13.29	48.98±12.57*	0.039	50.07±14.60	40.44±8.73***	0.000
c-LDL (mg/dl)	113.40±26.90	122.54±40.83	0.201	120.62±31.35	125.15±32.65	0.477
LDL/HDL	2.17±0.66	2.64±1.01**	0.009	2.54±0.83	3.18±0.91***	0.000
Col.No HDL	136.95±31.87	156.80±50.70*	0.024	148.38±35.99	160.48±36.70	0.097
Glucosa (mg/dl)	87.93±7.54	91.64±7.72*	0.022	89.23±9.44	89.07±8.00	0.928
CT/HDL	3.66±0.92	4.43±1.42**	0.002	4.14±1.06	5.15±1.34***	0.000
TG/HDL	3.03±2.14	4.52±3.27**	0.010	3.81±2.12	6.17±4.21***	0.000
PAS (mmHg)	108.94±9.40	113.26±9.60	0.097	135.58±18.07	134.29±14.46	0.722
PAD (mmHg)	70.40±6.53	74.58±10.15*	0.049	87.08±14.08	86.50±8.55	0.827
Angiotensina II (pmol/ml)	0.200±0.09	0.186±0.09	0.468	0.220±0.11	0.238±0.14	0.482
LRP1 Proteína	6.53±11.87	5.97±4.98	0.826	19.16±16.44	16.50±13.75	0.579
LRP1 RNA	3.05±2.75	2.55±2.69	0.482	8.10±9.97	3.63±3.94	0.105
GIM.PROM	0.553±0.14	0.683±0.17*	0.014	0.672±0.14	0.692±0.19	0.603
GIM.MAX	0.625±0.16	0.771±0.17**	0.010	0.740±0.15	0.775±0.23	0.417

*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. Los datos se expresan como media±DS, IMC: índice de masa corporal, PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica, GIM.PROM: grosor íntima-media promedio, GIM.MAX: grosor íntima-media máximo, c-HDL: colesterol de lipoproteínas de alta densidad, c-LDL: colesterol de lipoproteínas de baja densidad.

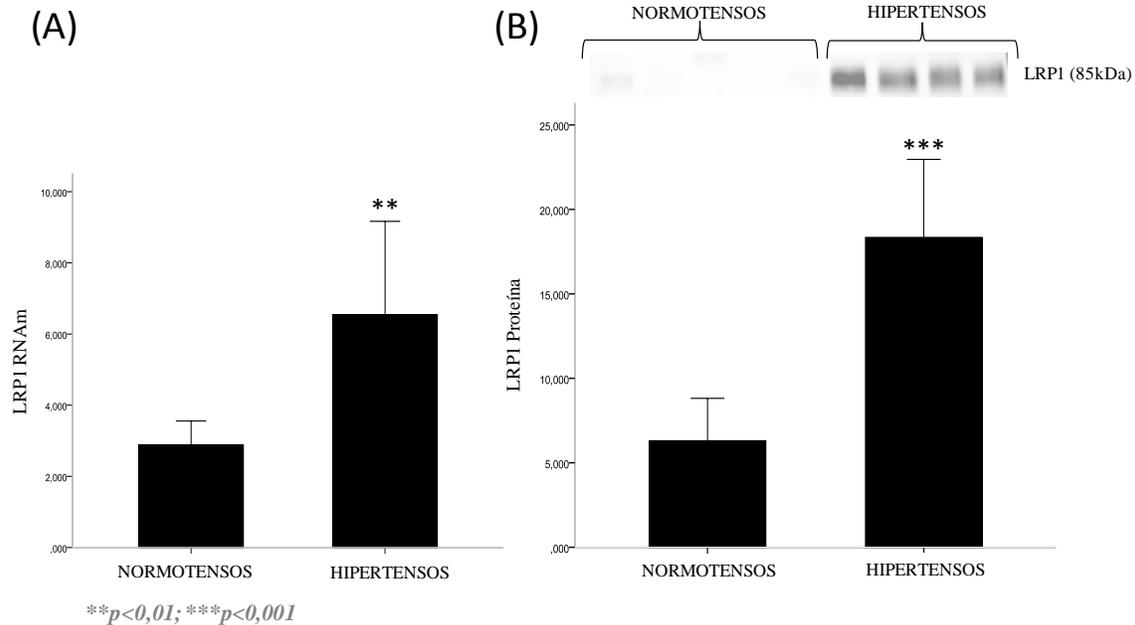
Tabla 10. Características clínicas de la población por género; Comparación de mujeres y varones entre los dos grupos de estudio expresadas como valores de media±DS y en porcentaje

VARIABLES	MUJERES (NT)	MUJERES (HT)	P valor	VARONES (NT)	VARONES (HT)	P valor
Edad (años)	44.71±11.63	50.97±10.76**	0.002	48.22±10.64	49.24±12.98	0.715
IMC (kg/m ²)	26.43±4.65	29.11±3.95***	0.001	27.79±2.57	29.78±3.42**	0.010
Colesterol Total (mg/dl)	191.78±32.32	197.80±37.59	0.345	205.78±49.66	200.93±37.50	0.633
Triglicéridos (mg/dl)	147.50±74.17	172.90±72.86	0.057	195.68±114.05	229.46±126.06	0.229
c-HDL(mg/dl)	54.82±13.29	50.07±14.60	0.062	48.98±12.57	40.44±8.73***	0.001
c-LDL (mg/dl)	113.40±26.90	120.62±31.35	0.176	122.54±40.83	125.15±32.65	0.760
LDL/HDL	2.17±0.66	2.54±0.83**	0.009	2.64±1.01	3.18±0.91*	0.020
Col.No HDL	136.95±31.87	148.38±35.99	0.066	156.80±50.70	160.48±36.70	0.718
Glucosa (mg/dl)	87.93±7.54	89.23±9.44	0.392	91.64±7.72	89.07±8.00	0.159
CT/HDL	3.66±0.92	4.14±1.06**	0.008	4.43±1.42	5.15±1.34*	0.028
TG/HDL	3.03±2.14	3.81±2.12*	0.044	4.52±3.27	6.17±4.21	0.064
PAS (mmHg)	108.94±9.40	135.58±18.07***	0.000	113.26±9.60	134.29±14.46***	0.000
PAD (mmHg)	70.40±6.53	87.08±14.08***	0.000	74.58±10.15	86.50±8.55***	0.000
Angiotensina II (pmol/ml)	0.200±0.09	0.220±0.11	0.297	0.186±0.09	0.238±0.14	0.069
LRP1 Proteína	6.53±11.87	19.16±16.44***	0.001	5.97±4.98	16.50±13.75***	0.001
LRP1 RNA	3.05±2.75	8.10±9.97**	0.003	2.55±2.69	3.63±3.94	0.322
GIM.PROM	0.553±0.14	0.672±0.14***	0.000	0.683±0.17	0.692±0.19	0.888
GIM.MAX	0.625±0.16	0.740±0.15***	0.001	0.771±0.17	0.775±0.23	0.950

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Los datos se expresan como media±DS, IMC: índice de masa corporal, PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica, GIM.PROM: grosor íntima-media promedio, GIM.MAX: grosor íntima-media máximo, c-HDL: colesterol de lipoproteínas de alta densidad, c-LDL: colesterol de lipoproteínas de baja densidad.

6.2 EXPRESIÓN DEL *LRP1*

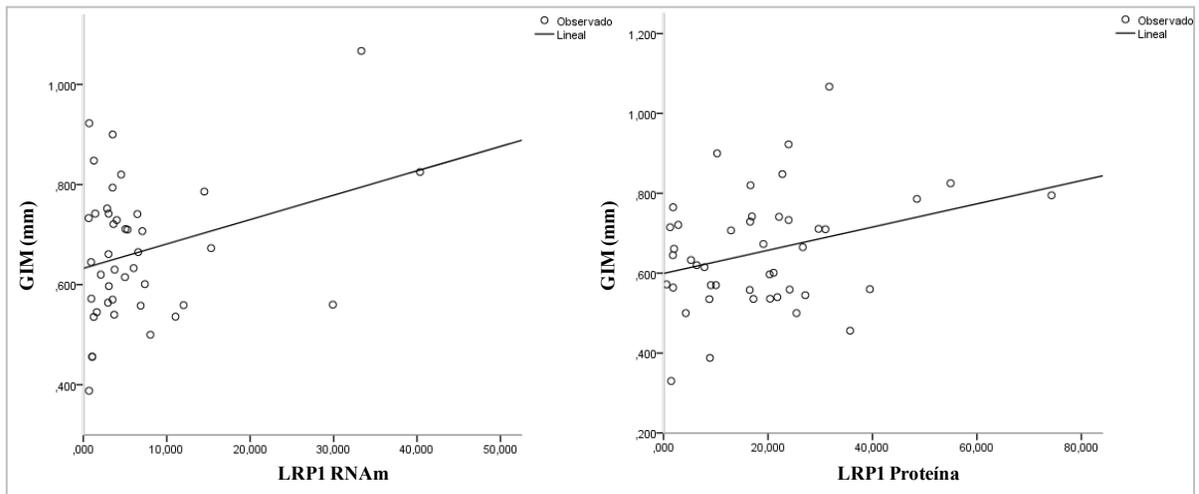
La expresión del LRP1 RNAm se determinó mediante PCR en tiempo real y los niveles de LRP1 proteína mediante análisis por inmunoelectrotransferencia (Western-blot). Como se indica en la Gráfica 2, los niveles de expresión de RNAm fueron significativamente más altos en hipertensos (HT) que en normotensos (NT) (HT:6.54±8.59 vs NT:2.87±2.72; $P=0.002$), así también los niveles de proteína fueron significativamente más altos en hipertensos (HT:18.34±15.49 vs NT:6.30±9.62; $P=0.000$).



Gráfica 2. Cuantificación de la expresión de LRP1. (A) Cuantificación por PCR en tiempo real de la expresión de LRP1 RNAm en monócitos. Los datos fueron procesados en un programa basado en el número de ciclos (Ct) de cada muestra y normalizado por HPRT1 (B) El “Western blot” muestra la expresión del LRP1 (cadena β) del monócito. ** $P < 0.01$; * $P < 0.001$**

6.3 CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DEL *LRP1* Y EL GROSOR DE LA ÍNTIMA MEDIA

Por otro lado, para conocer si existe una relación entre el grosor de la íntima media y los niveles de expresión del *LRP1* a nivel de RNAm y de proteína, se realizó una regresión lineal y se encontró una correlación positiva entre el GIM con los niveles de expresión del *LRP1* en RNAm (OR:0.005; IC95%: 0.000-0.010; $P=0.047$) y con los niveles de proteína (OR:0.312; IC95%: 0.000-0.006; $P=0.039$) en hipertensos (Gráfica 3).



