



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

---

**ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE LOS GENES DEL  
SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA EN LA SUSCEPTIBILIDAD AL  
DESARROLLO DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL SISTÉMICA**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**NANCY LUCERO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. GILBERTO VARGAS ALARCÓN**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**COMITÉ TUTOR:**

**DRA. MARTHA FRANCO GUEVARA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**DRA. NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

Cd.Mx.,2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



## RECONOCIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser parte fundamental de mi desarrollo académico y personal, ya que en ella tuve la oportunidad de realizar los estudios de doctorado.

Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la UNAM, por todas sus facilidades.

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. Gilberto Vargas Alarcón en el Departamento de Biología Molecular, Laboratorio de Genómica del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

Periodo: 2010- 2016.

El Comité Tutor que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

- Dr. Gilberto Vargas Alarcón                      Facultad de Medicina
- Dra. Martha Franco Guevara                      Facultad de Medicina
- Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval                      Instituto de Investigaciones Biomédicas

A los miembros del Jurado:

- **PRESIDENTE:**                      Dra. Selva Lucia Rivas Arancibia
- **SECRETARIO:**                      Dr. Gilberto Vargas Alarcón
- **VOCAL:**                              Dr. Carlos Aguilar Salinas
- **VOCAL:**                              Dra. Martha Estela Pérez Rodríguez
- **VOCAL:**                              Dr. Ramcés Falfán Valencia

Este trabajo fue realizado con el apoyo otorgado al por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) al proyecto con No. 87856

Durante la realización de mis estudios de doctorado recibí una beca otorgada por el CONACYT con el número de registro 215572.



## Contenido

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>3. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL</b> .....	<b>7</b>
3.1. <i>Epidemiología de la HAS</i> .....	7
3.2. <i>Fisiopatología de la HAS</i> .....	10
3.2.1. Mecanismos involucrados en la regulación de la HAS .....	13
<b>3.2.1.1. Mecanismos renales</b> .....	13
<b>3.2.1.2. Mecanismos neurológicos</b> .....	14
<b>3.2.1.3. Mecanismos vasculares</b> .....	16
<b>3.2.1.4. Mecanismos hormonales</b> .....	20
3.3. <i>Abordaje genético de la HAS</i> .....	24
3.3.1. Estudios de ligamiento y asociación .....	29
3.3.2. Marcadores genéticos y su importancia.....	34
3.3.3. Importancia Biológica de los SNPs .....	36
3.4. <i>Sistema renina angiotensina (SRA)</i> .....	43
3.4.1. Características del angiotensinógeno (AGT) .....	47
<b>3.4.1.1. Asociación genética del AGT</b> .....	49
3.4.2. Características de la renina (REN).....	52
<b>3.4.2.1. Asociación genética de REN</b> .....	56
3.4.3. Características de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) .....	58
<b>3.4.3.1. Asociación genética de la ECA</b> .....	59
3.4.4. Características del ATR1 .....	61
<b>3.4.4.1. Asociación genética del ATR1</b> .....	63
3.4.5. Péptidos del SRA .....	64
<b>4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>71</b>
4.1. <i>Pregunta de Investigación</i> .....	71
<b>5. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>73</b>
<b>6. HIPÓTESIS</b> .....	<b>75</b>
<b>7. OBJETIVOS</b> .....	<b>75</b>
7.1. <i>General</i> .....	75
7.2. <i>Específicos</i> .....	75
<b>8. METODOLOGÍA</b> .....	<b>77</b>

8.1. <i>Diseño</i> .....	77
8.2. <i>Población</i> .....	77
8.3. <i>Tamaño de la muestra</i> .....	78
8.4. <i>Antropometría</i> .....	79
8.5. <i>Parámetros bioquímicos</i> .....	79
8.6. <i>Estudio genético</i> .....	80
8.6.1. Selección de SNPs.....	80
8.6.2. Extracción de ADN.....	82
8.6.3. Detección de SNP's.....	82
8.6.4. Análisis bioinformático.....	83
8.7. <i>Estudio molecular</i> .....	83
8.7.1. Cuantificación de ECA.....	83
8.7.2. Cuantificación de Ang II y Ang (1-7).....	84
8.8. <i>Análisis estadístico</i> .....	84
8.8.1. Análisis descriptivo y de asociación.....	84
8.8.2. Modelos genéticos.....	85
8.8.3. Haplotipos y TagSNPs.....	86
<b>9. RESULTADOS</b> .....	<b>87</b>
9.1. <i>Características de la muestra de estudio</i> .....	87
9.2. <i>SNPs del gen AGT</i> .....	88
9.2.1. DL del gen <i>AGT</i> .....	89
9.2.2. Cuantificación de Ang II y Ang (1-7).....	91
9.3. <i>SNPs del gen REN</i> .....	92
9.3.1. DL del gen <i>REN</i> .....	93
9.4. <i>SNPs del gen ECA</i> .....	94
9.4.1. DL del gen <i>ECA</i> .....	97
9.4.2. Cuantificación de la <i>ECA</i> .....	102
9.5. <i>SNPs del gen ATR1</i> .....	104
9.5.1. DL del gen <i>ATR1</i> .....	106
<b>10. DISCUSIÓN</b> .....	<b>109</b>
10.1. <i>SNPs del gen ATR1</i> .....	110
10.2. <i>SNPs del gen ECA</i> .....	113
10.3. <i>SNP del gen REN</i> .....	116

10.4. SNPs del gen AGT.....	118
<b>11. CONCLUSIONES.....</b>	<b>123</b>
<b>12. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>127</b>
<b>13. ANEXOS .....</b>	<b>137</b>
13.1. Artículos publicados.....	137



## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Acido desoxirribonucleico	<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>AGT</b>	Angiotensinogeno	<b>Ang</b>	Angiotensina
<b>ATR1</b>	Receptor tipo 1 de angiotensina II	<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>BDK</b>	Bradigidinas	<b>DM2</b>	Diabetes Mellitus tipo 2
<b>CV</b>	Enfermedades Cardiovasculares	<b>r<sup>2</sup></b>	Coeficiente de correlación
<b>X<sup>2</sup></b>	Chi-cuadrada	<b>D'</b>	Coeficiente Lewontin
<b>ENSA</b>	Encuesta Nacional de Salud	<b>GWAS</b>	Genome Wide Asociation Scan
<b>ENSANUT</b>	Encuesta de Salud y Nutrición	<b>GWLS</b>	Genome Wide Linkage Scan
<b>INCICH</b>	Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez	<b>JNC8</b>	Eighth Joint National Committee
<b>RPR</b>	Receptor de (pro)renina	<b>GEA</b>	Genética de la enfermedad aterosclerosa
<b>GC</b>	Gasto cardiaco	<b>EAC</b>	Enfermedad arterial coronaria
<b>HWE</b>	Equilibrio de Hardy-Weinberg	<b>CMLV</b>	Células del musculo liso vascular
<b>HAS</b>	Hipertensión arterial Sistémica	<b>DL</b>	Desequilibrio de ligamiento
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal	<b>ECA</b>	Enzima convertidora de angiotensina
<b>INEGI</b>	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática	<b>ET</b>	Endotelina
<b>iNOS</b>	óxido nítrico sintasa inducible	<b>pC</b>	Valor de p corregido
<b>IRAP</b>	aminopeptidasa regulada por insulina	<b>AIC</b>	Criterio de información akaike
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baja Densidad	<b>CNVs</b>	Variantes del número de copia
<b>MAPK</b>	Proteína quinasa activada por mitógenos	<b>CGH</b>	Hibridación genómica comparativa
<b>LDL<sub>ox</sub></b>	Lipoproteína de baja densidad oxidadas	<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad
<b>NHANES</b>	National Health and Nutrition Examination Survey	<b>IC</b>	Intervalo de confianza
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud	<b>IL</b>	Interleucina
<b>PA</b>	Presión arterial	<b>TDT</b>	Test de desequilibrio de transmisión
<b>PAS</b>	presión arterial sistólica	<b>MCP-1</b>	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
<b>PCR-TR</b>	PCR en tiempo real	<b>NADH</b>	Nicotín adenín dinucleótido
<b>PKC</b>	proteína quinasa C	<b>NF-κB</b>	factor nuclear de transcripción κB
		<b>ON</b>	óxido nítrico
		<b>PAD</b>	presión arterial diastólica
		<b>Pb</b>	Pares de bases

<b>RP</b>	Resistencia Periférica	<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>SR</b>	Serina/Arginina	<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>RNPnp</b>	Ribonucleoproteína nuclear pequeña	<b>RNAM</b>	Ácido Ribonucleico mensajero
<b>SRA</b>	Sistema Renina angiotensina	<b>RFLP's</b>	Fragmentos de restricción Polimórfica
<b>SSA</b>	Secretaría de Salud.	<b>RM</b>	Razón de momios
<b>TSS</b>	Sitio de inicio de la transcripción	<b>NDM</b>	Mutaciones terminadoras
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	factor de necrosis tumoral $\alpha$	<b>STRs</b>	Short Tandem Repeats
<b>GPCRs</b>	Receptores acoplados a proteínas G	<b>SNP</b>	Polimorfismo de un solo Nucleótido
<b>ESE, ESS</b>	Potenciador de Splicing Exónico, Silenciador de Splicing Exónico	<b>TTS</b>	Factores de transcripción
<b>kDa</b>	Kilo Daltones	<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante- $\beta$
<b>SNS</b>	Sistema nervioso simpático	<b>UTR</b>	Región sin transcribir
<b>GR o</b>	Factor del receptor de glucocorticoides	<b>ISE, ISS</b>	Potenciador de Splicing Intrónico, Silenciador de Splicing Intrónico
<b>GCCR</b>		<b>SRAA</b>	Sistema Renina Angiotensina
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central		Aldosterona
		<b>SNP</b>	Polimorfismo de un solo nucleótido o <i>SNP (Single Nucleotide Polymorphism)</i>

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. CASCA DA DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA (SRAA). .....	46
FIGURA 2. CARACTERÍSTICAS DEL GEN Y PROTEÍNA DEL ANGIOTENSINOGENO. ....	48
FIGURA 3. CARACTERÍSTICAS DEL GEN Y PROTEÍNA DE LA RENINA. ....	56
FIGURA 4. CARACTERÍSTICAS DEL GEN Y PROTEÍNA DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA (ECA). .....	59
FIGURA 5. CARACTERÍSTICAS DEL GEN Y PROTEÍNA DEL RECEPTOR TIPO 1 PARA ANGIOTENSINA II (ATR1). .....	63
FIGURA 6. MAPA DE DL DEL GEN <i>AGT</i> . .....	90
FIGURA 7. NIVELES DE ANG (1-7) Y ANG II EN LOS HAPLOTIPOS DEL GEN <i>AGT</i> . ....	92
FIGURA 8. MAPA DE DL DEL GEN <i>REN</i> . .....	93
FIGURA 9. MAPA DE DL DEL GEN <i>ECA</i> . .....	98
FIGURA 10. MAPA DE DL DEL GEN <i>ECA</i> .....	100
FIGURA 11. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LAS CONCENTRACIONES DE ECA EN EL SUERO DE INDIVIDUOS CON HIPERTENSIÓN DE ACUERDO A LA CLASIFICACIÓN POR HAPLOTIPO. ....	103
FIGURA 12. MAPA DE DL DEL GEN <i>ATR1</i> . .....	107



## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. POLIMORFISMOS SELECCIONADOS PARA EL ESTUDIO.....	81
TABLA 2. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO. ....	88
TABLA 3. DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN <i>AGT</i> .....	89
TABLA 4. FRECUENCIA DE HAPLOTIPOS DEL GEN <i>AGT</i> . ....	90
TABLA 5. MEDIDAS DE DL ENTRE POLIMORFISMOS DEL GEN <i>AGT</i> ; VALORES $D'$ , LOD Y $R^2$ .....	91
TABLA 6. DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN <i>REN</i> . ....	93
TABLA 7. FRECUENCIA DE HAPLOTIPOS DEL GEN <i>REN</i> . ....	94
TABLA 8. DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN <i>ECA</i> .....	95
TABLA 9. ASOCIACIÓN ENTRE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN <i>ECA</i> Y MODELOS DE HERENCIA..	96
TABLA 10. EVALUACIÓN DE RIESGOS DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN <i>ECA</i> USANDO EL MODELO DE HERENCIA DOMINANTE. ....	97
TABLA 11. MEDIDAS DE DL ENTRE POLIMORFISMOS DEL GEN <i>ECA</i> ; VALORES $D'$ , LOD Y $R^2$ ....	99
TABLA 12. MEDIDAS DE DL ENTRE POLIMORFISMOS DEL GEN <i>ECA</i> ; VALORES $D'$ , LOD Y $R^2$ ..	100
TABLA 13. FRECUENCIA DE HAPLOTIPOS DEL GEN <i>ECA</i> .....	101
TABLA 14. ANÁLISIS DE HAPLOTIPO DE RIESGO EN FUNCIÓN DEL MODELO DE HERENCIA EN INDIVIDUOS HIPETENSOS Y NORMOTENSOS. ....	101
TABLA 15. EVALUACIÓN DE RIESGO DE LOS HAPLOTIPOS DEL GEN <i>ECA</i> POR DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS USANDO EL MODELO DE HERENCIA CO-DOMINANTE .....	102
TABLA 16. EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE <i>ECA</i> POR DISTRIBUCIÓN DE HAPLOTIPOS .....	103
TABLA 17. DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN <i>ECA</i> .....	104
TABLA 18. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO RS5182 EN FUNCIÓN DE LOS MODELOS DE HERENCIA. .....	105
TABLA 19. EVALUACIÓN DE RIESGO DEL POLIMORFISMO RS5182 UTILIZANDO EL MODELO DE HERENCIA CO-DOMINANTE. ....	105
TABLA 20. FRECUENCIA DE HAPLOTIPOS DEL GEN <i>ATR1</i> . ....	107
TABLA 21. MEDIDAS DE DL ENTRE POLIMORFISMOS DEL GEN <i>ATR1</i> ; VALORES $D'$ , LOD Y $R^2$ .	108