Gráfica 3. Correlación entre los niveles de expresión de RNAm y de proteína del *LRP1* y el GIM en el grupo de hipertensos.

6.4 GENOTIPIFICACIÓN: CURVAS DE AMPLIFICACIÓN Y DISCRIMINACIÓN ALÉLICA

Se realizó la genotipificación de cada sujeto de estudio para conocer las frecuencias alélicas y genotípicas. En todos los casos se obtuvo DNA mediante la técnica de expulsión salina, posteriormente mediante la técnica de PCR en Tiempo Real se obtuvieron curvas de amplificación para todos los SNP a estudiar en donde se evidencia el número de ciclos (Ct) frente a la fluorescencia relativa (RFU) como se aprecia en la Figura 10.

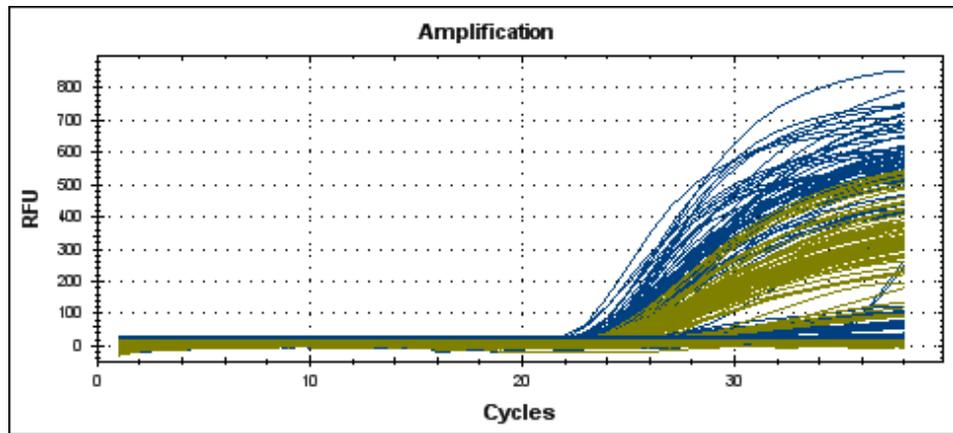


Figura 9. Curvas de amplificación típicas que dan señal a partir del ciclo 25, el fluorocromo VIC (verde) y FAM (azul)

Asimismo, por discriminación alélica se determinó el genotipo de cada paciente para cada uno de los 5 polimorfismos como lo muestra la Figura 11.

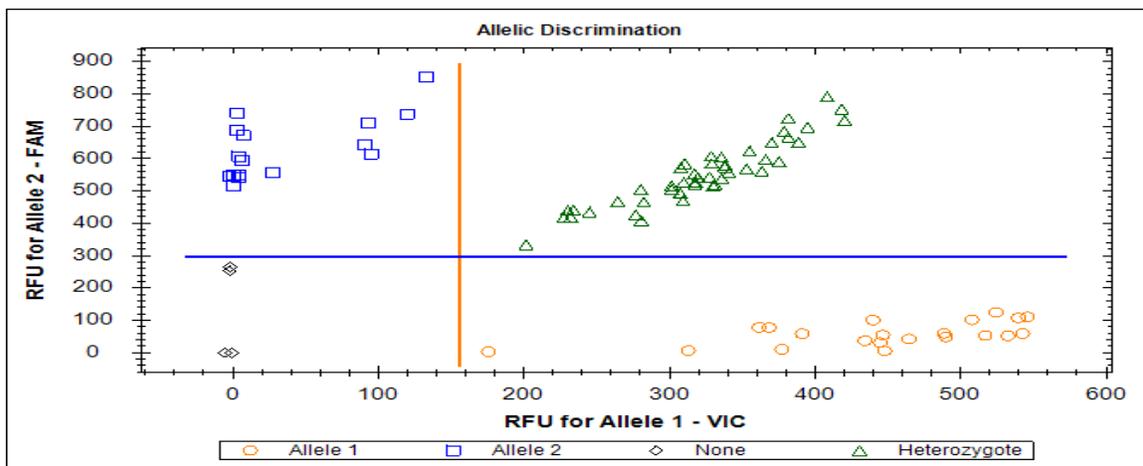


Figura 10. Discriminación alélica: en naranja se observa el patrón para el homocigoto para el alelo marcado con VIC, en azul el alelo marcado con FAM, en verde los heterocigotos y en negro se encuentran los controles negativos

6.5 DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO

Al obtener los genotipos de los cinco polimorfismos para el *LRPI* se realizó el análisis de desequilibrio de ligamiento con Haploview, en donde no se encontró diferencias significativas y se puede apreciar que los polimorfismos no segregan juntos y que es válido analizar los 5 polimorfismos seleccionados, la distribución de los polimorfismos se muestran en la Figura 12.

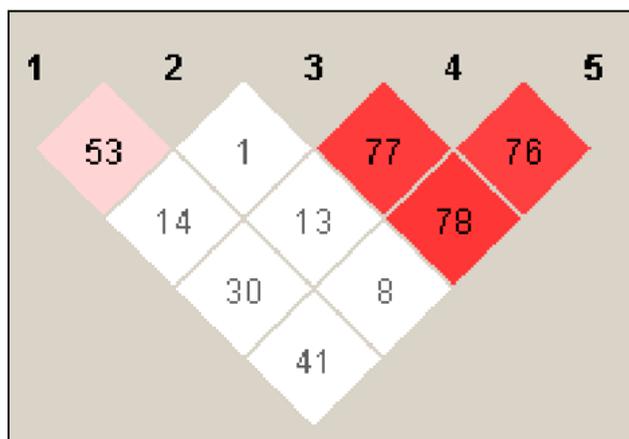


Figura 11. Bloque de Haplotipos para *LRPI*

6.6 FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS DEL *LRPI*

Después de haber realizado los haplotipos, se obtuvieron las frecuencias alélicas y genotípicas de los 5 polimorfismos para el grupo de normotensos y para el grupo de hipertensos, como se indica en la Tabla 11.

Con estos datos se realizó una prueba de χ^2 de cada uno de los 5 polimorfismos para ver si algún genotipo o alelo puede influir en la enfermedad. Únicamente para el polimorfismo rs1800164 se encontró una diferencia estadísticamente en el modelo dominante (AA/AG vs/GG) (OR:2.75; IC95%:1.17-6.91; $P=0.016$) y en el modelo aditivo (G vs A) (OR:2.75; IC95%:1.17-6.91; $P=0.016$). En los demás polimorfismos analizados no se encontró diferencias significativas al comparar hipertensos con normotensos.

Tabla 11. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del *LRP1*

		rs11172113				rs1466535				rs1800194			
		NT (%)	HT (%)	OR	P	NT (%)	HT (%)	OR	P	NT (%)	HT (%)	OR	P
GENOTIPO	CC	38.3	38.0	0.99	0.97	24.7	30.4	1.33	0.39	23.5	20.7	0.84	0.65
	CT	43.2	40.2	0.88	0.69	50.6	46.7	0.85	0.61	40.7	48.9	1.38	0.28
	TT	18.5	21.8	1.22	0.59	24.7	22.9	0.90	0.77	35.8	30.4	0.78	0.45
ALELOS	C	59.9	58.2	0.93	0.74	50.0	53.8	1.16	0.47	43.8	45.1	1.05	0.81
	T	40.1	41.8	1.07	0.74	50.0	46.2	0.85	0.47	56.2	54.9	0.94	0.81
		rs1140648				rs1800164							
		NT (%)	HT (%)	OR	P	NT (%)	HT (%)	OR	P				
GENOTIPO	AA	17.3	23.9	1.50	0.28	39.5	33.7	0.78	0.42				
	AG	49.4	50.0	1.02	0.93	50.6	42.4	0.72	0.28				
	GG	33.3	26.1	0.70	0.19	9.9	23.9**	2.75	0.01				
ALELOS	A	42.0	48.9	1.32	0.19	64.8	54.9*	0.66	0.03				
	G	58.0	51.1	0.75	0.19	35.2	45.1*	1.50	0.03				

NT: normotensos; HT: hipertensos; OR: odds ratio

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

6.7 COMPARACIÓN DE FRECUENCIAS ALELICAS CON OTRAS POBLACIONES PREVIAMENTE REPORTADAS

Con la finalidad de determinar si la carga genética de la población mexicana es igual o diferente a otras poblaciones, comparamos las frecuencias alélicas de nuestra población con las frecuencias alélicas previamente reportadas de otras poblaciones, como se muestra en la Tabla 12. Estos datos se obtuvieron de estudios publicados en el HapMap (CEU: panel de residentes adultos de Utah, originarios de Europa Occidental y del Norte; CHB: panel de habitantes adultos de Beijing, China; JPT: panel de habitantes adultos de Tokio, Japón; YRI: panel de adultos originarios de la comunidad de Yoruba, Nigeria).

Se realizó la comparación de la frecuencia alélica de cada polimorfismo de nuestra población control o normotensa con cada una de las poblaciones mediante una prueba de χ^2 , y obtuvimos que en los polimorfismos rs11172113, rs1466535, rs1800164 existe una

diferencia significativa con las poblaciones de Europa (CEU), China (CHB), Japón (JPT) y África (YRI), en el polimorfismo rs1800194 existe diferencia en las frecuencias alélicas con CEU, CHB y JPT, mientras que en el polimorfismo rs1140648 existe una diferencia estadísticamente significativa con CEU, JPT y YRI.

Tabla 12. Tabla de frecuencias alélicas de otras poblaciones previamente reportadas

Población	n	rs11172113			rs1466535			n	rs1800194		
		C	T	P	C	T	P		C	T	P
MEX	182	0.599	0.401		0.500	0.500			0.438	0.562	
CEU	226	0.367	0.633	0.00	0.686	0.314	0.00	120	0.683	0.317	0.00
CHB	82	0.244	0.756	0.00	0.780	0.220	0.00	120	0.583	0.417	0.01
JPT	172	0.203	0.797	0.00	0.797	0.203	0.01				
YRI	226	0.478	0.522	0.01	0.823	0.177	0.00	118	0.475	0.525	0.546
Población	n	rs1140648			rs1800164						
		A	G	P	A	G	P				
MEX	182	0.420	0.580		0.648	0.352					
CEU	226	0.699	0.301	0.000	0.350	0.650	0.00				
CHB	82	0.488	0.512	0.312	0.500	0.500	0.02				
JPT	172	0.628	0.372	0.000	0.351	0.649	0.00				
YRI	226	0.235	0.765	0.000	0.885	0.115	0.00				

; MEX: nuestra población de estudio mexicana; CEU: población europea; CHB: población china; JPT: población japonesa; YRI: población africana.

6.8 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA POBLACIÓN DISTRIBUIDAS POR GENOTIPO

Además, se realizó el análisis comparativo de las características clínicas de normotensos e hipertensos por genotipo de cada polimorfismo, de tal manera que podemos determinar si existe relación entre los SNP estudiados del *LRP1* con IMC, con el perfil lipídico (CT, TG, c-HDL, c-LDL), presión arterial, GIM y expresión del *LRP1*.

En la Tabla 13, se muestran las características clínicas de acuerdo al polimorfismo rs11172113. En el genotipo CC se encontró una diferencia estadísticamente significativa en TG, c-HDL, LDL/HDL, Col. No HDL, CT/HDL, PAS, PAD, *LRP1* proteína, *LRP1* RNAm y en GIM promedio. En el genotipo CT se encontró diferencia estadísticamente significativa en IMC, c-HDL, PAS, PAD y en *LRP1* proteína.

En el genotipo TT se encontró diferencia significativa en edad, PAS, PAD y LRP1 proteína, en los tres genotipos los hipertensos presentan valores más altos que los normotensos excepto en c-HDL.

La tabla 14 muestra las características clínicas para el polimorfismo rs1466535 en el genotipo CC se encontró una diferencia estadísticamente significativa en IMC, c-HDL, LDL/HDL, CT/HDL, PAS, PAD, LRP1 proteína, en GIM promedio y máximo. En el genotipo CT se encontró diferencia estadísticamente significativa en IMC, c-HDL, PAS, PAD y en LRP1 proteína. En el genotipo TT se encontró diferencia significativa en PAS, PAD y en angiotensina II, en los tres genotipos los hipertensos presentan valores más altos que los normotensos excepto en c-HDL.

La Tabla 15 muestra las características clínicas para el polimorfismo rs1800194 en el genotipo CC se encontró una diferencia estadísticamente significativa en PAS, PAD, angiotensina II, LRP1 proteína y RNAm. En el genotipo CT se encontró diferencia estadísticamente significativa en edad, IMC, c-HDL, PAS, PAD, LRP1 proteína y RNAm. En el genotipo TT se encontró diferencia significativa en, IMC, TG, c-HDL, c-LDL, LDL/HDL, Col. No HDL, CT/HDL, TG/HDL, PAS, PAD, GIM promedio y máximo. En los tres genotipos los hipertensos presentan valores más altos que los normotensos excepto en c-HDL.

La Tabla 16 muestra las características clínicas para el polimorfismo rs1140648 en el genotipo AA se encontró una diferencia estadísticamente significativa en PAS y PAD. En el genotipo AG se encontró diferencia estadísticamente significativa en edad, IMC, c-HDL, LDL/HDL, CT/HDL, TG/HDL, PAS, PAD, LRP1 proteína y RNAm. En el genotipo GG se encontró diferencia significativa en PAS, PAD, GIM promedio y máximo. En los tres genotipos los hipertensos presentan valores más altos que los normotensos excepto en c-HDL.

La Tabla 17 muestra las características clínicas para el polimorfismo rs1800164 en el genotipo AA se encontró una diferencia estadísticamente significativa en IMC, TG, c-HDL, LDL/HDL, Col. No HDL, CT/HDL, TG/HDL, PAS, PAD GIM promedio y máximo. En el genotipo AG se encontró diferencia estadísticamente significativa en edad, IMC, c-

HDL, PAS, PAD, LRP1 proteína y RNAm y en GIM promedio. En el genotipo GG se encontró diferencia significativa en PAS. En los tres genotipos los hipertensos presentan valores más altos que los normotensos excepto en c-HDL.

6.9 CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DEL *LRPI* Y EL GENOTIPO

Por otro lado, para conocer si existe una relación entre el genotipo y los niveles de expresión del *LRPI* a nivel de RNAm y de proteína, se realizó un análisis de correlación de Pearson así como una regresión logística binaria y no se encontró una correlación entre el genotipo de los 5 polimorfismos con los niveles de expresión del *LRPI* y con los niveles de proteína en hipertensos.

Tabla 13. Características clínicas por genotipo del polimorfismo rs11172113

VARIABLES rs11172113	CC			CT			TT		
	NT	HT	P valor	NT	HT	P valor	NT	HT	P Valor
Edad (años)	46.48±12.84	49.50±8.81	0.276	45.28±11.76	48.61±13.00	0.274	42.53±9.28	55.11±13.96**	0.005
IMC (kg/m ²)	27.55±4.31	28.97±3.89	0.189	26.40±4.50	29.47±3.59**	0.003	27.13±3.54	29.94±4.36	0.069
Colesterol Total (mg/dl)	184.30±34.95	196.25±41.78	0.223	201.29±41.32	195.97±3.59	0.543	212.00±44.52	202.27±36.29	0.488
Triglicéridos (mg/dl)	142.10±68.44	198.20±90.67**	0.008	168.32±108.05	184.85±74.51	0.460	207.03±96.99	203.48±131.44	0.932
c-HDL (mg/dl)	53.40±13.77	46.34±10.45*	0.023	55.00±14.37	45.99±8.34**	0.002	49.22±12.48	45.34±13.11	0.394
c-LDL (mg/dl)	107.93±28.44	119.91±33.57	0.131	117.54±36.59	120.27±27.45	0.727	129.69±33.37	124.28±32.44	0.640
LDL/HDL	2.13±0.69	2.68±0.90**	0.009	2.32±1.01	2.71±0.82	0.083	2.73±0.80	2.92±0.99	0.545
Col.No HDL	130.89±33.04	149.91±40.08*	0.044	146.30±45.94	151.22±32.41	0.607	162.78±42.45	156.92±38.20	0.677
Glucosa (mg/dl)	87.64±7.33	89.00±9.26	0.518	89.00±7.66	88.43±8.35	0.771	91.60±6.35	90.20±8.10	0.584
CT/HDL	3.63±1.01	4.41±1.31*	0.011	3.91±1.34	4.38±1.00	0.105	4.48±1.22	4.78±1.49	0.553
TG/HDL	3.07±2.38	4.68±2.72*	0.015	3.51±2.82	4.20±2.04	0.246	4.71±2.92	5.31±4.67	0.674
PAS (mmHg)	110.38±9.55	135.72±15.6***1	0.000	109.24±8.99	134.97±17.02***	0.000	112.75±12.92	129.21±16.92*	0.021
PAD (mmHg)	71.44±7.63	87.78±9.57***	0.000	70.41±7.614	86.86±10.61***	0.000	76.38±9.33	79.26±10.19	0.498
Angiotensina II (pmol/ml)	0.198±0.09	0.209±0.09	0.641	0.199±0.09	0.242±0.11	0.108	0.174±0.08	0.228±0.013	0.213
LRP1 Proteína	8.48±15.18	24.08±21.31*	0.022	5.87±5.19	14.01±14.05*	0.018	3.59±3.25	20.27±9.20***	0.001
LRP1 RNA	3.64±3.41	10.86±11.99*	0.018	2.81±2.57	4.30±3.54	0.112	1.90±2.24	6.90±10.21	0.422
GIM.PROM	0.564±0.16	0.690±0.17*	0.014	0.619±0.18	0.644±0.14	0.588	0.573±0.13	0.720±0.15*	0.045
GIM.MAX	0.662±0.19	0.769±0.19	0.068	0.674±0.17	0.713±0.17	0.432	0.658±0.15	0.789±0.17	0.112

NT: normotensos; HT: hipertensos, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001

Tabla 14. Características clínicas por genotipo del polimorfismo rs1466535

VARIABLES RS1466535	CC			CT			TT		
	NT	HT	P valor	NT	HT	P valor	NT	HT	P Valor
Edad (años)	45.72±11.14	51.64±14.48	0.148	44.83±11.71	49.67±11.50	0.063	45.50±12.81	49.89±8.64	0.227
IMC (kg/m ²)	25.52±3.53	29.23±3.85**	0.002	26.91±4.01	29.65±3.99**	0.004	28.51±5.05	29.02±3.74	0.726
Colesterol Total (mg/dl)	205.48±39.02	197.05±32.05	0.422	192.01±36.86	193.54±37.58	0.856	196.23±48.50	205.84±37.72	0.486
Triglicéridos (mg/dl)	164.63±90.45	208.00±112.73	0.169	154.25±83.29	186.15±87.82	0.103	186.54±115.24	190.73±82.86	0.895
c-HDL (mg/dl)	57.61±12.71	45.16±11.57***	0.001	53.08±14.70	46.02±9.53*	0.012	49.35±12.26	46.98±10.01	0.505
c-LDL (mg/dl)	121.49±34.28	119.37±27.97	0.817	113.05±31.97	116.92±30.85	0.586	116.11±36.45	131.41±32.72	0.170
LDL/HDL	2.23±0.84	2.81±0.95*	0.039	2.28±0.87	2.65±0.92	0.074	2.48±0.93	2.84±0.71	0.170
Col.No HDL	147.87±42.27	153.54±36.50	0.626	138.94±36.88	147.51±37.84	0.312	146.87±50.65	158.86±33.65	0.379
Glucosa (mg/dl)	89.00±8.83	88.42±8.10	0.820	89.02±5.76	89.95±9.41	0.598	88.80±8.85	88.00±7.58	0.757
CT/HDL	3.76±1.18	4.63±1.38*	0.031	3.85±1.18	4.38±1.28	0.062	4.17±1.35	4.48±0.94	0.398
TG/HDL	3.28±2.52	5.21±3.95	0.067	3.38±2.64	4.38±2.65	0.096	4.17±3.03	4.32±2.26	0.865
PAS (mmHg)	112.54±8.04	130.18±16.85***	0.001	111.33±10.10	136.45±17.15***	0.000	105.29±8.70	134.39±13.99***	0.000
PAD (mmHg)	72.31±9.32	81.93±9.97**	0.006	71.36±7.06	86.80±9.50***	0.000	71.53±9.15	88.28±12.71***	0.000
Angiotensina II (pmol/ml)	0.207±0.10	0.200±0.08	0.833	0.202±0.09	0.235±0.11	0.187	0.168±0.08	0.247±0.127*	0.031
LRP1 Proteína	3.52±3.87	18.65±13.01**	0.002	5.86±6.34	18.40±20.01**	0.007	10.31±17.08	19.77±8.73	0.162
LRP1 RNA	1.78±1.40	8.04±9.90	0.061	3.34±3.42	5.31±9.01	0.314	3.61±2.52	6.81±4.90	0.061
GIM.PROM	0.537±0.13	0.671±0.15*	0.021	0.623±0.18	0.682±0.15	0.172	0.565±0.15	0.685±0.17	0.082
GIM.MAX	0.608±0.13	0.740±0.18*	0.045	0.701±0.20	0.752±0.18	0.301	0.642±0.13	0.771±0.20	0.078