## 1. RESUMEN

Actualmente los eventos cardiovasculares catastróficos constituyen un problema de salud pública a nivel mundial. La Hipertensión Arterial Sistémica (HAS) es uno de los principales factores de riesgo que contribuye a la proliferación de estos eventos. La HAS es un padecimiento crónico degenerativo, con etiología multifactorial, en el que intervienen factores genéticos y ambientales. En cuanto a los factores genéticos, su contribución a la variabilidad genotípica se ha estimado entre un 30% y 60%. Estudios de ligamiento genético en familias con múltiples casos han detectado diversos genes candidatos relacionados con HAS. Ejemplo de lo anterior, son los genes que codifican para los componentes que regulan las funciones del sistema renina angiotensina (SRA), estos presentan variantes que alteran su secuencia y afectan su función, uno de sus impactos se observa en la regulación de la presión arterial por alteración de la homeostasis y el tono vascular. La combinación de estas variantes conduce a un complejo mecanismo que lleva a alteraciones en la estructura de la pared vascular y del músculo cardiaco, lo cual desencadena la presencia de factores aterogénicos, inflamatorios e inmunológicos que representan mayor riesgo y complicaciones cardiovasculares.

Con el fin de establecer una correlación genética en la susceptibilidad o resistencia al desarrollo de HAS en población mexicana, se evaluó la asociación de polimorfismos de los genes candidatos del SRA; el angiotensinógeno (*AGT*), renina (*REN*), enzima convertidora de angiotensina (*ECA*) y receptor tipo 1 para Angiotensina II (*ATR1*). Para ello se estudiaron a 610 adultos; 239 hipertensos ( $PA \geq 140/90$ ), y 371 normotensos ( $PA \leq 120/90$ ), a los cuales se les extrajo ADN como insumo principal.

En el gen *ECA*, se detectaron cinco polimorfismos de riesgo para HAS, estos conformaron un haplotipo de riesgo (H2: GGATG) asociado al aumento de los niveles plasmáticos de la *ECA*. En el gen *ATR1*, el alelo C del rs5182 podría estar involucrado en el riesgo de desarrollar HAS, en este gen se identificó un haplotipo de riesgo con los polimorfismos rs5182 y rs5183 (CA). En el gen *AGT*, se detectó un haplotipo de protección asociado con una concentración elevada de péptidos Ang (1-7) y disminución de Ang II. Las variantes polimórficas del gen de la *REN*; rs5705 y rs5707, presentaron una distribución de frecuencias similares en ambos grupos de estudio.

Los resultados obtenidos contribuyen de alguna manera a profundizar sobre la distribución de frecuencias polimórficas para la caracterización de la población mexicana, así como a conocer cuáles polimorfismos pueden estar asociados al riesgo de desarrollar HAS.

Bajo esta perspectiva, el presente estudio sobre los genes que codifican para proteínas relevantes en la patogénesis de la HAS es muy importante, pues permite definir marcadores de susceptibilidad o resistencia a este padecimiento, así como proveer mecanismos diagnósticos adicionales y de información pronóstica relevante que puedan ser un elemento crucial para el diseño de políticas de salud encaminadas a la atención de la HAS en cuanto a un diagnóstico oportuno, a la prevención y plantear mejores y más dirigidos tratamientos.

## 2. INTRODUCCIÓN

El presente estudio parte de la importancia que tiene el impacto de la Hipertensión Arterial Sistémica (HAS) a nivel mundial y en nuestro país (Whitworth, World Health Organization, International Society of Hypertension Writing Group, 2003), ya que representa uno de los principales problemas de salud pública. En los últimos años, se ha observado un incremento en la prevalencia e incidencia de la HAS en adultos, para quienes se ha convertido en un padecimiento crónico degenerativo que disminuye la esperanza de vida. La HAS, es considerada como una señal de alerta de alto riesgo, su progresión está fuertemente asociada con la función y estructura de vasos sanguíneos (Schork, 1997). Este enemigo silencioso generalmente no causa síntomas durante muchos años, hasta que lesiona un órgano vital como el corazón, el cerebro o los riñones, lo que a largo plazo puede llevar a una muerte prematura (Collins *et al.*, 1990).

La hipertensión es un padecimiento que participa en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares (Ettehad *et al.*, 2016). En diversos estudios se ha documentado que el tratamiento adecuado de la hipertensión ha logrado disminuir en un 40% el riesgo o la probabilidad de desarrollar infarto cerebral y un 15% de reducción en el riesgo a desarrollar un infarto al miocardio (Collins *et al.*, 1990). A pesar de que el tratamiento de la hipertensión ha mostrado prevenir el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, dicho tratamiento en muchos casos sigue siendo inadecuado, debido al bajo control de la presión o a la respuesta que presentan algunos individuos.

La HAS es una enfermedad compleja en la cual hay una interacción importante entre factores genéticos y ambientales para producir su desencadenamiento. La contribución genética a la variación en la presión sanguínea se estima entre 30 y 60% (Lifton, 1995). Diversos estudios de ligamiento genético en familias con múltiples casos han permitido la detección de numerosos genes candidatos como responsables de este padecimiento (Jeunemaitre *et al.*, 1992). Un grupo de estos genes son aquellos que codifican para los componentes del Sistema Renina Angiotensina (SRA) (Corvol and Jeunemaitre, 1997; Karet and Lifton, 1997). El SRA es un sistema hormonal que ayuda a regular a largo plazo la presión sanguínea y el volumen extracelular corporal.

Actualmente, se sabe que los genes que codifican para las proteínas que forman el SRA presentan variaciones genéticas, la mayoría considerados como polimorfismos de un sólo nucleótido o *SNP* (*Single Nucleotide Polymorphism*). Estas variantes tienen un efecto

pequeño por separado sobre la presión arterial, pero su combinación posee un efecto acumulativo que podría dar lugar a un aumento en la presión sanguínea asociado a un mayor riesgo de episodios cardiovasculares y enfermedades cerebrovasculares.

En la primer parte de este trabajo se explicarán los principales mecanismos de regulación de la presión arterial a nivel de las funciones fisiológicas y la complejidad de estas, ya que dependen de las acciones integradas de los sistemas cardiovasculares, renales, neurales y endocrinos. Al respecto, se hizo una revisión de la participación de estos sistemas, la atención se centró en el sistema hormonal de regulación más importante, el SRA, ya que regula a largo plazo la presión sanguínea y el volumen extracelular corporal, además que los componentes moleculares de este sistema son los principales blancos de fármacos antihipertensivos. Al mismo tiempo, se describe de manera más específica, es decir, a nivel molecular cuatro componentes principales de este sistema; el angiotensinógeno (AGT), la renina (REN), la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y el receptor tipo I de angiotensina II (ATR1). Se llevó a cabo una breve revisión sobre los hallazgos en diversos estudios poblacionales, en donde los resultados son muy heterogéneos, esto por la amplia diversidad de las poblaciones donde se han replicado este tipo de estudios. En la población mexicana no existen estudios sobre la relación de los polimorfismos de los genes del SRA en la susceptibilidad al desarrollo de HAS, y las observaciones realizadas en otras poblaciones no son aplicables a la población de México debido a que la estructura genética del mestizo mexicano es distinta o particular.

El estudio de los polimorfismos genéticos ha ido en aumento. A partir de los datos generados en múltiples estudios se han logrado entender parcialmente los mecanismos de susceptibilidad a ciertas enfermedades, estos estudios de asociación han acelerado el conocimiento en el contexto funcional de la participación de los polimorfismos localizados en ciertos genes.

Son estos los elementos que motivaron y fundamentan el interés e importancia para realizar el presente estudio. Para ello, se planteó que si las variantes de los genes del angiotensinógeno (AGT), renina (REN), enzima convertidora de angiotensina (ECA), receptor tipo I de angiotensina II (ATR1) pudieran ser biomarcadores para el desarrollo o susceptibilidad a padecer HAS y diferenciar a los individuos hipertensos y normotensos, con el propósito de identificar en principio el perfil genético de la población mexicana y al mismo tiempo contribuir a la detección de la población en riesgo.

A lo largo de la historia de la ciencia ha sido necesario acercarse a la biología de las enfermedades comunes para ligar, de una manera más completa los genotipos individuales a fenotipos complejos. Por lo que el beneficio potencial de este trabajo será por un lado profundizar en el conocimiento sobre el papel que juegan los componentes del SRA en relación con las diferentes variantes genéticas asociadas, así como, identificar los factores metabólicos y bioquímicos asociados a estas variantes genéticas que podrían contribuir al desarrollo de este padecimiento. Lo anterior, tiene como propósito prevenir y mejorar el pronóstico, diagnóstico y tratamiento de HAS en el paciente, y así evitar el desarrollo de consecuencias graves.



### 3. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

#### 3.1. Epidemiología de la HAS

La hipertensión, también conocida como presión arterial alta o elevada, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), representa uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, ya que por su frecuencia y gravedad se considera una de las principales entidades que contribuye a la carga asociada al riesgo de sufrir un evento cardiovascular, insuficiencia renal, accidente cerebrovascular, discapacidad y mortalidad prematura. En el mundo, las enfermedades cardiovasculares son responsables de aproximadamente 17.3 millones de muertes anuales, casi un tercio del total de las defunciones que se producen a nivel global (Whitworth, World Health Organization, International Society of Hypertension Writing Group, 2003). Las complicaciones por HAS causan anualmente 9.4 millones de muertes. El 80% de las defunciones son por enfermedades no transmisibles y se producen en los países de ingresos bajos y medios. La HAS es responsable de al menos el 45% de las muertes a nivel mundial, estas son debidas a enfermedades del corazón y 51% de los fallecimientos ocurren por accidente cerebrovascular, con estas cifras se estima que cada 4 segundos ocurre un evento coronario y cada 5 segundos un evento cerebro vascular (Danaei G, *et al.* 2011; OMS, 2011).

Este padecimiento afecta a más de uno de cada tres adultos de 25 o más años de edad, es decir alrededor del 40% (Lim SS, *et al.*, 2012). En las diferentes poblaciones la prevalencia de la HAS es más alta en la región de África, con un 46% en adultos mayores de 25 años y una prevalencia más baja en América, con un 35%.

Estudios en diversas poblaciones han demostrado que a igual nivel de presión arterial (PA), el riesgo de eventos cardiovasculares varía de un país a otro, por lo que la HAS es un síndrome de etiología múltiple, que involucra procesos fisiológicos complejos, factores ambientales, genéticos e intrínsecos como raza y género, que convergen con otras condiciones de salud como son el sobrepeso, obesidad, diabetes y síndrome metabólico, así como estilos de vida que modifican la alimentación, el sedentarismo y hábitos nocivos como el consumo de tabaco o alcoholismo (OMS, 2002).

El diagnóstico de la HAS, se basa en la medición de la presión arterial y la presencia de valores superiores a los considerados como normales. Actualmente la OMS en conjunto

con la Sociedad Internacional de Hipertensión Arterial (ISH), y JNC8, la clasifica como una elevación persistente de la presión arterial sistólica (PAS) con niveles  $\geq 140$  mmHg y presión arterial diastólica (PAD)  $\geq 90$  mmHg, esta es clasificada por diferentes estadios o grados y diversas recomendaciones, por edad o algunos otros factores adicionales. Esta elevación es debida al incremento de la resistencia vascular periférica y se traduce en daño vascular sistémico. De acuerdo a las cifras de PA, estas pueden variar entre algunos grupos de edad, y el riesgo de enfermedades cardiovasculares se duplica por cada 20/10 mmHg de incremento en la PA (OMS, 2013b).

En adultos mexicanos las cifras de PA de acuerdo a los resultados de ENSANUT entre el año 2000 y 2006, mostraron que la prevalencia de HAS incremento un 19.7%. En la ENSANUT 2012 se consideró que un adulto tenía HAS cuando reportó diagnóstico de un médico o presentaba cifras de PAS $\geq 140$  mmHg y/o PAD $\geq 90$  mmHg.

De acuerdo con estos criterios la HAS afecta a 1 de cada 3 adultos mexicanos, siendo la prevalencia actual en México de 31.5% (IC 95%; 29.8-33.1).