NT: normotensos; HT: hipertensos, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001

Tabla 15. Características clínicas por genotipo del polimorfismo rs1800194

VARIABLES RS1800194	CC			CT			TT		
	NT	HT	P valor	NT	HT	P valor	NT	HT	P Valor
Edad (años)	46.22±12.89	46.06±14.49	0.971	45.13±10.43	52.65±12.01**	0.006	44.58±12.70	49.54±9.31	0.106
IMC (kg/m ²)	27.30±5.84	28.45±4.97	0.541	27.32±3.99	29.62±3.38*	0.012	26.38±3.40	29.61±3.82**	0.002
Colesterol Total (mg/dl)	194.73±41.32	194.25±32.56	0.969	202.08±45.94	193.43±40.46	0.385	190.92±32.83	206.44±29.07	0.072
Triglicéridos (mg/dl)	171.15±87.17	193.60±96.52	0.479	174.69±108.07	182.73±99.15	0.737	150.03±79.30	212.83±85.35**	0.007
c-HDL (mg/dl)	49.53±11.86	45.61±10.42	0.305	54.67±14.25	45.98±11.31**	0.004	53.85±14.34	46.24±8.32*	0.021
c-LDL (mg/dl)	116.99±33.51	120.42±26.70	0.738	119.44±38.77	118.51±35.44	0.914	111.24±26.52	125.61±24.54*	0.044
LDL/HDL	2.41±0.64	2.73±0.76	0.200	2.39±1.09	2.71±1.00	0.182	2.18±0.68	2.80±0.77**	0.003
Col.No HDL	145.20±38.21	148.64±29.62	0.766	147.40±51.80	148.47±41.94	0.921	137.07±29.03	160.19±30.02**	0.006
Glucosa (mg/dl)	88.77±9.16	89.36±7.50	0.831	89.21±6.82	89.06±9.19	0.939	88.77±6.89	88.74±8.52	0.986
CT/HDL	4.04±0.91	4.44±1.22	0.295	3.98±1.49	4.42±1.37	0.177	3.74±1.04	4.59±1.03**	0.004
TG/HDL	3.79±2.43	4.64±3.00	0.372	3.65±2.88	4.47±3.42	0.276	3.30±2.71	4.86±2.36*	0.028
PAS (mmHg)	110.12±8.51	136.06±19.50***	0.000	109.26±10.71	130.21±16.46***	0.000	111.13±9.64	138.62±13.12***	0.000
PAD (mmHg)	73.53±7.16	86.50±10.17***	0.000	71.04±8.77	82.88±11.77***	0.000	70.74±7.67	89.12±7.55***	0.000
Angiotensina II (pmol/ml)	0.113±0.06	0.222±0.10**	0.002	0.220±0.09	0.231±0.11	0.686	0.213±0.07	0.223±0.11	0.722
LRP1 Proteína	2.59±3.33	13.21±10.01*	0.018	5.59±6.16	24.02±17.04***	0.000	9.98±15.60	12.80±12.42	0.608
LRP1 RNA	2.11±2.40	4.83±2.74*	0.047	2.88±1.88	8.22±10.63*	0.037	3.79±3.79	3.94±4.29	0.923
GIM.PROM	0.559±0.10	0.623±0.16	0.267	0.624±0.19	0.706±0.17	0.090	0.568±0.16	0.673±0.13*	0.032
GIM.MAX	0.635±0.12	0.692±0.18	0.403	0.713±0.21	0.782±0.19	0.209	0.627±0.15	0.734±0.1*	0.023

NT: normotensos; HT: hipertensos. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001

Tabla 16. Características clínicas por genotipo del polimorfismo rs1140648

VARIABLES RS1140648	AA			AG			GG		
	NT	HT	P valor	NT	HT	P valor	NT	HT	P Valor
Edad (años)	47.71±13.62	47.67±13.46	0.992	45.95±11.52	52.86±11.99**	0.010	42.68±10.81	48.04±9.73	0.075
IMC (kg/m ²)	27.01±3.87	28.51±4.75	0.375	27.37±4.99	29.46±3.51*	0.033	26.41±3.35	30.01±3.64***	0.001
Colesterol Total (mg/dl)	207.80±42.38	188.77±37.19	0.174	193.21±43.48	197.81±37.63	0.607	195.48±34.91	205.07±3.64	0.318
Triglicéridos (mg/dl)	181.31±100.75	177.71±92.19	0.915	159.07±91.70	194.01±101.73	0.108	165.47±95.71	209.27±82.45	0.098
c-HDL (mg/dl)	53.07±9.84	47.55±11.85	0.167	54.50±15.51	44.91±10.31***	0.001	51.59±13.07	46.61±8.36	0.126
c-LDL (mg/dl)	122.84±38.48	116.88±31.31	0.620	112.63±36.91	121.33±32.99	0.261	117.32±24.88	124.35±25.59	0.340
LDL/HDL	2.39±0.87	2.53±0.70	0.615	2.24±0.96	2.85±1.01**	0.007	2.40±0.75	2.74±0.77	0.123
Col.No HDL	154.72±43.31	143.32±36.37	0.410	138.71±46.13	152.90±38.90	0.133	143.88±33.56	158.45±30.68	0.125
Glucosa (mg/dl)	90.78±7.93	89.59±7.19	0.644	89.17±6.88	88.93±9.07	0.891	87.60±7.75	88.69±9.11	0.665
CT/HDL	4.04±1.16	4.09±0.90	0.893	3.79±1.27	4.64±1.44**	0.006	4.00±1.21	4.52±1.00	0.118
TG/HDL	3.74±2.77	4.01±2.48	0.773	3.35±2.42	4.86±3.57*	0.031	3.76±3.12	4.73±2.52	0.229
PAS (mmHg)	111.00±10.22	135.05±20.04***	0.001	110.21±9.77	131.67±16.00***	0.000	109.65±9.69	137.45±13.47***	0.000
PAD (mmHg)	76.10±6.17	85.19±11.67*	0.029	70.94±8.03	84.16±11.14***	0.000	70.45±8.12	88.50±7.86***	0.000
Angiotensina II (pmol/ml)	0.165±0.12	0.239±0.10	0.080	0.206±0.10	0.224±0.11	0.445	0.192±0.05	0.219±0.11	0.314
LRP1 Proteína	4.02±3.87	14.04±11.52	0.056	5.15±5.90	24.94±16.75***	0.000	10.53±16.59	10.42±11.12	0.986
LRP1 RNA	0.71±0.89	6.64±8.09	0.177	2.84±2.00	7.25±9.87*	0.027	4.01±3.93	4.51±4.94	0.792
GIM.PROM	0.523±0.10	0.624±0.14	0.108	0.621±0.17	0.707±0.17	0.055	0.572±0.17	0.678±0.13*	0.050
GIM.MAX	0.623±0.12	0.697±0.17	0.249	0.704±0.19	0.782±0.20	0.129	0.632±0.16	0.746±0.15*	0.040

NT: normotensos; HT: hipertensos, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001

Tabla 17. Características clínicas por genotipo del polimorfismo rs1800164

VARIABLES RS1800164	AA			AG			GG		
	NT	HT	P valor	NT	HT	P valor	NT	HT	P Valor
Edad (años)	45.14±12.46	48.35±9.36	0.261	44.00±10.01	51.14±13.86*	0.012	51.25±15.86	51.82±11.95	0.917
IMC (kg/m²)	26.99±4.49	29.91±3.54**	0.007	27.01±4.17	29.22±3.58*	0.019	26.63±4.30	28.92±54.75	0.267
Colesterol Total (mg/dl)	186.86±32.51	202.11±39.13	0.118	203.16±42.50	193.74±38.36	0.305	195.68±51.75	197.71±26.44	0.888
Triglicéridos (mg/dl)	145.67±67.78	211.39±87.82**	0.003	180.42±110.13	181.63±106.00	0.961	153.68±71.75	191.93±81.41	0.252
c-HDL (mg/dl)	53.32±14.38	44.33±8.35**	0.005	53.25±14.07	46.59±9.37*	0.016	53.32±11.70	47.13±13.63	0.265
c-LDL (mg/dl)	108.42±27.82	123.45±31.79	0.064	120.60±34.97	119.93±34.27	0.931	118.21±42.27	119.63±22.24	0.905
LDL/HDL	2.16±0.73	2.87±0.93**	0.003	2.44±0.97	2.66±0.87	0.292	2.26±0.75	2.72±0.86	0.192
Col.No HDL	133.54±29.39	157.77±39.14*	0.011	149.91±46.75	148.33±39.08	0.871	142.36±48.71	150.58±26.88	0.559
Glucosa (mg/dl)	88.89±6.70	89.20±9.18	0.886	89.02±7.05	87.94±8.54	0.540	88.87±11.36	90.72±7.86	0.617
CT/HDL	3.71±1.05	4.68±1.20**	0.002	4.07±1.37	4.30±1.20	0.426	3.74±0.93	4.51±1.34	0.154
TG/HDL	3.24±2.53	5.01±2.41**	0.009	3.87±2.97	4.24±3.45	0.607	3.07±1.74	4.76±3.03	0.149
PAS (mmHg)	111.71±8.88	136.04±14.13***	0.000	109.07±9.64	133.81±19.04***	0.000	110.00±12.91	131.52±14.88**	0.002
PAD (mmHg)	71.46±7.37	88.86±8.48***	0.000	70.58±8.20	83.70±10.97***	0.000	76.86±7.47	84.29±11.79	0.132
Angiotensina II (pmol/ml)	0.191±0.07	0.210±0.10	0.419	0.209±0.09	0.232±0.10	0.336	0.126±0.12	0.241±0.13	0.060
LRP1 Proteína	10.05±16.14	17.60±15.28	0.200	5.22±5.76	20.80±17.21***	0.000	2.01±0.74	16.25±12.48	0.152
LRP1 RNA	3.74±3.81	7.07±11.79	0.252	2.79±2.10	6.11±7.24*	0.031	1.39±1.11	7.26±8.37	0.265
GIM.PROM	0.578±0.16	0.676±0.13*	0.043	0.591±0.17	0.672±0.14*	0.050	0.646±0.18	0.694±0.20	0.670
GIM.MAX	0.639±0.15	0.749±0.14*	0.023	0.667±0.17	0.740±0.17	0.112	0.790±0.27	0.774±0.24	0.908

NT: normotensos; HT: hipertensos. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001

DISCUSIÓN

El propósito de este trabajo fue determinar la relación entre el engrosamiento de la íntima media arterial y la hipertensión arterial a través de la expresión específica del LRP1 en monocitos humanos de sangre venosa de pacientes con hipertensión.

Los resultados de este trabajo evidenciaron la presencia de obesidad en el 19.8% de pacientes normotensos y en el 44.1% de pacientes hipertensos, estos datos están completamente de acuerdo con los publicados por la ENSANUT 2012 que muestran que el 32.4% de la población mexicana padece obesidad con una mayor prevalencia en mujeres.

Nuestros resultados, revelan que la población hipertensa presenta una mayor prevalencia de dislipidemia en comparación a la población normotensa, lo que aumenta la posibilidad de que desarrollen un evento cardiovascular adverso. Varios estudios muestran resultados similares [124-128].

Se demuestra una sobreexpresión del receptor LRP1 en monocitos de pacientes mexicanos hipertensos tanto a nivel de RNAm como de proteína. Uno de los principales hallazgos de este estudio es que el promedio del grosor de la íntima media es superior en la población de hipertensos y que este valor está directamente asociado a la sobreexpresión de LRP1 en los monocitos circulantes de los pacientes hipertensos.

Al realizar el GIM en los pacientes, nuestros datos demuestran una estrecha asociación entre la hipertensión y el engrosamiento de la íntima media y por ende en el desarrollo de aterosclerosis. Estos resultados están de acuerdo con lo anteriormente publicado en pacientes y modelos animales. En un estudio en jóvenes con hipertensión limítrofe (130-140/85-89mmHg) se observó un aumento en el GIMc en las arterias braquiales en comparación a normotensos y una asociación entre el GIM y la PAS ambulatoria de 24horas [129].

Además, la hipertensión conjuntamente con diabetes y edad se considera un factor pronóstico independiente para la hiperplasia en la íntima de la arteria radial [130, 131]. En un modelo animal se reportó la hipertensión como causa directa de un aumento significativo del grosor de la intima media [132, 133].

La hipertensión se encuentra entre los principales factores de riesgo en la etiología de la enfermedad vascular aterosclerótica [134, 135]. Sin embargo, los mecanismos por los que la hipertensión incrementa la incidencia de aterosclerosis aun no son completamente claros. De gran importancia son los estudios que se enfocan en dilucidar estos mecanismos.

Nuestros resultados muestran niveles altos de angiotensina II en los pacientes hipertensos. Estudios previos han demostrado que hay una fuerte asociación entre hipertensión y la expresión del LRP1 en la pared vascular en un modelo de rata con infusión de angiotensina II [87], así como un efecto modulador de la angiotensina II en la expresión del LRP1 en cultivos de células musculares lisas de la pared vascular [87, 136]. Estos autores demostraron que la regulación al alza del LRP1 por la hipertensión tiene consecuencias funcionales ya que favorece la acumulación intracelular de lípido y por tanto la formación de células espumosas.

La hipertensión tiene un alto impacto en remodelado vascular, los cambios crónicos en las fuerzas hemodinámicas, estructuralmente alteran la pared vascular [137], la respuesta inflamatoria y los cambios en los componentes de la matriz se consideran mediadores importantes en el proceso de adaptación vascular [138]. El sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), además de tener un papel funcional en la hipertensión tiene un rol importante en el remodelado vascular en hiperplasia, angioplastia y en aterosclerosis [139-141]. El efecto que tiene la angiotensina II sobre el remodelado vascular se debe a la proliferación de células musculares lisas vasculares y a la hipertrofia, por ejemplo la angiotensina exhorta un efecto hipertrófico en los cardiomiocitos a través de la señalización de la vía TGF β 1 [142]. La aldosterona tiene un efecto en el remodelado vascular mediante efectos directos en la síntesis y depósito de colágeno en el intersticio cardiaco [143]. Se ha descrito también que la hipertensión induce la producción de superóxido y promueve la disfunción endotelial en arteriolas cerebrales [144]. Además de sus efectos en deposición lipídica y remodelado vascular, la hipertensión arterial se asocia a cambios funcionales en los monocitos periféricos circulantes, los cuales al activarse tienen un papel importante en etapas tempranas de la formación de la lesión aterosclerótica [145], e igualmente tienen un rol crucial en las complicaciones cardiovasculares de hipertensos [146, 147].

Los cambios del flujo sanguíneo que se producen en el estado de hipertensión pueden actuar sobre el endotelio y alterar su función y estructura [148, 149], muchas de estas alteraciones están involucradas en la producción de moléculas biológicas efectoras relacionadas con la expresión de genes [150].

Esta correlación puede explicarse por el posible efecto modulador de la hipertensión en la expresión del LRP1 e inferir que los cambios funcionales que sufren los monocitos debido a la variación continua del flujo sanguíneo influyen de forma positiva en la expresión del LRP1, estimulando la captación de LDL y provocando un incremento en el GIMc como se encontró en este trabajo.

La hipertensión arterial es una enfermedad causada por factores genéticos y ambientales [151, 152], y ha llegado a ser el principal factor de riesgo en el incremento de la mortalidad y de la morbilidad para la enfermedad arterial coronaria (EAC) y el infarto isquémico (II) [153]. Tanto EAC como el infarto isquémico están caracterizados por una inflamación crónica. La hipertensión arterial también tiene una fuerte asociación con la inflamación, estudios muestran que varios polimorfismos genéticos están asociados con la hipertensión y que los factores genéticos podrían representar del 30% al 50% de las causas en la variación de la presión sanguínea [151].

El gen del LRP1, por la asociación descrita entre la expresión del LRP1 con la hipertensión como factor de riesgo de aterosclerosis [87]. Estudios previos han citado la asociación de polimorfismos del LRP1 con enfermedad coronaria en poblaciones caucásicas [81, 105, 154], longevidad [103] y con trombosis [155, 156].

No se han descrito polimorfismos del LRP1 asociados con hipertensión arterial en población mexicana, y hasta nuestro conocimiento al momento este estudio sería el primero. Nuestros resultados revelan una diferencia estadísticamente significativa entre normotensos e hipertensos en el polimorfismo rs1800164, en donde la presencia del genotipo GG muestra una asociación con el incremento en el riesgo de padecer hipertensión arterial. Cabe mencionar que nuestros pacientes hipertensos portadores del genotipo GG presentan niveles más altos de angiotensina II comparados con los normotensos portadores de este genotipo a pesar de que no existe una diferencia estadísticamente significativa.

Al comparar nuestra población mexicana con otras poblaciones encontramos que para el polimorfismo rs11172113, rs1466535, rs1800164 existe una diferencia estadísticamente significativa con las poblaciones de Europa, China, Japón y África, en el polimorfismo rs1800194 con las poblaciones de Europa, China y Japón y en el polimorfismo 1140648 con las poblaciones de Europa, Japón y África, lo que nos indica que la carga genética de nuestra población de estudio es distinta y por ende puede influir en la prevalencia de hipertensión arterial. Sin embargo, en el análisis de nuestros sujetos de estudio las diferencias de las características clínicas entre normotensos e hipertensos de acuerdo al genotipo nos sugiere que dependen de la presencia de la hipertensión arterial más que del genotipo.

Se ha reportado la existencia de un polimorfismo en el promotor del *LRP1* (c.1-25 C>G) asociado a enfermedad arterial coronaria, a altos niveles de expresión del LRP1 a nivel de RNAm [63, 81, 157] y recientemente a hipertensión [136]. Sin embargo, en el análisis entre el genotipo y los niveles de expresión del LRP1 tanto en RNAm como de proteína no se encontró una correlación entre nuestros sujetos de estudio.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo demuestran:

1. Sobreexpresión del receptor LRP1 en monocitos de pacientes mexicanos hipertensos tanto a nivel de RNAm como de proteína. Ésta sobreexpresión del receptor está asociada con el promedio del grosor de la íntima media superior en la población de hipertensos.
2. En el polimorfismo rs1800164, la presencia del genotipo GG presentó niveles altos de angiotensina II en pacientes hipertensos, lo cual podría estar asociado con el incremento de padecer hipertensión arterial.
3. No se encontró una correlación entre los genotipos estudiados con los niveles de expresión del *LRP1* y con los niveles de proteína en hipertensos.

PERSPECTIVAS

Los resultados de este trabajo de investigación arrojan varias interrogantes entre las que destacan:

- ✓ Estudios futuros del polimorfismo en la región promotora (c.1-25 C>G) y de otros polimorfismos que puedan estar involucrados en hipertensión arterial, para ver su correlación con la sobreexpresión del receptor LRP1 encontrado.
- ✓ Estudiar el efecto de la angiotensina II en la expresión del LRP1 en una línea celular de monocitos humanos.

ANEXOS

ANEXO 1: SEPARACIÓN DE MONOCITOS

Los monocitos se obtuvieron a partir de la capa leuco-plaquetaria que se generó después de la centrifugación de sangre total entre el plasma y eritrocitos. El concentrado sanguíneo se diluyó en una proporción 1:1 con HEPES 1X 1% heparina y esta mezcla se añadió sobre una solución de “Ficoll-Paque” manteniendo la proporción de sangre- HEPES 1X 1% heparina. Las muestras se centrifugaron durante 30 minutos y las células mononucleares se recogieron con pipeta Pasteur y se lavaron con PBS mediante centrifugación durante 10 minutos (Figura 9).