La asociación frecuente de otros factores de riesgo, como diabetes, dislipidemia, tabaquismo, obesidad y el sedentarismo, incrementa sensiblemente el riesgo cardiovascular del hipertenso, por lo que es importante su evaluación global en cada paciente en particular, recomendando emplear estratificación por riesgo y pronóstico para su categorización en función de la probabilidad de sufrir un evento cardiovascular.

Esto se ha visto a nivel de estudios epidemiológicos en donde los datos muestran que la HAS es más alta en adultos con factores de riesgo adicionales como son; obesidad (42.3%; IC 95%; 39.4-45.3) que lo que muestran los adultos con índice de masa corporal (IMC) normal (18.5%; IC 95% 16.2-21.0), y en adultos con diabetes (65.6%; IC 95% 60.3-70.7) que en los adultos sin esta enfermedad (27.6%, IC 95% 26.1-29.2). Además, de los adultos que resultaron hipertensos, 47.3% desconocía que padecía HAS.

La tendencia de la HAS del 2006 al 2012 se ha mantenido estable tanto en hombres (32.4 vs 32.3%) como en mujeres (31.1vs.30.7%) y la proporción de individuos con diagnóstico previo no ha aumentado. Se han conservado las diferencias entre las prevalencias de los grupos de mayor y menor edad, en 2012 la distribución de la prevalencia de HAS fue 4.6 veces más baja en el grupo de adultos de 20 a 29 años de edad ( $p < 0.05$ ) que en el grupo de adultos de 70 a 79 años.

En nuestro país de acuerdo a la distribución geográfica, por regiones, localidades y nivel socioeconómico la prevalencia de HAS varía, donde se registró una prevalencia significativamente más alta ( $<0.05$ ) es en la región norte del país, que en el sur (36.4%; 28.5%), en las localidades urbanas que en las rurales (31.9%; 29.9%), y en el nivel socioeconómico alto comparado con el nivel bajo (31.1%; 29.7%). Los adultos con mayor vulnerabilidad y pobreza presentan prevalencias más bajas de HAS en el ámbito nacional y son los grupos que tienen un mayor porcentaje de HAS controlada ( $<140/90$  mmHg); por ejemplo, los adultos de la región sur tienen una prevalencia significativamente mayor de control de la HAS (56.0%) que los del norte (45.8%), los de localidad rural (51.3%) que los de la urbana (48.3%) y los de nivel socioeconómico bajo (53.2%) que los de nivel socioeconómico alto (50.3%). De acuerdo al nivel de escolaridad la prevalencia de HAS fue del 44.1% en adultos con primaria o menos estudios, comparada con un 23.5% con preparatoria o más nivel de estudios. Esta menor prevalencia y mayor porcentaje de control puede ser atribuido a otros factores causales de la HAS como son; obesidad, tabaquismo, consumo de sodio y actividad sedentaria, estos complican su control.

De los adultos con HAS diagnosticada por un médico, sólo 73.6% reciben tratamiento farmacológico y menos de la mitad de estos adultos tienen la enfermedad bajo control.

Al categorizar la atención médica por institución de salud a los que se encuentran afiliados los adultos, existen diferencias en las prevalencias de HAS: ISSSTE 34.4%, Secretaría de Salud 45.4%, IMSS 46.6%, e instituciones privadas 54.0% reportaron 22.4 millones de adultos de 20 años o más con HAS; es decir un 31.5%.

En México, estas enfermedades han sido caracterizadas epidemiológicamente a partir de las Encuestas Nacionales de Salud de los años 2000 a 2012. Aunque el diagnóstico oportuno ha aumentado en el caso de enfermedades como la diabetes, la proporción de individuos con diagnóstico oportuno de HAS no presentan esta misma tendencia en los últimos años, siendo este diagnóstico muy importante para facilitar la meta de un control oportuno a través de medidas de estilo de vida, ya que recibir tratamiento farmacológico no garantiza tener un mayor o mejor control de la HAS, sólo alrededor de la mitad de quienes lo reciben tienen cifras PAS y PAD dentro del rango que establece la Norma Oficial Mexicana (Frenk J;1991) y los estándares internacionales como el Eighth Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC8) y la American Heart Association. (Chobanian AV;2003, Kurtz TW, 2005). En nuestro país la HAS es una enfermedad muy frecuente, su importancia como

factor de riesgo cardiovascular adquiere trascendencia significativa en salud pública ya que las estadísticas sobre la prevalencia de HAS han resultado alarmantes, por lo que se requiere su evaluación, vigilancia, y en lo posible revertirla.

### **3.2. Fisiopatología de la HAS**

La HAS es compleja ya que en ella existe una participación importante de mecanismos donde intervienen diversas moléculas, tejidos y órganos (Brook RD, *et al.*, 2000). La necesidad de regular la PA se debe a que en todo momento este parámetro debe alcanzar una magnitud que permita asegurar la perfusión de todos los tejidos. Como en el organismo la perfusión de la circulación cerebral es la que presenta mayor dificultad, el nivel de presión está determinado por esta circulación. La PA depende de la resistencia periférica (RP) y del volumen minuto o gasto cardíaco (GC), el cual a su vez depende del volumen sistólico y de la frecuencia cardíaca (FC). Cuanta más alta es la PA, más tiene que trabajar el corazón para bombear la sangre. La HAS, es una afección en la cual la presión en los vasos sanguíneos es continuamente alta y sostenida. La sangre es transportada desde el corazón a todo el organismo por medio de los vasos sanguíneos, cada vez que el corazón late, bombea sangre a los vasos y arterias, cuanto mayor sea la presión el corazón trabaja más duro para bombear la sangre.

Por lo que la regulación de la PA resulta ser muy compleja, ya que consta de múltiples sistemas de control, que prácticamente involucran a todo el organismo y que están interrelacionados entre sí, esto dificulta conocer bien su funcionamiento. Hasta el día de hoy, se continúa avanzando para identificar con precisión los mecanismos que intervienen en la regulación de la PA, y con ello la causa específica de la HAS (Guyton AC; 1992)

Si no se controla, la presión alta puede provocar dilataciones, aneurismas y zonas de debilidad en la pared vascular, lo que aumenta las probabilidades de obstrucción y rotura, causando fugas de sangre estas pueden llevarse acabo a nivel de el cerebro; dando como consecuencia accidentes cerebrovasculares, ceguera, deterioro cognitivo; a nivel del riñón puede causar insuficiencia renal; y en el corazón llegar a causar infarto de miocardio, hipertrofia ventricular y finalmente insuficiencia cardíaca (Velázquez MO, *et al.*, 2002).

El comportamiento hemodinámico de la HAS en adultos jóvenes es el predominio de la presencia de hipertensión sistólica común en varones entre los 17 y 25 años. Debido a alteración en el aumento del GC y a la rigidez de la aorta, pero no presentan alteraciones

estructurales cardiacas ni aórticas, esto podría deberse a la sobreactividad del sistema nervioso simpático (SNS). En los adultos mayores a 40 años se presenta un aumento de presión diastólica, con PAS normal o elevada, denominándose hipertensión esencial o sistémica, es más común en varones y se asocia con aumento de peso corporal y desarrollo de síndrome metabólico (SM), este tipo de hipertensión diastólica a menudo termina como hipertensión sistólica y diastólica. Esto puede deberse a la disminución en la excreción renal de sodio que provoca expansión del plasma, acoplado esto a una sobreactividad vasoconstrictora local por la estimulación neurohormonal. En cuanto a individuos de edad avanzada el tipo de HAS es predominantemente sistólica por arriba de 140 mmHg y diastólica por debajo de 90 mmHg, presente más a menudo en mujeres después de los 55 años. A largo plazo se puede desarrollar disfunción diastólica del ventrículo izquierdo. El mecanismo es una compleja combinación de rigidez y reducción del diámetro de la aorta y un rápido retorno de la onda de presión. Es probable que este grupo de edad tenga influencia de un ambiente de estrés, esto sustentado por estudios en población urbana que presentan cifras de presión de pulso muy amplias (Brook RD, et al., 2000). Es importante considerar que existen casos de HAS que surgen después de los 60 años y que no representan la evolución de la hipertensión de los otros grupos de menor edad. Por lo que la HAS se clasifica etiológicamente en dos grupos: primaria o esencial y secundaria. La distribución de estos tipos de HAS se encuentra distribuida: en un 5% la hipertensión secundaria; es aquella cuyas causas son conocidas, entre las que se incluyen alteraciones reno vasculares, coartación de la aorta, hiperaldosteronismo o hipertiroidismo o bien inducida por drogas o fármacos, o en algunos casos por mutaciones o síndromes específicos (Akpunonu *et.al.*, 1996). La etiología de la hipertensión primaria o esencial esta presente en un 95% de los casos, la causa puede ser multifactorial, aunque existen factores ambientales y genéticos que contribuyen al mantenimiento de la elevación de PA (Carretero y Oparil, 2000). La HAS es un desorden heterogéneo, puede haber considerables variaciones en la participación de los factores causales en diferentes periodos y estadios, y en diferentes individuos.

Los factores liberados por el endotelio juegan un importante papel en la regulación de la homeostasis de la pared vascular, estas variaciones en la función endotelial son consideradas uno de los principales factores responsables del incremento y mantenimiento de la presión arterial. Así, en determinados modelos de hipertensión se ha observado una disminución de las relajaciones dependientes de endotelio (Marín y Rodríguez-Martínez, 1997). Sin embargo, se han descrito también respuestas

aumentadas (Dowell et.al., 1999) y normales (Lüscher et.al., 1988) dependiendo del lecho vascular o el modelo de hipertensión estudiado. Además de la disfunción endotelial observada con la hipertensión, se han observado también diferencias en las respuestas contráctiles a diferentes agonistas. Así, podemos encontrar respuestas aumentadas tras la estimulación con diferentes agonistas (Dowell et.al., 1999; Dohi et.al., 1996; Zerrouk et.al., 1998) o respuestas disminuidas (Rossoni et.al., 2002a; 2002b). Por otra parte, numerosos estudios han relacionado la hipertensión con un incremento del tono simpático y con alteraciones en la biodisponibilidad de  $Ca^{2+}$ , entre otras modificaciones (Marín, 1993). Además de los cambios funcionales, la HAS produce cambios estructurales y bioquímicos en las distintas capas de la pared vascular. Las alteraciones estructurales, como el remodelado vascular, que ocurren en los vasos de resistencia, van a ser consecuencia o causa del incremento de la resistencia periférica (Mulvany, 2002). Los vasos están formados por tres capas bien diferenciadas, la íntima, media y adventicia. La capa íntima está formada por el endotelio y está separada de la capa media, formada básicamente por células musculares lisas, por la lámina elástica interna. La adventicia está formada por terminaciones nerviosas, fibroblastos y fibras de colágeno (Mulvany, 2005). Muchos estudios han demostrado que la HAS está asociada a un remodelado de los vasos de resistencia. Así, puede observarse remodelado eutrófico, cuando se produce una disminución del diámetro externo e interno (lumen) y/o un aumento en la relación media: lumen, sin observar aumento en el área de la sección media, y acompañado de un reordenamiento celular (Schiffrin y Touyz, 2004). Por otro lado, también podemos encontrar un remodelado hipertrófico cuando se produce un aumento en el área de la sección media, asociado a un aumento de material. En este caso, se produce un aumento en la síntesis de matriz extracelular, sobre todo de proteínas como el colágeno y la fibronectina. Además, la actividad de enzimas encargadas de la degradación de la matriz extracelular, metaloproteinasas, también puede estar disminuida con la hipertensión, de forma que el aumento en la síntesis de proteínas de matriz se deba a una disminución en su degradación y no a un aumento en su producción (Touyz, 2005).

### **3.2.1. Mecanismos involucrados en la regulación de la HAS**

Dentro de los principales mecanismos fisiopatológicos extrínsecos e intrínsecos que involucran la génesis o mantenimiento de la HAS en la regulación del tono vascular específicamente del tono muscular arteriolar; están los mecanismos renales, neurológicos, del sistema nervioso simpático (SNS), vasculares y hormonales, participando activamente el sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA).

#### **3.2.1.1. Mecanismos renales**

La función principal del riñón es mantener el balance de sodio y agua, regulando el volumen y composición de los líquidos extracelulares. Las alteraciones en el riñón pueden deberse a una cantidad excesiva de sodio en la dieta, hasta algún trastorno congénito que afecte los transportadores de sodio. Lo que genera una incapacidad del riñón para eliminar el sodio sobrante que permanece en circulación, este exceso de sodio provoca aumento en el volumen plasmático, GC y un estado de hiperperfusión tisular. Como respuesta a esto, la autorregulación del flujo sanguíneo local induce vasoconstricción arteriolar que limita la hiperperfusión y aumenta las resistencias arteriolas y la PA. Una vez que aumentan las RP, el GC vuelve a ser normal o inapropiadamente normal. Existen hallazgos que apoyan la conversión del estado hiperkinético, al incremento de la resistencia vascular a lo largo del tiempo (Pimenta E; 2006)

Dentro de este mecanismo las ATPasas de sodio y potasio, que es una proteína integral de membrana del músculo liso vascular son responsables de la vasoconstricción, aumento de la contractilidad e hipertrofia cardíaca y vascular. Las células glomerulares adrenales expuestas a altas cantidades de sodio, liberan glucósidos endógenos que inhiben la ATPasa, permiten un mayor flujo de sodio que incrementa el calcio citosólico (intercambiador  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ ; NCX), facilitando la contracción muscular, cuando se inhibe este intercambiador, se observa una reducción de la PA en ratas (Iwamoto T; 2007).