Después de los lavados, las células se resuspendieron en RPM1 suplementado con suero fetal bovino al 10% y se dejaron en incubación a 37 °C durante 24 horas para la perfecta adhesión de monocitos a la placa de cultivo. Transcurrido el tiempo de incubación se lavaron las placas con HEPES 1X para eliminar los linfocitos que estaban en suspensión. Se adicionó 1ml de TriPure™ para la recolección de células mediante un raspado, se guardaron las células a -70 °C

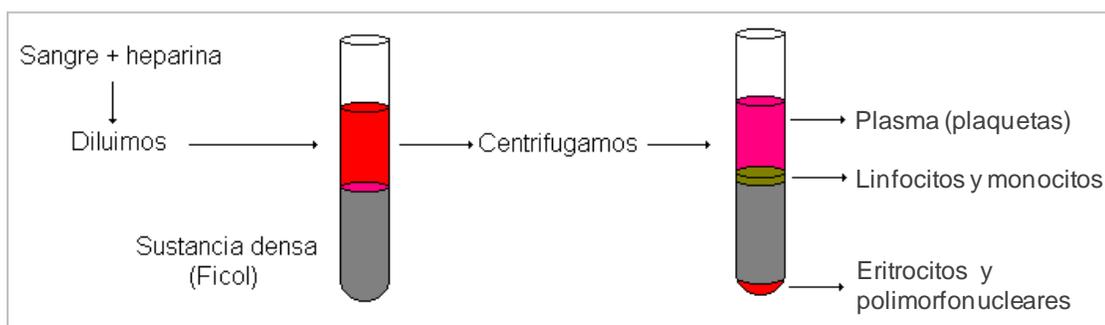


Figura 12. Obtención de monocitos por gradiente de densidad.

ANEXO 2: EXTRACCIÓN DE DNA

La extracción de DNA se realizó por la técnica de expulsión salina

1. Se utilizó sangre total periférica con anticoagulante EDTA.
2. Lisar los eritrocitos con una solución de lisis (SLR 1X).
3. Añadir SDS (dodecilsulfato sódico) al 20%, buffer de proteínasa, proteínasa.
4. Adicionar NaCl 5M.
5. Agregar etanol al 95% para precipitar el DNA.
6. Agregar etanol al 70% para conservar el DNA y eliminar sales.
7. Secar y luego añadir TE (Tris-EDTA), para luego medir la concentración de DNA en el Nanodrop 1000.
8. Ajustar todas las muestras a una concentración de 200 ng/ul (tubo madre).
9. Del tubo madre obtener alícuotas a una concentración de 10 ng/ul para realizar la PCR en tiempo real.

BIBLIOGRAFIA

1. HGNC. *LRP1*. [cited; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4035>.
2. George, S.J., J., *Atherosclerosis: Molecular and Cellular Mechanisms*. 2010.
3. Stary, H.C., *Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(5): p. 1177-8.
4. Lyon, C.A., et al., *Inhibition of N-cadherin retards smooth muscle cell migration and intimal thickening via induction of apoptosis*. *J Vasc Surg*. **52**(5): p. 1301-9.
5. George, S.J., *A new model of murine in situ stenting: great things come in small packages*. *Cardiovasc Res*. **85**(1): p. 5-6.
6. Martin-Timon, I., et al., *Type 2 diabetes and cardiovascular disease: Have all risk factors the same strength?* *World J Diabetes*, 2014. **5**(4): p. 444-70.
7. Martinez-Quintana, E., P. Rossique-Delmas, and F. Rodriguez-Gonzalez, *[Resistant arterial hypertension and coarctation of the aorta.]*. *Clin Investig Arterioscler*, 2014.
8. Vogt, A., et al., *[Two forms of familial hypercholesterolemia: differences in cardiovascular risk factors, cardiac and extracardiac atherosclerosis.]*. *Dtsch Med Wochenschr*, 2014.
9. Ruesga, E.J., R. Saturno, G., *Cardiologia I*. 2005.
10. Kierszenbaum, A.L., *Histology and cell biology: an introduction to pathology*. 2nd edición ed. 2007.
11. DeMedicina. *Medicina en Demedicina Arterias y Venas*. 2014 [cited; Available from: <http://demedicina.com/arterias-venas/>.
12. Hoffman, R.P., *Vascular Endothelial Dysfunction And Nutritional Compounds In Early Type 1 Diabetes*. *Curr Diabetes Rev*.
13. Silvestre-Roig, C., et al., *Atherosclerotic plaque destabilization: mechanisms, models, and therapeutic strategies*. *Circ Res*. **114**(1): p. 214-26.
14. Erbel, C., et al., *A human ex vivo atherosclerotic plaque model to study lesion biology*. *J Vis Exp*, (87).
15. Posadas, C., *Dislipidemias y aterosclerosis*. 1995.
16. Moore, K.J. and E.A. Fisher, *The double-edged sword of fibronectin in atherosclerosis*. *EMBO Mol Med*, 2012. **4**(7): p. 561-3.
17. Nievelstein, P.F., et al., *Lipid accumulation in rabbit aortic intima 2 hours after bolus infusion of low density lipoprotein. A deep-etch and immunolocalization study of ultrarapidly frozen tissue*. *Arterioscler Thromb*, 1991. **11**(6): p. 1795-805.
18. Nievelstein-Post, P., et al., *An ultrastructural study of lipoprotein accumulation in cardiac valves of the rabbit*. *Arterioscler Thromb*, 1994. **14**(7): p. 1151-61.
19. Llorente-Cortes, V., J. Martinez-Gonzalez, and L. Badimon, *Esterified cholesterol accumulation induced by aggregated LDL uptake in human vascular smooth muscle cells is reduced by HMG-CoA reductase inhibitors*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. **18**(5): p. 738-46.

20. Meljarejo, E., *Memorias: el papel del óxido nítrico en la enfermedad aterosclerótica* Acta Med Colomb, 2001. **26**.
21. Kumar, A., Fausto, Aster, *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*. 2010, Saunders Elsevier: Philadelphia. p. 500.
22. Delgado-Roche, L. *El estrés oxidativo en la enfermedad cardiovascular: evidencias para un tratamiento más integral*. 2008 [cited; Available from: http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol43_1_09/far11109.htm].
23. Schulz, C. and S. Massberg, *Atherosclerosis-Multiple Pathways to Lesional Macrophages*. Sci Transl Med. **6**(239): p. 239ps2.
24. Moore, K.J. and M.W. Freeman, *Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(8): p. 1702-11.
25. Komatsu, S., et al., *Effects of chronic arterial hypertension on constitutive and induced intercellular adhesion molecule-1 expression in vivo*. Hypertension, 1997. **29**(2): p. 683-9.
26. Martinez-Gonzalez, J., V. Llorente-Cortes, and L. Badimon, *[Cellular and molecular biology of atherosclerotic lesions]*. Rev Esp Cardiol, 2001. **54**(2): p. 218-31.
27. Chain, S.L., 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*, in Rev. Fed. Arg. Cardiol. 2005. p. 392-402.
28. Touboul, P.J., et al., *Carotid artery intima media thickness, plaque and Framingham cardiovascular score in Asia, Africa/Middle East and Latin America: the PARC-AALA study*. Int J Cardiovasc Imaging, 2007. **23**(5): p. 557-67.
29. Touboul, P.J., et al., *Mannheim carotid intima-media thickness consensus (2004-2006). An update on behalf of the Advisory Board of the 3rd and 4th Watching the Risk Symposium, 13th and 15th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, and Brussels, Belgium, 2006*. Cerebrovasc Dis, 2007. **23**(1): p. 75-80.
30. Josef, P., et al., *Relationship between retinal vascular caliber and coronary artery disease in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)*. Int J Environ Res Public Health, 2013. **10**(8): p. 3409-23.
31. O'Leary, D.H., et al., *Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults*. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. N Engl J Med, 1999. **340**(1): p. 14-22.
32. Halcox, J.P., et al., *Endothelial function predicts progression of carotid intima-media thickness*. Circulation, 2009. **119**(7): p. 1005-12.
33. Lind, L., et al., *Brachial artery intima-media thickness and echogenicity in relation to lipids and markers of oxidative stress in elderly subjects:--the prospective investigation of the vasculature in Uppsala Seniors (PIVUS) Study*. Lipids, 2008. **43**(2): p. 133-41.

34. Laurent, S., et al., *Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients*. Hypertension, 2001. **37**(5): p. 1236-41.
35. Koyoshi, R., et al., *Clinical significance of flow-mediated dilation, brachial intima-media thickness and pulse wave velocity in patients with and without coronary artery disease*. Circ J. **76**(6): p. 1469-75.
36. Bots, M.L., et al., *Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotterdam Study*. Circulation, 1997. **96**(5): p. 1432-7.
37. Hafner, F., et al., *Endothelial dysfunction and brachial intima-media thickness: long term cardiovascular risk with claudication related to peripheral arterial disease: a prospective analysis*. PLoS One. **9**(4): p. e93357.
38. Zhang, B., et al., *[Low-density lipoprotein cholesterol target goal attainment rate and related factors in patients with acute coronary syndrome after percutaneous coronary intervention]*. Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi. **42**(4): p. 290-4.
39. Chen, Y., et al., *Analysis of multiple factors involved in acute progressive cerebral infarction and extra- and intracranial arterial lesions*. Exp Ther Med. **7**(6): p. 1495-1505.
40. Tuna, M.M., et al., *Non-functioning adrenal incidentalomas are associated with higher hypertension prevalence and higher risk of atherosclerosis*. J Endocrinol Invest.
41. Civilibal, M., N.S. Duru, and M. Elevli, *Subclinical atherosclerosis and ambulatory blood pressure in children with metabolic syndrome*. Pediatr Nephrol.
42. Skromne, K.D.K., J.J. Rubio-Póo, C. Altagracia, M.M. Vásquez, M.E. Moreno, S.M., *Guía terapéutica de la hipertensión arteria*. Secretaria de salud del Gobierno del Distrito Federal. 2001: p. 1-58.
43. Lewington, S.C., R. Qizilbash, N. Peto, R. Collins, R., *Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies*. Lancet, 2002. **360**: p. 1903–1913.
44. Ehret, G.B., et al., *Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk*. Nature. **478**(7367): p. 103-9.
45. Srivastava, K., et al., *Association of angiotensin converting enzyme (insertion/deletion) gene polymorphism with essential hypertension in northern Indian subjects*. Genet Test Mol Biomarkers. **16**(3): p. 174-7.
46. Verdecchia, P., *Prognostic value of ambulatory blood pressure : current evidence and clinical implications*. Hypertension, 2000. **35**(3): p. 844-51.
47. Clement, D.L., et al., *Prognostic value of ambulatory blood-pressure recordings in patients with treated hypertension*. N Engl J Med, 2003. **348**(24): p. 2407-15.
48. Chobaniam, A.V.B., G.L. Black, H.R. Cushman, W.C. Green, L.A. Izzo, J.L. Jones, D.W. Materson, B.J. Oparil, S. Wright, J.T. Roccella, E.J. and the National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee, *The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. The JNC 7 Report*. JAMA, 2003. **289**: p. 2560-2572.