Existen mecanismo no relacionados al volumen sanguíneo asociados a la hipertensión provocada por el sodio alto. El aumento de sodio sérico induce aumento en el tono simpático, inflamación renal por liberación de NF-kB, producción de TGF-B, expresión del receptor de angiotensina II tipo 1 (ATR1), y un estado inflamatorio cardíaco, renal y vascular mediado por aldosterona.

No todos los adultos expuestos a una dieta alta en sal desarrollan HAS, con la misma severidad, existe un espectro de individuos muy sensibles, y otros poco sensibles o resistentes a la sal. Esta sensibilidad puede variar cuando actúan otros factores como la obesidad, insuficiencia renal o una dieta baja en potasio, afectando la reabsorción de sodio a través de múltiples mecanismos. Estudios en humanos y en modelos animales confirman múltiples mutaciones o variantes genéticas, en transportadores o a nivel de riñón, implicadas en la hiper e hipotensión, como prueba fundamental de la participación del balance de sodio en el origen y mantenimiento de la HAS (Smallegange;2004).

En cuanto a la curva de relación presión natriuresis, en condiciones normales el riñón mantiene la PA modificando el volumen plasmático. Cuando la presión aumenta, hay excreción de sodio y agua que disminuyen el volumen y, por lo tanto, la presión. En la HAS, el mismo balance de agua se mantiene, pero la PA es más alta. Esta alteración de la curva parece ser más una causa de HAS que un proceso adaptativo (Hall JE; 1996).

Estas alteraciones pueden producir inflamación renal que se desarrolla tanto en la etapa inicial como en el mantenimiento de la hipertensión sensible a sal. Como resultado final se presenta isquemia de la medula renal que eventualmente disminuye el número de nefronas y la tasa de filtración glomerular (Rodríguez-Iturbe B; 2007). Se ha observado en individuos en etapa adulta, que presentaron como factor de riesgo bajo peso al nacer una disminución del número de nefronas, este patrón también se presenta en adultos hipertensos. Esta constituye la hipótesis de Brenner, acerca de la oligonefropatía, reforzando que el bajo peso al nacer es un factor de riesgo para HAS, obesidad, diabetes y enfermedades cardiovasculares. (Kaplan MN;2010).

### **3.2.1.2. Mecanismos neurológicos**

En cuanto a la participación del sistema neurológico se deben de tomar en cuenta dos conceptos fundamentales, el aumento o sobreactividad del tono simpático y la hiperreactividad simpática, son importantes para la regulación de la PA. En modelos experimentales con ratas la hiperreactividad ha sido demostrada, y en humanos se ha observado el aumento del tono adrenérgico.

Al igual que la angiotensina II (Ang II), la norepinefrina (NE) provoca hipertrofia del musculo liso vascular y del ventrículo izquierdo. También promueve liberación de renina y

retención de sodio, ambos efectos conocidos como participantes en el desarrollo y mantenimiento de la HAS en adulto. A pesar de estas evidencias, el mecanismo preciso a través del cual la activación simpática sostenida actúa en la HAS permanece poco conocido.

La regulación de la PA es registrada constantemente por los barorreceptores (BR), estos se encuentran diseminados principalmente en los grandes vasos y lechos arteriales. Cuando los BR carotídeos y aórticos son estimulados por presión alta o bien los BR cardiopulmonares y venosos son estimulados por presión baja o aumento de volumen, se producen reflejos inhibitorios integrados en el núcleo del tracto solitario que genera impulsos parasimpáticos e inhiben el impulso simpático. Como resultado se produce bradicardia y vasodilatación periférica con el fin de amortiguar el aumento de la PA. Los BR se ajustan al nivel habitual de PA, pero responden a los cambios agudos. El hipertenso no controlado mantiene la regulación de la presión a niveles más altos (Kaplan NM *et al.*, 2010). Mientras los BR provocan una respuesta inhibitoria del simpático, los quimiorreceptores (QR) invocan una respuesta excitatoria. Los QR responden a la hipoxia y se ubican primordialmente en el cuerpo carotídeo, riñones y musculo esquelético. Al estimular estos receptores se genera una respuesta simpática-adrenérgica a través de núcleo del tracto solitario, este mecanismo es el que entra en acción durante el ejercicio, lo que ocurre es una pérdida de presión parcial de oxígeno lo que induce un aumento de la PA y del GC al estimular los QR locales. Estos mecanismos son los mismos que participan en los hipertensos con apnea del sueño o insuficiencia renal crónica (Guyenet PG, 2006).

De esta forma, el núcleo del tracto solitario recibe estímulos excitatorios e inhibitorios que son enviados a la medula ventrolateral rostral (RVLM), misma que se conoce por el origen del tono simpático del tallo cerebral. De ahí los estímulos preganglionares hacen sinapsis en la medula adrenal liberando epinefrina (Ep) y las fibras posganglionares inervan el corazón, vasos sanguíneos y riñones, liberando NE (Victor RG y Shafiq MM, 2008).

LA Ep y NE actúan al estimular dos tipos de receptores el alfa y el beta. Los alfa-1 son los mediadores de la respuesta vasoconstrictora mediada por NE proveniente de las fibras posganglionares y los alfa-2B responden principalmente a las catecolaminas circulantes. Los receptores 2A y 2C se localizan en la RVLM y en las terminaciones simpáticas, son responsables de la retroalimentación negativa, inhibiendo el tono simpático. La

estimulación de los receptores beta aumentan la frecuencia cardiaca y la contractilidad ventricular (Charkoudian N, *et al.*,2008; Pickering TG, *et al.*, 2006).

Particularmente en los riñones, las terminaciones simpáticas inducen vasoconstricción de la arteria renal (receptor alfa1), liberan renina (receptor B1) y aumentan la reabsorción de agua y sodio. Este mecanismo de regulación a largo plazo de la PA también ha sido involucrado en el desarrollo de HAS crónica, la sobreactividad sostenida induce la respuesta vasoconstrictora, de remodelamiento e hipertrofia vascular.

La sobreactividad simpática sostenida ha sido involucrada en diferentes condiciones asociadas a la hipertensión, condiciones como son la obesidad, DM2, resistencia a la insulina (RI), insuficiencia renal, apnea del sueño y terapias inmunosupresoras. Esta sobreactividad simpática se activa por la Ang II circulante, que es capaz de estimular algunas neuronas del tallo cerebral, desprovistas de barrera hematoencefálica (Esler M., *et al.*, 2008).

Algunas alteraciones conocidas de la HAS son el aumento de GC y FC, aumento de los niveles de NE plasmática y urinaria, desbordamiento local de NE, recaptura disminuida de NE, aumento en la frecuencia de descarga nerviosa simpática pos-ganglionar, aumento del tono vasoconstrictor mediado por receptores alfa. Sin embargo, no hay una medición práctica de la actividad simpática, todavía esta lejos de ser un método de uso común. La microneurografía aplicada a una región vascular del musculo esquelético podría permitir visualizar el aumento de los pulsos de actividad simpática posganglionar en los hipertensos (pulsos por cada 100 latidos cardiacos), comparados con sujetos normotensos, se ha visto que los hipertensos, incluso aquellos con hipertensión no sostenida tienen valores promedio de elevación de más del 70% (Thomas GD, *et al.*, 2001).

### **3.2.1.3. Mecanismos vasculares**

Sobre la participación de la vasculatura en el control de la PA, la vasomoción se refiere a la capacidad de los vasos sanguíneos para modificar su diámetro en respuesta a diversos estímulos. El diámetro vascular es resultado del balance entre los estímulos vasoconstrictores, vasodiladores, la elasticidad vascular y la presión sanguínea. Se conocen pocos estímulos vasodiladores y múltiples mecanismos vasoconstrictores, con

una vía final común: disponibilidad de calcio iónico para llevar a cabo la actividad del músculo liso vascular.

El endotelio vascular tiene una participación fundamental en la vasomoción al liberar óxido nítrico (ON) y factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF). La sintasa de óxido nítrico (NOS) tiene como sustrato L-arginina, localizada principalmente en el endotelio vascular, pero con isoformas en plaquetas, macrófagos y cerebro, con expresión constitutiva e inducible. La NOS es activada por bradicidina, acetilcolina o por la distensión pulsátil del endotelio. El ON es una molécula volátil y fácilmente se difunde hacia la capa muscular del vaso y hacia el torrente sanguíneo. En el músculo liso el ON estimula la producción de GMP cíclico (GMPc) que a su vez activa cinasas-G, cuya función es disminuir la concentración de calcio citosólico. La actividad del GMPc termina por acción de las fosfodiesterasas. En la disfunción endotelial, tanto el ON como EDHF se encuentran disminuidos de manera que el balance favorece a la vasoconstricción. El ON puede disminuir por la pérdida del endotelio vascular o por una degradación acelerada (Paravicini TM y Touyz RM, 2008).

Si bien el ON tiene una vida media muy corta, lo que representa una degradación rápida, también es sumamente reactivo y particularmente susceptible de ser extinguido por radicales libres de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS se acumulan ya sea por una producción excesiva o por una limitada capacidad de neutralización, este estado es conocido como estrés oxidativo, y se ha asociado a HAS, diabetes y aterosclerosis.

Las ROS son producidas constantemente por el metabolismo celular y se neutralizan inmediatamente de manera que su alta reactividad no daña. Dos moléculas importantes entre las ROS son el anión superóxido ( $O_2^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Las reacciones en las que intervienen las oxidasas de NADPH son una fuente abundante de las ROS que son estimuladas por Ang II. La NOS puede producir ROS cuando no dispone del cofactor tetrahidrobiopterina para la reacción. Otra fuente frecuente de ROS es la reacción catalizada por la xantina oxidasa, que tiene mayor actividad en la hiperuricemia. Esta última se ha asociado con disfunción endotelial en HAS. Finalmente, otra fuente importante de ROS es la cadena de electrones, que aumenta su producción por estímulo de Ang II e hipoxia celular.

La superóxido dismutasa es la enzima que convierte el anión superóxido en peróxido de hidrógeno que ulteriormente se convierte en agua y oxígeno molecular por acción de una catalasa. Parte del éxito de los fármacos bloqueadores del SRAA y de las estatinas se ha

atribuido a su capacidad para disminuir el estrés oxidativo. Este estrés oxidativo ha sido implicado en la rarefacción microvascular es decir la reducción del número y longitud de pequeños vasos por unidad de volumen de tejido que se puede observar como una reducción en la hiperemia reactiva aun en ausencia de aterosclerosis (Levy BI, *et al.*, 2008).

El principio en el que se basa la evaluación de la función endotelial parece ser simple. Los mediadores de la vasodilatación son pocos ON y EDFH y se afectan rápidamente durante el estado patológico, de tal manera que la dilatación deficiente o ausente es una muestra de disfunción endotelial, esta disfunción se puede evaluar midiendo el diámetro humeral o coronario antes y después de un estímulo con acetilcolina, oclusión arterial transitoria o por la elevación rápida de la PA.

En el control de la vasculatura también participa la proteína C reactiva (PCR) es un marcador de inflamación vascular, rigidez y aumento de la presión de pulso. La elevación se asocia con desarrollo de HAS y riesgo cardiovascular independiente (Ridker PM, *et al.*, 2008). La remodelación vascular se refiere a la modificación de la relación del espesor de la capa media vascular y la luz del vaso. El aumento del grosor de la capa media en las arterias es distintivo de la HAS. En las pequeñas arterias la luz del vaso se reduce a expensas del aumento de la media sin modificaciones en el diámetro total del vaso, fenómeno conocido como remodelamiento interior eutrófico en cuyo proceso se encuentra involucrada la Ang II. En contraste, en las grandes arterias la luz se reduce mientras que la media y el diámetro total aumenta, también la remodelación hipertrófica, que tiene más relación con la expresión de genes inducidos por Ang II, tensión parietal y ROS (Duprez DA, 2006). La remodelación de pequeñas arterias es característica de la hipertensión diastólica y la de grandes arterias se observa más en hipertensión sistólica.

El remodelamiento de pequeñas arterias puede ser revertido tras el tratamiento con bloqueadores del SRAA, más no con betabloqueadores aun cuando se obtengan reducciones comparables de la PA.

En cuanto a las ondas de presión arterial se refiere a la forma en que se inscriben estas ondas a medida que viajan a través de los segmentos arteriales. En condiciones normales la onda de presión tiene un pico sistólico y una onda diastólica. Esta última es la reflexión del pico sistólico que viaja en sentido inverso y que mantiene la presión diastólica. La onda de presión tendrá un perfil más amplio cuanto más elásticas sean las arterias, y viceversa, cuanto más rígidas sean las arterias como en el caso de la HAS la onda viaja a

mayor velocidad, esta es más angosta y se refleja más rápidamente de manera que ya no incide durante la diástole si no que se suma al pico sistólico.

El endotelio vascular está ampliamente involucrado en la HAS ya que participa en la regulación del tono vascular, en los mecanismos de hemostasia y trombosis, en el crecimiento celular, en la apoptosis y en la migración y modulación de la composición de la matriz extracelular. Todo esto por medio de la vasomoción al liberar sustancias tanto vasodilatadoras: óxido nítrico (ON), las bradicinas (BDK) y prostaciclina, y sustancias vasoconstrictoras: angiotensina II (Ang II), endotelina y tromboxanos (Vanhotte PM, *et al.*, 1991). El ON además de ser vasodilatador, también tiene propiedades antitrombóticas, antiinflamatorias, inhibiendo el crecimiento, funciona como antioxidante y antiaterogénico.

Por otra parte, la sobreproducción de hormonas ahorradoras de sodio y vasoconstrictoras; la alta ingesta de sodio; la inadecuada ingesta de potasio y calcio; el incremento en la secreción o la inapropiada actividad de renina, dan como resultado un incremento de Ang II. Esta Ang II es la llave efectora del SRAA, el cual está involucrado de forma importante en la HAS en cada una de sus fases (Carey RM, *et al.*, 2003). El péptido Ang II tiene importantes propiedades vasoconstrictoras y aumenta la PA por un doble mecanismo vasoconstrictor agudo y lento, estimula el sistema nervioso simpático a varios niveles e inhibe el tono vagal, tiene también varios efectos sobre el riñón y estimula la secreción de hormonas antidiuréticas y de aldosterona.

Múltiples trabajos realizados en las últimas dos décadas han demostrado el importante papel que tiene el endotelio vascular en la hipertensión, principalmente por dos mecanismos de activación y disfunción, estos mecanismos son el estrés de rozamiento y el estrés oxidativo como precursores de disfunción endotelial, dicha disfunción promueve la expresión de moléculas en la superficie endotelial que en condiciones de norma función no se manifiestan. La expresión de moléculas de adhesión permite que los elementos formes de la sangre tengan oportunidad de adherirse y bajo ciertas condiciones incluso migrar al espacio sub-endotelial. Así, los monocitos son capaces de asirse a la pared endotelial a pesar del flujo laminar de alta velocidad. Por medio de un gradiente electroquímico precipitado por la presencia de sustancias oxidadas como las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y la presencia de especies reactivas de oxígeno, liberando factores quimioatrayentes que favorecen el ingreso de los monocitos/macrófagos y que por procesos de señalización subendotelial estimulan la expresión por parte del monocito a sus receptores barredores o scavenger, mismos que, tienen gran selectividad por las

LDL oxidadas (LDLox), una vez fagocitadas las LDLox éstas no pueden ser destruidas por el macrófago quien desarrolla lipotoxicidad y libera citocinas de respuesta inflamatoria algunas como son factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), y factores de crecimiento 1, MCP-1, promoviéndose una cascada de señalización que culminará con procesos de remodelación tisular favoreciendo la rigidez arterial y el desarrollo de placas de ateroma (Griffin S A, *et al.*, 1991). La liberación de estas sustancias tendrá efecto también en procesos de proliferación de las células del músculo liso y alteraciones en la función del endotelio, induciendo alteraciones en la trombomodulación con el incremento en la liberación del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1). En cuanto al proceso inflamatorio también es transmitido a la zona de la adventicia donde juega un papel muy importante en la diferenciación de monocitos a fibroblastos, permitiendo así liberación de colágeno y otros derivados que habrán de remodelar la matriz extracelular (Chae CU, *et al.*, 2001).

En conjunto la deficiencia de vasodilatadores, tales como la prostaciclina, el ON y los péptidos natriuréticos; la alteración en la expresión del sistema caliceína-quinina, que afecta el tono vascular y el manejo renal del sodio; las anomalías en los vasos de resistencia, incluyendo lesiones en la microvasculatura renal; la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), la resistencia a la insulina; la obesidad; el incremento en la actividad de factores de crecimiento; las alteraciones en los receptores adrenérgicos, que influyen en la frecuencia cardíaca, el inotropismo cardíaco y el tono vascular; y las alteraciones celulares en el transporte iónico. Todo esto propicia anomalías funcionales y estructurales, incluyendo la disfunción endotelial, el incremento del estrés oxidativo, la remodelación vascular, que pueden anteceder a la hipertensión y contribuir a su patogénesis, lo cual ha ganado soporte en los últimos años; parece evidente que la HAS sería tal vez “la campana de alarma del síndrome” y el inicio de una verdadera cascada, siguiendo a la inflamación y disfunción endotelial (Gamboa R. A., 2006).

#### **3.2.1.4. Mecanismos hormonales**

El sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) está involucrado en la retención renal de sodio, en la inflamación, remodelación, disfunción endotelial y, por supuesto, en la HAS en cada una de sus fases. El SRAA se distribuye en todo el organismo y ejerce efectos en numerosos órganos y sistemas. Como ocurre frecuentemente en vías tan

complejas, los precursores como el angiotensinógeno pueden ser sustratos para más de una enzima quimasa y ECA de manera que se asegura el sentido de la vía y la continuidad del sistema. La función primordial del SRAA es el control del volumen de sangre. Interviene en el control agudo a través de la angiotensina y a largo plazo a través de modificar la reabsorción de sodio y agua.

La renina plasmática es una enzima, cuya función es la conversión de angiotensinógeno en angiotensina I (Ang I), proviene de un precursor liberado por el riñón llamado prorrenina inactiva. La prorrenina inactiva recién liberada tiene dos destinos conocidos, el primero es convertirse en renina mediante la escisión de una cadena peptídica y el segundo es unirse al receptor de prorrenina que le convierte en prorrenina activa. Tanto la renina como la prorrenina activa tienen capacidad catalítica para convertir el angiotensinógeno en Ang I. La prorrenina activa unida a los receptores cardiacos y renales también induce la producción de TGF- $\beta$  que a su vez está involucrado en la deposición de colágeno en la fibrosis. Así, los estados que presentan renina alta provocan daño por la alta capacidad de conversión de angiotensinógeno en Ang I y los estados con prorrenina alta provocan fibrosis por estimular sus receptores. Tanto los fármacos inhibidores de ECAs, como los de ARB e incluso los inhibidores directos de renina inducen aumento en la liberación de prorrenina, pero no impiden sus efectos deletéreos pues no bloquean su receptor. Debido a esto, existen hallazgos de que los enfermos diabéticos con prorrenina alta desarrollan con más frecuencia insuficiencia renal, ceguera y neuropatía (Wilson DM y Luetscher JA, 1990). La actividad de la renina plasmática determina en una muestra de plasma la cantidad de Ang I, formada por unidad de tiempo, mientras que la concentración de renina plasmática se refiere a la concentración de la enzima por unidad de volumen plasmático. Clínicamente solo la actividad de renina plasmática tiene utilidad y se ha implicado en un sin número de condiciones. De forma general, la actividad de la renina plasmática se encuentra suprimida en padecimientos como son el aldosteronismo primario y aumentada en la hipertensión renovascular. La mayor parte de los enfermos con hipertensión esencial tienen la actividad de la renina plasmática normal o disminuida, condición particularmente inesperada ya que la expansión de volumen tendría que suprimir su secreción.

No se ha logrado establecer la causa de la HAS con niveles de renina baja, sin embargo, este grupo de enfermos tiene menor incidencia de presentar enfermedad vascular, cerebral y de infarto agudo al miocardio que el grupo con renina normal o alta (Alderman

MH, *et al.*, 1991). El estado hipervolémico es una alternativa para explicar la renina baja, sin embargo, la respuesta a los diuréticos ha sido inconstante en varios estudios.

Se ha explorado la respuesta a los diuréticos en hipertensos con actividad de renina plasmática baja y aumentada, sin embargo, el número de casos con actividad de renina plasmática anormal es relativamente baja y los resultados no son predecibles. De manera práctica, la utilidad de la detección de la actividad de la renina plasmática para guiar un tratamiento se encuentra limitada a unos pocos casos. Contrario a lo esperado, el llevar una dieta alta en sal no suprime por completo la actividad del SRAA. En un estudio en individuos normotensos de población urbana se han documentado niveles de aldosterona normales altos o inapropiadamente normales (Vassan RS, *et al.*, 2004).

La concentración de renina plasmática en hipertensos de población caucasica es mayor que en hipertensos de raza negra mientras que en estos últimos se ha observado mayor actividad de aldosterona. La coincidencia de renina normal y aldosterona alta permite suponer una vía metabólica no dependiente de renina como en el aldosteronismo primario.

La aldosterona estimula receptores para mineralocorticoides en el cerebro provocando sobreactividad simpática, en el corazón y riñón en los que promueve la fibrosis característica de la HAS. En la interacción del sistema inmune y el SRAA se ha observado la activación de la oxidasa de NADPH de los vasos sanguíneos, riñón y cerebro por acción de Ang II. En el cerebro la activación del simpático estimula al bazo y linfáticos para liberar células T que subsecuentemente activan su propia oxidasa de NADPH, inducen liberación de quimiocinas y receptores de superficie que dirigen las células T al tejido adiposo perivascular en donde liberan factor de necrosis tumoral TNF- $\alpha$  y ROS, particularmente en el espacio perinefrítico provocando disfunción renal y retención de sodio (Harrison DG, *et al.*, 2008). Esto se ha corroborado en enfermos con inmunodeficiencia adquirida que cursan con PA baja que aumenta a medida que los medicamentos permiten que se reponga la población de linfocitos; en enfermos con artritis y psoriasis se presentan las tasas más altas de HAS. Algunos antiinflamatorios no esteroides y los esteroides promueven el desarrollo de HAS.

Con este panorama general de los mecanismos involucrados en la regulación de la HAS, y los estudios donde se ha visto un cierto patron de herencia, en los últimos años se ha tratado de abordar desde el punto genético a este padecimiento con el fin de estudiar la génesis y la tendencia a presentar HAS. La etiología de esta enfermedad es compleja, y

es por esto que la búsqueda de genes implicados en su desarrollo se ha enfocado en aquellos que codifican para proteínas (enzimas, receptores) propias de mecanismos fisiológicos como es el SRAA que participan en el control de la presión arterial.

### 3.3. Abordaje genético de la HAS

Las enfermedades genéticas se pueden clasificar básicamente en enfermedades cromosómicas, enfermedades de herencia no mendeliana, enfermedades monogénicas o mendelianas y enfermedades multifactoriales o complejas.

La HAS es considerada como una enfermedad con patrón hereditario de rasgos complejos (herencia no mendeliana), multifactorial y poligénica, existen diferentes genes involucrados en la etiología de la enfermedad, los cuales determinan cierta susceptibilidad genética, que interactúan con factores ambientales de riesgo. Esta HAS se presenta en el 95% de los casos, y el 5% restante de los casos de HAS tiene como causa una mutación de un gen único, que se transmite en la familia siguiendo un modelo mendeliano.

Debido a que la HAS es un padecimiento crónico degenerativo con etiología multifactorial, hay que considerar que en el control de la PA intervienen múltiples sistemas, por lo que variaciones en múltiples genes expresados en dichos sistemas podrían contribuir a la etiología de la HAS, junto con la participación de factores de riesgo modificables (ambientales y/o conductuales), así como interacciones entre gen-gen, gen-ambiente, gen-genoma. Existen diversas teorías sobre la etiología de las enfermedades multifactoriales, una de ellas se refiere a la llamada hipótesis “enfermedad frecuente - alelo frecuente” (Chakravarti, 1999; Frayling, 2007; Frayling *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2005). Según esta teoría, el componente genético actúa influenciando la ocurrencia de enfermedades complejas a través del efecto acumulado de un gran número de alelos relativamente frecuentes en la población y de impacto individual relativamente bajo, que interactúan con factores ambientales hasta exceder cierto umbral biológico (McClellan *et al.*, 2007). En contraposición a esta teoría la hipótesis de “enfermedad frecuente - alelos raros”, predice que la ocurrencia de las enfermedades multifactoriales podría ser la consecuencia de la acción simultánea de diferentes mutaciones de alta penetrancia e individualmente de muy baja frecuencia poblacional (Campbell and Manolio, 2007). Aunque ambas teorías no son mutuamente excluyentes, existe un amplio debate sobre cuál sería el modelo más adecuado para explicar el rol de la genética en las enfermedades complejas (Khoury *et al.*, 2007). Paralelamente a estos conceptos y debido a las dificultades en la identificación de genes relacionados con enfermedades multifactoriales, se ha desarrollado el concepto de estudio de “fenotipos intermedios”

(endofenotipos), que son rasgos relacionados que anteceden a la enfermedad en estudio y que pueden presentar una gran variabilidad entre sujetos que aún no están afectados por la enfermedad (Bougnères, 2003; Meyer-Lindenberg and Weinberger, 2006).

Dentro de la multicausalidad de las enfermedades complejas, también pueden existir genes que ejercen un impacto superior al de otros genes en un subconjunto de pacientes y que son llamados “genes mayores o principales de susceptibilidad”, tienen al menos un alelo que hace a sus portadores que tengan una alta penetrancia de desarrollar la enfermedad. Adicionalmente, pueden existir subtipos en las enfermedades complejas que muestren un patrón de herencia de tipo mendeliano, en las que un único gen es el responsable mayoritario de la expresión del fenotipo (Morton, 2005).