49. Chobanian, A.V.B., G.L. Black, H.R. Cushman, W.C. Green, L.A. Izzo, J.L. , *Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure*. Hypertension, 2003. **42**(6): p. 1206-52.
50. Organización Mundial de la Salud, *Causas de muerte 2008 [base de datos en línea]*. Ginebra. 2008.
51. Lim, S.S., et al., *A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*. Lancet. **380**(9859): p. 2224-60.
52. WHO, *A Global Brief on Hypertension*, World Health Organization. 2013, WHO Document Production Services: Ginebra (Suiza).
53. Krupp, M.A.T., L. M. Roe, R. L. Camargo, C. A., *Diagnóstico Clínico y de Laboratorio*. , ed. M.M.C.d. México. 1986, Ciudad de México. 50–275.
54. Garcia Zozaya, J.L., M. Padilla Viloría, and A. Castro, *Changes in calcium and magnesium metabolism in essential arterial hypertension*. South Med J, 1988. **81**(3): p. 350-3.
55. Garcia Zozaya, J.L. and M. Padilla Viloría, *[Alterations of calcium, magnesium, and zinc in essential hypertension: their relation to the renin-angiotensin-aldosterone system]*. Invest Clin, 1997. **38 Suppl 2**: p. 27-40.
56. Appel, L.J., et al., *A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure*. DASH Collaborative Research Group. N Engl J Med, 1997. **336**(16): p. 1117-24.
57. Sacks, F.M., et al., *Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet*. DASH-Sodium Collaborative Research Group. N Engl J Med, 2001. **344**(1): p. 3-10.
58. Ueshima, H., et al., *Effect of reduced alcohol consumption on blood pressure in untreated hypertensive men*. Hypertension, 1993. **21**(2): p. 248-52.
59. *National High Blood Pressure Education Program Working Group report on primary prevention of hypertension*. Arch Intern Med, 1993. **153**(2): p. 186-208.
60. Rose, G., *Sick individuals and sick populations*. Int J Epidemiol, 2001. **30**(3): p. 427-32; discussion 433-4.
61. Whelton, P.K., et al., *Primary prevention of hypertension: clinical and public health advisory from The National High Blood Pressure Education Program*. JAMA, 2002. **288**(15): p. 1882-8.
62. Kowal, R.C., et al., *Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(15): p. 5810-4.
63. Handschug, K., et al., *Low-density lipoprotein receptor-related protein in atherosclerosis development: up-regulation of gene expression in patients with coronary obstruction*. J Mol Med (Berl), 1998. **76**(8): p. 596-600.
64. Luoma, J., et al., *Expression of alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and scavenger receptor in human atherosclerotic lesions*. J Clin Invest, 1994. **93**(5): p. 2014-21.

65. Llorente-Cortes, V., et al., *Low-density lipoprotein upregulates low-density lipoprotein receptor-related protein expression in vascular smooth muscle cells: possible involvement of sterol regulatory element binding protein-2-dependent mechanism*. *Circulation*, 2002. **106**(24): p. 3104-10.
66. *LRP1 protein*. [cited; Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Protein_LRP1_PDB_1cr8.png].
67. Herz, J., et al., *Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor*. *EMBO J*, 1988. **7**(13): p. 4119-27.
68. Krieger, M. and J. Herz, *Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP)*. *Annu Rev Biochem*, 1994. **63**: p. 601-37.
69. Strickland, D.K., et al., *Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(29): p. 17401-4.
70. Meilinger, M., et al., *Removal of lactoferrin from plasma is mediated by binding to low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor and transport to endosomes*. *FEBS Lett*, 1995. **360**(1): p. 70-4.
71. Bu, G., *Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy*. *Nat Rev Neurosci*, 2009. **10**(5): p. 333-44.
72. Williams, S.E., et al., *The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and the receptor-associated protein. An overview*. *Ann N Y Acad Sci*, 1994. **737**: p. 1-13.
73. Kanekiyo, T. and G. Bu, *The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 and amyloid-beta clearance in Alzheimer's disease*. *Front Aging Neurosci*. **6**: p. 93.
74. Neels, J.G., et al., *The second and fourth cluster of class A cysteine-rich repeats of the low density lipoprotein receptor-related protein share ligand-binding properties*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(44): p. 31305-11.
75. Li, Y., et al., *The YXXL motif, but not the two NPXY motifs, serves as the dominant endocytosis signal for low density lipoprotein receptor-related protein*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(22): p. 17187-94.
76. Obermoeller-McCormick, L.M., et al., *Dissection of receptor folding and ligand-binding property with functional minireceptors of LDL receptor-related protein*. *J Cell Sci*, 2001. **114**(Pt 5): p. 899-908.
77. Rebeck, G.W., et al., *The generation and function of soluble apoE receptors in the CNS*. *Mol Neurodegener*, 2006. **1**: p. 15.
78. Hiltunen, T.P., et al., *Expression of LDL receptor, VLDL receptor, LDL receptor-related protein, and scavenger receptor in rabbit atherosclerotic lesions: marked induction of scavenger receptor and VLDL receptor expression during lesion development*. *Circulation*, 1998. **97**(11): p. 1079-86.
79. Moestrup, S.K., J. Gliemann, and G. Pallesen, *Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues*. *Cell Tissue Res*, 1992. **269**(3): p. 375-82.

80. Llorente-Cortes, V., et al., *Intracellular lipid accumulation, low-density lipoprotein receptor-related protein expression, and cell survival in vascular smooth muscle cells derived from normal and atherosclerotic human coronaries*. Eur J Clin Invest, 2004. **34**(3): p. 182-90.
81. Schulz, S., et al., *The LDL receptor-related protein (LRP1/A2MR) and coronary atherosclerosis--novel genomic variants and functional consequences*. Hum Mutat, 2002. **20**(5): p. 404.
82. Schulz, S., et al., *Role of LDL receptor-related protein (LRP) in coronary atherosclerosis*. Int J Cardiol, 2003. **92**(2-3): p. 137-44.
83. Sakr, S.W., et al., *The uptake and degradation of matrix-bound lipoproteins by macrophages require an intact actin Cytoskeleton, Rho family GTPases, and myosin ATPase activity*. J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 37649-58.
84. Llorente-Cortes, V., et al., *Sterol regulatory element binding proteins downregulate LDL receptor-related protein (LRP1) expression and LRP1-mediated aggregated LDL uptake by human macrophages*. Cardiovasc Res, 2007. **74**(3): p. 526-36.
85. Llorente-Cortes, V., et al., *Effect of Mediterranean diet on the expression of pro-atherogenic genes in a population at high cardiovascular risk*. Atherosclerosis, 2009. **208**(2): p. 442-50.
86. Rosa, B.L., et al., *Alterations of specific biomarkers of metabolic pathways in vascular tree from patients with Type 2 diabetes*. Cardiovasc Diabetol, 2012. **11**: p. 86.
87. Sendra, J., et al., *Angiotensin II upregulates LDL receptor-related protein (LRP1) expression in the vascular wall: a new pro-atherogenic mechanism of hypertension*. Cardiovasc Res, 2008. **78**(3): p. 581-9.
88. Costales, P., et al., *Selective role of sterol regulatory element binding protein isoforms in aggregated LDL-induced vascular low density lipoprotein receptor-related protein-1 expression*. Atherosclerosis, 2010. **213**(2): p. 458-68.
89. Kheradmand, M., et al., *Association of inflammatory gene polymorphisms and conventional risk factors with arterial stiffness by age*. J Epidemiol, 2013. **23**(6): p. 457-65.
90. Ueyama, C., et al., *Association of genetic variants of and 3q28 with hypertension in community-dwelling individuals*. Biomed Rep, 2013. **1**(6): p. 840-844.
91. Okser, S., et al., *Genetic variants and their interactions in the prediction of increased pre-clinical carotid atherosclerosis: the cardiovascular risk in young Finns study*. PLoS Genet, 2010. **6**(9): p. e1001146.
92. Okser, S., T. Pahikkala, and T. Aittokallio, *Genetic variants and their interactions in disease risk prediction - machine learning and network perspectives*. BioData Min, 2013. **6**(1): p. 5.
93. Lee, W.K., S. Padmanabhan, and A.F. Dominiczak, *Genetics of hypertension: from experimental models to clinical applications*. J Hum Hypertens, 2000. **14**(10-11): p. 631-47.
94. Lifton, R.P., A.G. Gharavi, and D.S. Geller, *Molecular mechanisms of human hypertension*. Cell, 2001. **104**(4): p. 545-56.

95. Ranganathan, S., et al., *Molecular basis for the interaction of low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) with integrin alphaMbeta2: identification of binding sites within alphaMbeta2 for LRP1*. J Biol Chem, 2011. **286**(35): p. 30535-41.
96. Dalli, J., et al., *Microparticle alpha-2-macroglobulin enhances pro-resolving responses and promotes survival in sepsis*. EMBO Mol Med, 2014. **6**(1): p. 27-42.
97. Montoya-Rodriguez, A., et al., *Pepsin-pancreatin protein hydrolysates from extruded amaranth inhibit markers of atherosclerosis in LPS-induced THP-1 macrophages-like human cells by reducing expression of proteins in LOX-1 signaling pathway*. Proteome Sci, 2014. **12**: p. 30.
98. Seferovic, J.P., et al., *Structural myocardial alterations in diabetes and hypertension: the role of galectin-3*. Clin Chem Lab Med, 2014.
99. Van Leuven, F.T., E. Lambrechts, M. Stas, L. Boon, T. Bruynseels, K. Muls, E. Descamps, O., *Sequencing of the coding exons of the LRP1 and LDLR genes on individual DNA samples reveals novel mutations in both genes*. Atherosclerosis. , 2001. **154**(3): p. 567-77.
100. Jouan, L., et al., *Investigation of rare variants in LRP1, KPNA1, ALS2CL and ZNF480 genes in schizophrenia patients reflects genetic heterogeneity of the disease*. Behav Brain Funct, 2013. **9**: p. 9.
101. Shi, Y.M., et al., *Association of the LRP1 gene and cognitive performance with amnesic mild cognitive impairment in elderly Chinese*. Int Psychogeriatr, 2009. **21**(6): p. 1072-80.
102. Sloan, C.D., et al., *Genetic pathway-based hierarchical clustering analysis of older adults with cognitive complaints and amnesic mild cognitive impairment using clinical and neuroimaging phenotypes*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2010. **153B**(5): p. 1060-9.
103. Benes, P., et al., *C766T low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) gene polymorphism and susceptibility to breast cancer*. Breast Cancer Res, 2003. **5**(3): p. R77-81.
104. Hancock, D.B., et al., *STAT6 and LRP1 polymorphisms are associated with food allergen sensitization in Mexican children*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(6): p. 1673-6.
105. McCarthy, J.J., et al., *Large scale association analysis for identification of genes underlying premature coronary heart disease: cumulative perspective from analysis of 111 candidate genes*. J Med Genet, 2004. **41**(5): p. 334-41.
106. Basford, J.E., et al., *Smooth muscle LDL receptor-related protein-1 inactivation reduces vascular reactivity and promotes injury-induced neointima formation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(11): p. 1772-8.
107. Castellano, J., et al., *Hypoxia stimulates low-density lipoprotein receptor-related protein-1 expression through hypoxia-inducible factor-1alpha in human vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(6): p. 1411-20.