El estudio del componente genético que participa en la etiología de la enfermedad (genes candidatos) se ha abordado fundamentalmente desde varias estrategias diferentes. Estas estrategias de investigación tratan de demostrar la existencia de interacciones entre los factores genéticos y los factores ambientales. El enfoque habitual para evaluar la agregación familiar de rasgos y enfermedad consiste en la aplicación de los llamados estudios de agregación familiar. Si nos centramos en las variaciones de la secuencia de ADN, resulta difícil imaginar en una enfermedad originada por dichas alteraciones que no presente algún grado de agregación familiar (exceptuando algunas enfermedades genéticas causadas por mutaciones espontaneas; eventos de baja probabilidad que ocurren durante la gametogénesis o modificaciones epigenéticas). En este sentido, el análisis de segregación evalúa si los patrones de agregación familiar son compatibles con modelos genéticos simples (dominantes o recesivos) o modelos más complejos (efectos poligénicos, efectos mayores de susceptibilidad, efectos ambientales; variables confusoras, modificadoras de efecto e interacciones, etc.). Por lo que es importante separar la importancia relativa de los factores genéticos y ambientales en la agregación familiar de enfermedades, dado que las familias no solo comparten los factores de riesgo genético, sino que también comparten el ambiente intrafamiliar y el contexto cultural; por lo que la agregación familiar es el resultado de la influencia de los genes o resultado del ambiente intrafamiliar compartido. Esto se ha abordado a través de estudios de gemelos monocigóticos (gemelos MC) y gemelos dicigóticos (DC). La comparación de la similitud de pares de gemelos MC en relación con la similitud que presentan entre si los pares de gemelos DC es el mejor acercamiento para distinguir entre la diferente contribución de la genética y el ambiente en estudios de este tipo. La idea general de estos estudios es que,

si dos individuos son genéticamente similares, entonces también deberían ser fenotípicamente similares. De esta manera, los gemelos MC son genéticamente idénticos (100% de genes compartidos) mientras que los gemelos DC son diferentes genéticamente (50% de genes compartidos). Por lo que la existencia de un mayor grado de correlación fenotípica en gemelos DC indica control genético, bajo el supuesto de que gemelos MC y DC comparten el ambiente de manera similar. Otros enfoques útiles para separar los efectos ambientales y genéticos, son los estudios de migraciones y los de hijos adoptados e hijos biológicos (Boomsma *et al.*, 2002).

Una vez que se ha establecido la influencia genética de la enfermedad, es importante localizar e identificar genes o regiones cromosómicas que sean responsables de la enfermedad, esto por medio de estudios de ligamiento y estudios de asociación por DL. En estos estudios se determinan genotipos de marcadores genéticos a lo largo del genoma para intentar determinar regiones cromosómicas que tienen una alta probabilidad de contener genes causales de la enfermedad. Los estudios de ligamiento han sido muy exitosos en la localización inicial de genes responsables de enfermedades mendeliana, aunque con menor éxito en enfermedades complejas. Los estudios de ligamiento pueden ser continuados por estudios de DL en los que se examina la asociación entre marcadores genéticos y enfermedades que permitan identificar de manera más fina la localización cromosómica del gen causal de la enfermedad. Finalmente, la información inicial entregada por los estudios de ligamiento y DL se usan con el objeto de materializar la identificación del gen responsable de la enfermedad y la caracterización del efecto biológico de la variación genética encontrada; denominados genes candidatos o genes de susceptibilidad. A través del enfoque epidemiológico clásico aplicado a factores de riesgo genéticos en estudios de asociación genotipo-enfermedad con genes candidatos, por medio de modelos estadísticos es posible estimar la frecuencia de las variantes genéticas de susceptibilidad a través de estudios transversales, así como la magnitud y direccionalidad de su efecto sobre la enfermedad a través de medidas de riesgo absoluto o relativo, de esta forma se puede evaluar el efecto de las variables, a nivel de interacción o modificación de efecto, dando importancia al efecto biológico o bien a la interacción de tipo estadístico/epidemiológico, en sujetos sin relación familiar, y en estudios de asociación con base familiar.

En los últimos años se ha hecho un enorme esfuerzo para definir la contribución de la genética en este padecimiento, en términos de patogenia básica y de características

clínicas. La influencia del componente genético en la regulación de la PA explica la agregación familiar que se observa en la HAS, aunque la cuantificación de la importancia relativa de cada uno de los dos grupos de factores genéticos y ambientales, es aún materia de discusión y las cifras difieren en los diferentes trabajos publicados. En general, analizando los datos de estudios en familias sugieren que el riesgo genético justifica del 30% al 60% de la variación de la PA entre individuos (Lifton, 1995).

En el control de la PA intervienen múltiples sistemas, por lo que variaciones en los múltiples genes expresados en dichos sistemas podrían contribuir a la HAS. El análisis de los genes posiblemente implicados en la herencia de la enfermedad se ha abordado fundamentalmente desde varias estrategias diferentes.

Aunque las bases genéticas de la enfermedad están firmemente establecidas y el desarrollo en el campo de la biología molecular y genética ha sido muy importante, esto con el perfeccionamiento en las metodologías y las herramientas de análisis que han permitido avances importantes en la comprensión de las alteraciones genéticas de este padecimiento.

La culminación del proyecto del genoma humano dio como resultado el conocimiento de la secuencia completa de aproximadamente 3,200 millones de nucleótidos contenidos en este genoma. El punto importante que se estableció en este proyecto fue que los genomas humanos comparten 99.9% de esta secuencia y que el 0.1% restante varía entre cada individuo. Esta pequeña variación confiere las características fenotípicas a cada persona, pero también la predisposición al desarrollo de algunas enfermedades y define en parte su respuesta a ciertos tratamientos.

Las variaciones genéticas contribuyen de forma importante a las diferencias físicas que presenta cada individuo y, por tanto, a las diferencias entre poblaciones humanas. Dentro de las variaciones que presenta el genoma se pueden encontrar; mutaciones (cambio de una variable o varias bases), inserciones (inserción de una o más bases) y deleciones (perdida de una o más bases). Cuando la frecuencia de esos cambios supera el 1% en la población son llamados polimorfismos (Brookes, 1999)

Los polimorfismos más conocidos son aquellos que implican el cambio de una sola base (*Single Nucleotide Polymorphisms; SNP*). La gran mayoría de los polimorfismos de un solo nucleótido tienen dos alelos (formas alternativas de un carácter genético encontrado en un locus dado en un cromosoma) representados por una sustitución de base por otra. En las poblaciones este tipo de alelos se clasifican en alelo principal o "silvestre" y alelo

raro o mutante, clasificación basada en su frecuencia observada en las poblaciones. Debido a que los humanos somos diploides un individuo puede tener uno de tres genotipos: homocigoto para el alelo más frecuente, heterocigoto, u homocigoto para el alelo menos frecuente.

Actualmente se han descrito más de 10 millones de polimorfismos de un solo nucleótido, aunque se ha estimado que existen aproximadamente 20 millones de ellos, alcanzando una distribución de aproximadamente uno por cada 100-300 nucleótidos. Debido a su amplia distribución estos polimorfismos se localizan en cualquier parte de la estructura de los genes y el genoma.

La variabilidad genética se ha relacionado principalmente con los polimorfismos de un solo nucleótido, aunque también pueden contribuir a causar enfermedades. La combinación entre los beneficios adaptativos causados por esas mutaciones, y la selección natural, así como la deriva genética, moldean el genoma en patrones únicos de variaciones genéticas en distintas regiones.

Los SNP aparecen en cualquier parte del genoma, pero el análisis de la distribución de los polimorfismos a lo largo del genoma humano muestra variaciones significativas en la densidad de polimorfismos y en la distribución de las frecuencias alélicas. Existe diferencia entre la densidad de SNP en regiones exónicas, en intervalos medios de 1.2Kb y en regiones intergénicas o intrónicas, en intervalos de 0.9Kb (Chakravarti, 1999).

Atendiendo a sus posibles efectos funcionales, las variaciones se pueden subdividir en distintas clases. Si un SNP está localizado en una región codificante, la variación puede resultar en un cambio de aminoácido y alterar la secuencia de la proteína (SNP no sinónimo). El SNP también puede ser funcional, aunque no produzca ningún cambio de aminoácido (SNP sinónimo), ya que pueden alterar la estabilidad del mRNA (Capon *et al.*, 2006). Los SNP en las regiones intergénicas o intrónicas también pueden ser funcionales si alteran los sitios de empalme (splicing), o si interrumpen o crean nuevos sitios de unión a factores de transcripción o sitios que actúan como potenciadores o silenciadores de la transcripción. En enfermedades complejas, probablemente lo más común sean los cambios sutiles como las sustituciones sinónimas y SNP en zonas intergénicas e intrones, donde la mutación sólo aumenta la susceptibilidad a la enfermedad, pero no causa directamente la enfermedad.

### 3.3.1. Estudios de ligamiento y asociación

Gran parte de nuestro conocimiento actual sobre la relación entre genotipo y enfermedad proviene de estudios estadísticos donde se mide la correlación entre determinadas variantes genéticas y la probabilidad de desarrollar una enfermedad específica.

Los análisis de ligamiento, donde se sigue el rastro del patrón de transmisión de marcadores genéticos dentro de una familia, han tenido mucho éxito en la identificación de más de un millar de genes de enfermedades monogénicas humanas (Botstein y Risch, 2003). En el caso de enfermedades complejas comunes como hipertensión, asma o cáncer, no ha habido tanto éxito (Altmüller *et al.*, 2001), aunque existen unas notables excepciones (Strittmatter y Roses, 1996; Hugot *et al.*, 2001).

La dificultad en trazar el origen genético de estas enfermedades proviene de la susceptibilidad a desarrollarlas, y esto es generado por un efecto combinado de muchos polimorfismos en varios genes, a menudo combinado con factores medioambientales. El riesgo de una variante genética sola es pequeño, tanto que están por debajo del límite de detección por análisis de ligamiento donde las muestras son normalmente demasiado pequeñas para proporcionar una significación estadística en la relación enfermedad/genotipo.

Los estudios de asociación, basados en el análisis de diferencias genéticas, particularmente SNPs, entre casos y controles en una población más amplia, son más poderosos para detectar este tipo de señales pequeñas, polimorfismos cercanos. También pueden hacerse estudios de asociación en regiones candidatas o en genomas enteros, y normalmente se utilizan cuando los análisis de ligamiento no pueden dar más información, asociación normalmente se analizan polimorfismos de los genes de interés o polimorfismos cercanos. El objetivo es investigar variaciones en el gen candidato para determinar si un alelo específico o un genotipo está asociado a un mayor riesgo de tener la enfermedad. Esto puede hacerse o bien estudiando las variaciones funcionales del gen o bien estudiando las variaciones genéticas que no son directamente las causantes pero que están asociadas al alelo responsable desconocido. Esta última aproximación es la más común y está basada en un fenómeno genético llamado DL

No todos los alelos se heredan de forma independiente, ya que su proximidad en el cromosoma hace que en una determinada frecuencia se hereden de forma conjunta. Así,

alelos de distintos loci a veces tienden a heredarse juntos más a menudo de lo esperado por azar. Estos alelos se dice que están en desequilibrio de ligamiento (LD).

El grado de LD puede variar entre dos extremos: no LD (segregación al azar) o LD completo. Existen varias medidas de LD. Las dos más comunes en la literatura son el coeficiente de Lewontin  $D'$  y el coeficiente de correlación  $r^2$  (Devlin y Risch, 1995). Éste último refleja el poder estadístico para detectar el LD; el  $r^2$  entre un marcador y un SNP causativo proporciona el tamaño de muestra que se requeriría para detectar la asociación con la enfermedad cuando se genotipa directamente el SNP causal, en comparación con el que se necesitaría para obtener el mismo poder estadístico genotipando el marcador. En otras palabras,  $r^2$  mide el poder estadístico que un SNP '1' tiene para predecir los genotipos de otro SNP '2' y viceversa. Cuando los valores de  $D'$  y  $r^2$  difieren significativamente de 0, entonces es que hay evidencia de LD, y un valor de 1 indica LD completo. Cuando aparece una nueva mutación y se extiende a la siguiente generación, el alelo mutado se heredará junto con los alelos de alrededor. Estos alelos estarán entonces en LD con los otros, y el bloque de alelos co-heredados constituirá un haplotipo. El haplotipo y el LD entre alelos pueden romperse por eventos de recombinación. En las primeras generaciones después de la nueva mutación, la recombinación separará con más probabilidad alelos que estén más separados en el genoma, pero después de muchas generaciones separará incluso alelos muy cercanos. Por tanto, es esperable que el LD entre alelos raros, que son relativamente jóvenes, sea mayor que el LD entre alelos comunes (Reich *et al.*, 2001). Por la misma razón, el LD disminuye con la distancia entre marcadores. El grado de LD entre dos alelos puede verse afectado también por otros procesos como nuevas mutaciones, selección, conversión génica, deriva genética y mezclas de poblaciones (Ardlie *et al.*, 2002). Esto hace que el LD a lo largo del genoma humano sea altamente variable (Dawson *et al.*, 2002). Así, hay regiones cromosómicas de hasta 550 Kb en las que se detecta LD y otras regiones con ningún o poco LD entre marcadores separados por sólo unas pocas Kb (Goddard *et al.*, 2000). Además, el grado de LD no solo varía entre regiones cromosómicas, sino también entre distintas poblaciones (Reich *et al.*, 2001).

En su nivel más básico, la asociación genética y los análisis de ligamiento se basan en principios y suposiciones similares (Borecki y Suárez, 2001). Ambos se basan en el hecho de que alelos en loci próximos al locus asociado a una enfermedad tienden a segregar juntos (Hoh y Ott, 2003). En ausencia de entrecruzamientos, el cromosoma que lleva el

locus de enfermedad y los alelos de otro loci del mismo cromosoma se transmitirán como bloque (haplotipo).

Los análisis de ligamiento se centran en identificar haplotipos que se heredan intactos en familias o pedigríes de ancestro conocido, y en cambio la asociación se basa en la retención de variantes genéticas adyacentes a través de varias generaciones (Cardon y Bell, 2001). Así, los estudios de asociación pueden ser considerados como estudios de ligamiento muy grandes de pedigríes hipotéticos no observados.

En poblaciones crecientes, la recombinación es la principal fuerza que elimina el ligamiento y la asociación a lo largo de las generaciones (Slatkin, 1994). Cuando aparece una mutación funcional tal vez una que puede contribuir a alguna enfermedad lo hace en un haplotipo de otras variantes génicas que ya existían. Debido a que el ligamiento se centra sólo en ancestros recientes y normalmente observables, en donde ha habido relativamente pocas oportunidades para la recombinación, las regiones del gen de la enfermedad que se identifican por ligamiento serán a menudo grandes, y pueden incluir cientos o incluso miles de genes a lo largo de muchas mega bases (Mb) de DNA. Por el contrario los estudios de asociación surgen de recombinación histórica, así que las regiones asociadas a la enfermedad son en teoría mucho más pequeñas en poblaciones de apareamientos al azar (Hartl y Clark, 1997), incluyendo sólo un gen o un fragmento génico, siendo por tanto una técnica que permite refinar la localización de un gen a lo largo de generaciones subsecuentes, a medida que la mutación se transmite, la recombinación hará que se separe de los alelos específicos de su haplotipo original. Otras variaciones genéticas podrán permanecer juntas en haplotipos ancestrales a lo largo de muchas generaciones, en LD.

Hay varias ventajas de los estudios de asociación frente a los análisis de ligamiento. La primera es que tienen una mayor precisión para localizar el locus de susceptibilidad y particularmente para genes con pequeños efectos individuales, por lo que son de más utilidad que el análisis de ligamiento en el caso de enfermedades complejas (Risch y Merikangas, 2006).

Además, los análisis de ligamiento, que tradicionalmente es el método genético más fiable para enfermedades mendelianas, ha resultado ser mucho menos fiable en el estudio de enfermedades no mendelianas, dando una tasa muy alta de falsos positivos (Risch, 2000). Finalmente, los estudios de asociación se pueden hacer en grupos de individuos

no relacionados, simplificando así el proceso de reclutamiento y por tanto haciendo posible que se puedan estudiar muestras poblacionales más grandes.

A pesar de la aparente complejidad de los patrones de LD en el genoma, diversos estudios han propuesto que dicho patrón se puede describir como una estructura formada por series de bloques de haplotipos, es decir, de grupos de variantes génicas próximas en el genoma que se heredan juntas y donde la recombinación es rara o ausente.

Este modelo de estructura en bloques de haplotipos tiene importantes aplicaciones en los estudios de asociación.

Un estudio de asociación se puede llevar a cabo mediante el llamado análisis de casos y controles, en el cual los genotipos de pacientes no relacionados se comparan con los de controles sanos. La medida estadística de asociación en una cohorte de casos/controles puede ser una simple prueba de Chi cuadrada ( $\chi^2$ ), donde se comparan las frecuencias alélicas entre dos grupos.

Uno de los principales problemas de este tipo de análisis es encontrar los controles adecuados. Ya que puede haber alguna asociación dada por una diferencia genética dependiente del sexo, o por alguna enfermedad de aparición tardía, la edad de los controles es muy importante. Hay un riesgo de perder asociación si la población control es más joven que el grupo de casos, ya que varios de los controles pueden llevar el alelo de la enfermedad y desarrollarla más tarde.

La presencia de artefactos se puede explorar si se comprueba que las frecuencias alélicas entre controles satisfacen el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE), este estadístico determina qué frecuencias deben de conservarse en la población para cada genotipo en función de las frecuencias observadas de los alelos para cada locus. Si no se cumple, es indicativo de un posible problema en la selección o análisis de los individuos control y podría motivar la invalidación del estudio de asociación (Campbell y Rudan, 2002).

Para todos los tipos de estudios de asociación es importante tener un grupo de controles de la misma población que los casos, o existirá un riesgo elevado de tener falsos positivos, que surgen cuando los casos están más relacionados entre sí que con los controles: si entre los casos se sobre presenta una población o subgrupo genético, cualquier SNP con diferentes frecuencias alélicas en el subgrupo y en la población general será asociado erróneamente con una de las condiciones (o casos o controles).

Estas falsas asociaciones ocurren cuando existe estratificación de la población en la muestra.

El efecto de la estratificación es una de las principales dificultades cuando se trazan inferencias causales a partir de estudios de asociación de casos y controles. Se dice que existe estratificación en la población estudiada cuando ésta no es genéticamente homogénea, sino que contiene una mezcla de individuos que pueden ser separados en otros rasgos étnicos distintos al fenotipo investigado. En estos casos las diferencias en frecuencias alélicas entre casos y controles pueden deberse a diferencias sistemáticas en la ascendencia en vez de a la asociación de genes con la enfermedad (Freedman *et al.*, 2004; Clayton *et al.*, 2005), dando lugar a conclusiones erróneas. Estas falsas asociaciones se conocen como errores de tipo I, donde se rechaza la hipótesis nula de no asociación; cuando de hecho es correcta y no hay asociación verdadera. Por tanto, la elección de individuos para el estudio de asociación tiene que hacerse con mucha cautela para asegurar una población homogénea y así evitar la estratificación.

Existen varios métodos que permiten controlar la estratificación. Uno de ellos, son las pruebas de transmisión de desequilibrio (TDT) es un diseño de casos/controles que utiliza controles familiares cuando los genotipos parentales se conocen (Spielman *et al.*, 1993; Ewens y Spielman, 2005). Suponiendo un marcador bialélico, la estratificación se controla comparando las frecuencias alélicas de alelos que se transmiten de un padre a un hijo afectado con las frecuencias de alelos que no se transmiten. Existen también muchas extensiones del TDT original, que permiten variaciones de múltiples alelos en un locus (Sham y Curtis, 1995), o que permiten realizar TDT sin necesidad de tener los genotipos del hijo afectado y los dos padres, una información no siempre disponible (Sun *et al.*, 1999).

La principal desventaja del TDT es que requiere la recolección de individuos emparentados, con lo que se elimina una de las ventajas de los estudios de asociación (Elston y Spence, 2006). Para evitar esto se han desarrollado otros métodos que permiten controlar la estratificación de poblaciones sin necesidad de disponer de individuos emparentados. Si se sospecha que existe estratificación, es posible detectarla y controlarla usando marcadores genéticos seleccionados al azar (Pritchard y Rosenberg, 1999; Devlin *et al.*, 2001). Las tecnologías de genotipificación a gran escala están creando un desafío analítico importante; para llegar al descubrimiento y mapeo de los polimorfismos o mutaciones relacionadas con una enfermedad y a la posterior elucidación

del mecanismo bioquímico o biofísico que lleva al fenotipo de la enfermedad, es necesaria una combinación de investigación de laboratorio y análisis de datos, y en todo ese proceso la aplicación de métodos bioinformáticos es esencial.

### **3.3.2. Marcadores genéticos y su importancia**

Los avances en tecnología molecular conseguidos en los últimos años, han permitido la detección de un número mayor de marcadores genéticos de forma cada vez más eficiente (Elston y Spence, 2006). En 1980 se propusieron los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) como marcadores para el escaneo completo del genoma (Botstein *et al.*, 1980). Mediante análisis de ligamiento se estudiaban los patrones de co-segregación de los marcadores en familias para la localización de genes. Posteriormente, después del desarrollo de la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis *et al.*, 1986, 1992), los marcadores elegidos fueron los microsatélites, en los cuales las sondas utilizadas son secuencias cortas de DNA más fáciles de obtener que las que se necesitan con RFLP (Weber y May, 1989).

Hoy en día, los SNPs se han convertido en los marcadores de elección. En la actualidad muchos investigadores centran sus trabajos en identificar genes con polimorfismos que se dan en la población con mayor frecuencia y que influyen en el riesgo de padecer una enfermedad. La base de datos de polimorfismos de un solo nucleótido (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) constantemente se actualiza con nuevos genomas secuenciados. Con la tecnología actual es posible genotipificar cientos de miles de SNPs a un bajo costo por individuo. Además, con el proyecto HapMap (International HapMap Consortium, 2005) se han identificado la mayoría de SNPs en el genoma humano, haciéndolos útiles como marcadores en estudios genéticos, especialmente en análisis de ligamiento y estudios de asociación (Kruglyak, *et al.* 1999; Risch y Merikangas, 1996).

En 2006 (Redon *et al.*, 2006) se publicó el primer mapa de número variables de copias (*Copy-Number Variants; CNVs*) en el genoma humano, en el que se identificaron CNVs en 1400 regiones que solapan con un 14.5% de los genes implicados en enfermedades humanas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Al igual que con los SNPs, es probable que la mayoría de CNVs sean variantes benignas que no causan enfermedad, sin embargo, hay

variaciones específicas asociadas con enfermedades comunes mendelianas (Sebat *et al.*, 2007).

Las aproximaciones que clásicamente se han utilizado para el estudio de estas aberraciones genéticas utilizan la hibridación genómica comparativa (CGH), donde el DNA genómico se hibrida con cromosomas en metafase (Kallioniemi *et al.*, 1992). Sin embargo, con el reciente desarrollo de las tecnologías de los microarreglos de DNA ahora es posible el estudio de CNVs a través de los llamados arreglos de CGH (aCGH). Con esta técnica se sustituyen los cromosomas en metafase por clones mapeados de forma precisa en el genoma y colocados en el microarreglo de forma automatizada. Las muestras de DNA problema y de referencia se marcan con diferentes sondas fluorescentes y se hibridan conjuntamente en el microarreglo. El grado de fluorescencia resultante se mide, clon a clon, y se representa en sus respectivas localizaciones genómicas. La resolución para detectar CNVs viene dada por el número y tamaño de los clones del arreglo, los cuales pueden ser oligonucleótidos de 25-80pb, DNAC (0.5-2Kb) o insertos de DNA genómico (hasta 200Kb). Aunque el estudio de las CNVs es relativamente reciente, se están empezando a tener muy en cuenta, y los estudios genéticos empezarán también a incorporar una evaluación de las CNVs en la población de estudio para determinar si es una CNV individual, y no un SNP, el responsable del rasgo que se está estudiando (Lupski, 2007).

Para analizar la co-segregación de marcadores genéticos distribuidos ampliamente por todo el genoma, los microsatélites o repetidos cortos en tándem (*Short tandem repeats; STRs*) pueden identificar una o varias regiones genómicas de ligamiento que contribuyen al desarrollo del padecimiento. Dicha zona puede contener al gen responsable de la enfermedad.

Hasta hace apenas unos pocos años, en los análisis clásicos de escaneo del ligamiento del genoma completo (*Genome-Wide Likage Scan: GWLS*) se utilizaban marcadores genéticos tipo STR, los cuales son muy informativos, sin embargo, su distribución dentro del genoma no es tan amplia como otros polimorfismos. De hecho, mediante algunos GWAS se han identificado varias regiones involucradas con el desarrollo de HAS o niveles de PA elevados (Jeunemaitre X *et al.*, 1992; Krushkal J *et al.*, 1999; Ledy D, *et al.* 2000). Una vez confirmado el ligamiento, se debe iniciar la búsqueda del o los genes candidatos. En general, las zonas ligadas con enfermedades comunes son grandes, a veces se debe buscar un solo gen entre 20 a 30 millones de pares de bases y por lo

común hay más de 500 genes (Daly AK, 2003; Litt M et al, 1989; Risch NJ, 2000; Ronaghi M, 2005).

Por lo que para localizarlos en una región tan amplia lo primero es revisar en bases de datos para ver cuales genes se ubican en la región de ligamiento, luego identificar cuáles de ellos tienen un papel funcional y cuales codifican para moléculas involucradas en la fisiopatología del padecimiento de interés.