108. Aledo, R., et al., *LRP1 gene polymorphisms are associated with premature risk of cardiovascular disease in patients with familial hypercholesterolemia*. Rev Esp Cardiol (Engl Ed), 2012. **65**(9): p. 807-12.
109. May, A.L., E.V. Kuklina, and P.W. Yoon, *Prevalence of cardiovascular disease risk factors among US adolescents, 1999-2008*. Pediatrics, 2012. **129**(6): p. 1035-41.
110. Damaso, A.R., et al., *Multidisciplinary approach to the treatment of obese adolescents: effects on cardiovascular risk factors, inflammatory profile, and neuroendocrine regulation of energy balance*. Int J Endocrinol, 2013. **2013**: p. 541032.
111. Flores-Herrera, O.R.-H., E. Rivero-Rosas, H. Sosa-Peinado, A. Vásquez-Contrera, E. Velázquez-López, I., *Mensaje Bioquímico*. 2005.
112. Marin, J., *Mechanisms involved in the increased vascular resistance in hypertension*. J Auton Pharmacol, 1993. **13**(2): p. 127-76.
113. Levy, D., et al., *The progression from hypertension to congestive heart failure*. JAMA, 1996. **275**(20): p. 1557-62.
114. Rosca, M.G., B. Tandler, and C.L. Hoppel, *Mitochondria in cardiac hypertrophy and heart failure*. J Mol Cell Cardiol, 2013. **55**: p. 31-41.
115. Clancy, P., et al., *Role of the angiotensin converting enzyme I/angiotensin II/angiotensin receptor I axis in interstitial collagenase expression in human carotid atheroma*. Atherosclerosis, 2013. **229**(2): p. 331-7.
116. Lee, J.Y., et al., *Antiatherosclerotic effects of the novel angiotensin receptor antagonist Fimasartan on plaque progression and stability in a rabbit model: a double-blind placebo-controlled trial*. J Cardiovasc Pharmacol, 2013. **62**(2): p. 229-36.
117. Marrero, M.B., et al., *Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor*. Nature, 1995. **375**(6528): p. 247-50.
118. Nahman, N.S., Jr., et al., *Angiotensin II induction of fibronectin biosynthesis in cultured human mesangial cells: association with CREB transcription factor activation*. J Lab Clin Med, 1996. **127**(6): p. 599-611.
119. Colome, C., et al., *Small oxidative changes in atherogenic LDL concentrations irreversibly regulate adhesiveness of human endothelial cells: effect of the lazaroid U74500A*. Atherosclerosis, 2000. **149**(2): p. 295-302.
120. Llorente-Cortes, V., et al., *Signature of subclinical femoral artery atherosclerosis in peripheral blood mononuclear cells*. Eur J Clin Invest, 2014. **44**(6): p. 539-48.
121. Gratchev, A., et al., *Monocytes as a diagnostic marker of cardiovascular diseases*. Immunobiology, 2012. **217**(5): p. 476-82.
122. Tenorio-Lopez, F.A., et al., *Simultaneous determination of angiotensins II and 1-7 by capillary zone electrophoresis in plasma and urine from hypertensive rats*. Talanta, 2010. **80**(5): p. 1702-12.
123. Miller, S.A., D.D. Dykes, and H.F. Polesky, *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(3): p. 1215.

124. Rosas Peralta, M., et al., [*National Re-survey of Arterial Hypertension (RENAHTA). Mexican consolidation of the cardiovascular risk factors. national follow-up cohort*]. Arch Cardiol Mex, 2005. **75**(1): p. 96-111.
125. Malekzadeh, M.M., et al., *Prevalence, awareness and risk factors of hypertension in a large cohort of Iranian adult population*. J Hypertens, 2013. **31**(7): p. 1364-71; discussion 1371.
126. Juarez, M., et al., *Cardiovascular risk factors in women with primary Sjogren's syndrome: United Kingdom primary Sjogren's syndrome registry results*. Arthritis Care Res (Hoboken), 2014. **66**(5): p. 757-64.
127. Neves, A.L. and L. Couto, *Cardiovascular risk in overweight/obese and lean hypertensive patients*. Rev Port Cardiol, 2014. **33**(4): p. 223-8.
128. Pimenta, H.B. and A.P. Caldeira, [*Cardiovascular risk factors on the Framingham Risk Score among hypertensive patients attended by family health teams*]. Cien Saude Colet, 2014. **19**(6): p. 1731-9.
129. Toikka, J.O., et al., *Increased arterial intima-media thickness and in vivo LDL oxidation in young men with borderline hypertension*. Hypertension, 2000. **36**(6): p. 929-33.
130. Ruengsakulrach, P., et al., *Comparative histopathology of radial artery versus internal thoracic artery and risk factors for development of intimal hyperplasia and atherosclerosis*. Circulation, 1999. **100**(19 Suppl): p. II139-44.
131. Chowdhury, U.K., et al., *Histopathology and morphometry of radial artery conduits: basic study and clinical application*. Ann Thorac Surg, 2004. **78**(5): p. 1614-21.
132. Kowala, M.C., et al., *Cellular changes during hypertension: a quantitative study of the rat aorta*. Exp Mol Pathol, 1986. **45**(3): p. 323-35.
133. Rossi, M.A. and M. Colombini-Netto, *Chronic inhibition of NO synthesis per se promotes structural intimal remodeling of the rat aorta*. J Hypertens, 2001. **19**(9): p. 1567-79.
134. Simon, A. and J. Levenson, *Stratification of vascular risk in hypertension and therapeutic perspective*. Am J Hypertens, 1995. **8**(10 Pt 2): p. 45S-48S.
135. Violi, F., et al., *Relation between risk factors and cardiovascular complications in patients with peripheral vascular disease. Results from the A.D.E.P. study*. Atherosclerosis, 1996. **120**(1-2): p. 25-35.
136. Aledo, R., et al., *Molecular and functional characterization of LRP1 promoter polymorphism c.1-25 C>G (rs138854007)*. Atherosclerosis, 2014. **233**(1): p. 178-85.
137. Baumbach, G.L. and D.D. Heistad, *Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension*. Hypertension, 1989. **13**(6 Pt 2): p. 968-72.
138. Pasterkamp, G., Z.S. Galis, and D.P. de Kleijn, *Expansive arterial remodeling: location, location, location*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(4): p. 650-7.
139. Morishita, R., et al., *Antisense oligodeoxynucleotide inhibition of vascular angiotensin-converting enzyme expression attenuates neointimal formation:*

- evidence for tissue angiotensin-converting enzyme function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(4): p. 915-22.
140. Oparil, S. and E. Haber, *The renin-angiotensin system (second of two parts)*. *N Engl J Med*, 1974. **291**(9): p. 446-57.
 141. Oparil, S. and E. Haber, *The renin-angiotensin system (first of two parts)*. *N Engl J Med*, 1974. **291**(8): p. 389-401.
 142. Maejima, Y., et al., *Telmisartan, a unique ARB, improves left ventricular remodeling of infarcted heart by activating PPAR gamma*. *Lab Invest*, 2011. **91**(6): p. 932-44.
 143. Brilla, C.G., L.S. Matsubara, and K.T. Weber, *Antifibrotic effects of spironolactone in preventing myocardial fibrosis in systemic arterial hypertension*. *Am J Cardiol*, 1993. **71**(3): p. 12A-16A.
 144. Chan, S.L. and G.L. Baumbach, *Nox2 deficiency prevents hypertension-induced vascular dysfunction and hypertrophy in cerebral arterioles*. *Int J Hypertens*, 2013. **2013**: p. 793630.
 145. Dorffel, Y., et al., *Preactivated monocytes from hypertensive patients as a factor for atherosclerosis?* *Atherosclerosis*, 2001. **157**(1): p. 151-60.
 146. Ghattas, A., et al., *Monocytes in coronary artery disease and atherosclerosis: where are we now?* *J Am Coll Cardiol*, 2013. **62**(17): p. 1541-51.
 147. Marketou, M.E., et al., *Differential gene expression of bradykinin receptors 1 and 2 in peripheral monocytes from patients with essential hypertension*. *J Hum Hypertens*, 2014.
 148. Davies, P.F. and S.C. Tripathi, *Mechanical stress mechanisms and the cell. An endothelial paradigm*. *Circ Res*, 1993. **72**(2): p. 239-45.
 149. Nerem, R.M., *Vascular fluid mechanics, the arterial wall, and atherosclerosis*. *J Biomech Eng*, 1992. **114**(3): p. 274-82.
 150. Resnick, N., et al., *Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(10): p. 4591-5.
 151. Biino, G., et al., *Environmental and genetic contribution to hypertension prevalence: data from an epidemiological survey on Sardinian genetic isolates*. *PLoS One*, 2013. **8**(3): p. e59612.
 152. Echouffo-Tcheugui, J.B., et al., *Risk models to predict hypertension: a systematic review*. *PLoS One*, 2013. **8**(7): p. e67370.
 153. Toker, A., et al., *Investigation of oxidative stress markers in essential hypertension*. *Clin Lab*, 2013. **59**(1-2): p. 107-14.
 154. Pocathikorn, A., et al., *Influence of exonic polymorphisms in the gene for LDL receptor-related protein (LRP) on risk of coronary artery disease*. *Atherosclerosis*, 2003. **168**(1): p. 115-21.
 155. Marchetti, G., et al., *Contribution of low density lipoprotein receptor-related protein genotypes to coagulation factor VIII levels in thrombotic women*. *Haematologica*, 2006. **91**(9): p. 1261-3.

156. Vormittag, R., et al., *Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 polymorphism 663 C > T affects clotting factor VIII activity and increases the risk of venous thromboembolism*. *J Thromb Haemost*, 2007. **5**(3): p. 497-502.
157. Gaeta, B.A., I. Borthwick, and K.K. Stanley, *The 5'-flanking region of the alpha 2MR/LRP gene contains an enhancer-like cluster of Sp1 binding sites*. *Biochim Biophys Acta*, 1994. **1219**(2): p. 307-13.