El estudio de la contribución de los polimorfismos genéticos en el desarrollo de esta patología permitirá identificar a los individuos con riesgo a padecerla, antes de que surjan los síntomas, y así evitar o retrasar las manifestaciones y secuelas. Asimismo, se podrá identificar a los individuos que desarrollarían alguna enfermedad más grave, lo que ayudara a perfeccionar las estrategias de tratamiento, el cual se podría individualizar de acuerdo con la carga genética de cada individuo. La combinación de los factores genéticos y los factores de riesgo ya definidos para HAS permitirá conocer mejor la predisposición a este padecimiento.

Dentro de los estudios genéticos existen dos principales metodologías para identificar genes de susceptibilidad a HAS en humanos: a) los análisis de ligamiento y, b) los análisis de asociación. Ambas estrategias han sido ampliamente usadas con el objetivo de identificar a los genes que causan HAS (Ruppert V, *et al.*, 2003).

### **3.3.3. Importancia Biológica de los SNPs**

Las enfermedades genéticas humanas se caracterizan generalmente por un amplio rango de variabilidad fenotípica que se manifiesta a distintas edades, y en distintos grados de severidad o de respuesta al tratamiento. Las causas que subyacen a esta variabilidad están influenciadas por distintos niveles de modificadores genéticos y medioambientales. Es probable que la mayor parte de las variables genéticas humanas tengan un efecto neutral, pero algunas pueden causar o modificar el fenotipo de la enfermedad. Si la hipótesis de enfermedad común y variación común es cierta, puede haber un número grande de estas variaciones en las bases de datos de polimorfismos, incluso pueden haber sido también caracterizadas en HapMap. A estas variaciones genéticas se les llama “polimorfismos candidatos”.

A medida que el número de SNPs anotados en las bases de datos públicas va creciendo, un objetivo importante en genética humana es la identificación de variantes potencialmente funcionales. Así como los genes con un putativo papel biológico en la enfermedad se priorizan para su inclusión en los análisis de asociación, los polimorfismos candidatos pueden priorizarse basándose en el efecto predicho en la estructura y función de regiones reguladoras, genes, transcritos o proteínas. Un polimorfismo puede afectar casi cualquier proceso biológico. Mucha de la literatura en este campo se centra en la forma más obvia de variación, cambios no sinónimos en regiones codificantes (Ramensky *et al.*, 2002). En las enfermedades genéticas simples estas mutaciones suelen ser mutaciones de aminoácido o mutaciones que producen un codón de terminación, y son fácilmente identificables debido a nuestro conocimiento de las reglas de traducción génica. Es cierto que las alteraciones de la secuencia de aminoácidos explican un gran número de enfermedades. Sin embargo, en enfermedades complejas está ahora generalmente aceptado que las variaciones que ejercen sus efectos en la susceptibilidad a desarrollar una enfermedad lo hacen a través de mecanismos más sutiles, entre los cuales la alteración de la expresión génica es mayoritaria (Knight, 2005). Así, los efectos de los polimorfismos de DNA de ninguna manera se limitan a regiones codificantes, las variaciones en regiones reguladoras pueden alterar la secuencia de sitios de unión a factores de transcripción o elementos promotores; variaciones en las zonas UTR del mRNA puede alterar la estabilidad del mRNA; variaciones en regiones reguladoras como potenciadores y silenciadores en exones e intrones pueden alterar la eficacia del splicing. De hecho, para muchos genes las variaciones genómicas que pueden alterar el proceso de splicing pueden representar hasta un 50% de todas las mutaciones que conducen a una disfunción génica (Buratti *et al.*, 2001). El primer paso para identificar SNPs funcionales es determinar la región genómica donde se encuentra. Ésta es la base para elegir herramientas apropiadas ya que son completamente dependientes de la localización de la variación dentro del gen o región reguladora. El LD hace más fácil la identificación de genes, pero también hace que sea más difícil e incluso a veces imposible distinguir entre el locus causante de la patología real y sus marcadores correlacionados. Sin embargo, proporciona un punto de partida para identificar polimorfismos funcionales.

El primer paso para el estudio de polimorfismos reguladores es determinar si están situados en una región reguladora o en una región codificante. Diferentes pasos de regulación implican distintos elementos como factores de transcripción (TFs), elementos reguladores en cis y otros co-factores. Además, también implican regiones muy

diferentes. Por ejemplo, el promotor es la región reguladora más importante que controla y regula el primer paso de la expresión génica, la transcripción del mRNA. Un promotor se define normalmente como una región de DNA, cercana al sitio de inicio de la transcripción (TSS), que es necesaria para controlar y regular el inicio de la transcripción del gen que le sucede río abajo. En humanos, para que la transcripción se inicie de forma eficiente, es necesario el ensamblado en el promotor de un complejo multiproteico que contiene a la DNA polimerasa II y seis factores de transcripción (TFs) generales, IIA, IIB, IID, IIE, IIF y IIH (Lagrange *et al.*, 1998). Este ensamblado requiere la presencia en el promotor de un número de elementos con secuencias consenso, como el elemento de reconocimiento para el factor TFIIB (BRE), el elemento promotor río abajo (DPE) (Burke y Kadonaga, 1996), el iniciador (Inr) (Smale y Baltimore, 1989) y especialmente la caja TATA (Smale y Kadonaga, 2003). Los promotores que contienen la caja TATA se descubrieron primero en organismos bacterianos, y se pensó que esta caja era el elemento promotor universal. Más tarde se descubrieron promotores humanos sin caja TATA, y su porcentaje ha ido creciendo desde entonces, desde un 22% (Bucher, 1990) hasta un 78% (Gershenzon y Ioshikhes, 2005).

Hoy en día se considera que la arquitectura del promotor con la clásica caja TATA representa una minoría de los promotores en mamíferos, siendo esta clase de promotores comúnmente asociada con genes específicos de tejidos, y la abundancia de islas CpG, que es la característica dominante de las secuencias promotoras en humanos.

La mayoría de los TFBSs son secuencias cortas de 6-20 bases localizadas en regiones no codificantes de gen, casi siempre en la zona 5' aunque a veces en 3' o incluso en intrones. Sin embargo, sólo entre 4 y 6 bases dentro de cada TFBS están completamente conservadas, y el resto son altamente variables.

La señal de splicing está en los llamados sitios de splicing que bordean los exones, y está fuertemente regulada por secuencias exónicas e intrónicas que pueden actuar como potenciadores o silenciadores de splicing. En organismos eucariotas, muchos genes están interrumpidos por secuencias no codificantes llamadas intrones. Estos intrones se transcriben en el mRNA, pero, antes de la traducción son eliminados mediante un proceso conocido como splicing. Un gen con varios exones puede procesarse de varias maneras (incluyendo distintos exones), proceso conocido como splicing alternativo.

La regulación génica a través del splicing alternativo es más versátil que la regulación a través de la actividad promotora. Los cambios en la actividad promotora alteran

predominantemente los niveles de expresión del mRNA. En cambio, cambios en el splicing alternativo pueden modular los niveles de expresión génica sometiendo al mRNA a una degradación mediada por mutaciones terminadoras (NMD) (Maquat, 2004) y alterando la estructura del producto génico insertando o eliminando partes proteicas. Los efectos causados por variaciones en el splicing alternativo van desde una pérdida completa de la función a efectos sutiles que son difíciles de detectar.

La regulación del splicing está mediada por el espliceosoma, un macro complejo compuesto de ribonucleoproteína nuclear pequeña (RNPnp) y de la familia de proteínas ricas en serina/arginina (SR). En su nivel más básico, el splicing de premRNA implica la eliminación precisa de los intrones para formar el mRNA maduro, con una pauta de lectura intacta. Un splicing correcto implica el reconocimiento de los exones y el corte y empalme precisos en las fronteras exónicas designadas por los dinucleótidos invariables GT y AG, conocidos como los sitios donador y aceptor.

Mutaciones en el sitio donador normalmente causan la pérdida (skipping) de su exón asociado (Carmel *et al.*, 2004) y a veces producen eventos adicionales como la inclusión completa del intrón (Zhang *et al.*, 2004) o la activación de sitios de splicing alternativos conocidos como sitios de splicing crípticos. (Wieringa *et al.*, 1983; Treisman *et al.*, 1983).

Cada dinucleótido está flanqueado por una secuencia más larga y menos conservada. El sitio de ramificación y la región de polipirimidinas cercanos al extremo 3' del intrón también son críticos para el splicing. Sitios menores de splicing como por ejemplo intrones "AU-AC", aunque son menos del 0.1%, también existen (Burset *et al.*, 2000).

Lo que se tiene claro hoy en día es que los dos elementos dinucleótidos de splicing consenso, aunque necesarios, no son suficientes para definir los límites intrón-exón. Para aumentar la fidelidad total de la reacción de splicing, existen otras secuencias adicionales en exones e intrones. Esos elementos de secuencia que actúan en cis pueden actuar aumentando o disminuyendo el reconocimiento y se llaman respectivamente potenciadores y silenciadores de splicing exónicos (ESE, ESS) e intrónicos (ISE, ISS). Los potenciadores y silenciadores están implicados en splicing constitutivo y alternativo, y en la mayoría de los casos no tienen una secuencia consenso bien definida. Además, esos elementos no están siempre definidos inequívocamente y sus funciones se pueden solapar.

Los ESEs han sido sujetos a muchos estudios y la mayoría, aunque no todos, se sabe que son reconocidos por miembros de la familia de proteínas SR (SF2/ASF, SC35, SRp40

y SRp55) (Tuerk y Gold, 1990). En particular, los potenciadores exónicos ricos en A/C. Las proteínas SR se unen a ESEs a través de dominios de unión al RNA y promueven el splicing reclutando componentes del espliceosoma a través de interacciones proteína-proteína por medio de dominios ricos en arginina/serina. Los factores que se unen a ESSs no se han caracterizado con el mismo detalle, sin embargo, se ha visto que algunas ribonucleoproteínas nuclear heterogéneas (RNPNh) podrían estar implicadas en interacciones con estos elementos (Baralle y Baralle, 2005). La regulación transcripcional también depende de manera importante de la estructura de la cromatina (Wasserman y Sandelin, 2004). La transcripción está modulada por los factores de transcripción y elementos reguladores en cis, pero también hay varios estudios, tanto experimentales como computacionales, que muestran que las regiones promotoras poseen un número de características dependientes de secuencia que los hace distintos del resto del genoma, como su flexibilidad, curvatura o estabilidad (Kanhare y Bansal, 2005) y que estas características tienen una gran influencia en el proceso de transcripción (Wasserman y Sandelin, 2004).

Se ha sugerido que los tríplex de DNA (Pauling y Corey, 1953; Felsenfeld *et al.*, 1957) podrían ser regiones reguladoras que pueden controlar la expresión génica (Goñi *et al.*, 2004). Las secuencias capaces de formar triple hélices (triplex-forming oligonucleotide target sequences, TTSs) son secuencias de más de 10 polipirimidinas o polipurinas, cuya presencia es mucho más abundante (Goñi *et al.*, 2004). Se ha visto que la mayor concentración de TTSs se encuentra en regiones reguladoras, especialmente en zonas promotoras, lo que sugiere una tremenda potencialidad de estas secuencias en el control de la expresión génica (Goñi *et al.*, 2004). Aunque el mecanismo por el cual actúan es muy especulativo, se cree que tiene que ver con la flexibilidad del DNA.

La flexibilidad es la facilidad con la que la molécula se puede curvar en cualquier dirección, y esta flexibilidad, que depende de su secuencia (Tsai *et al.*, 2002), puede permitir interacciones de proteínas unidas al DNA en sitios diferentes (Tsai *et al.*, 2002), o evitar impedimentos estéricos (Buckland, 2006). Algunos análisis computacionales sugieren que la curvatura intrínseca del DNA puede ser un criterio importante para el reconocimiento de la caja TATA (Nishikawa *et al.*, 2003). Además, muchos promotores sin caja TATA también contienen frecuentemente una estructura de DNA curvada, lo que indica que esta curvatura puede jugar un papel importante con independencia del tipo de promotor (Nishikawa *et al.*, 2003). Pedersen y colaboradores estudiaron genomas

procariotas y encontraron una tendencia a que el DNA promotor esté más curvado, menos flexible y menos estable que el DNA en regiones codificantes y el DNA intergénico sin promotores (Pedersen *et al.*, 2000).

La formación de tríplex en las zonas promotoras podría afectar al grado de flexibilidad y a la curvatura del DNA en esas zonas y por tanto favorecer o perjudicar la interacción entre factores de transcripción o entre factores de transcripción y sus sitios de unión al DNA.

Los SNPs que se encuentran en las regiones codificantes de los genes son a menudo SNPs no sinónimos, es decir, que cambian un aminoácido en la secuencia proteica en la que se encuentran. Estos SNPs pueden ser neutrales, donde la proteína mutada no se distingue funcionalmente de la proteína normal, o no neutrales, donde la proteína mutada puede tener su función alterada respecto a la normal. Estos SNPs, junto con los SNPs situados en regiones reguladoras, son los que probablemente tengan el mayor impacto en el fenotipo (Ramensky *et al.*, 2002).

Hay muchas formas por las que un nsSNP puede afectar a la función de la proteína. Lo más probable es una pérdida parcial o completa de la función. Algo menos probable es una mutación que produce una ganancia de función, como la observada en la activación de algunos oncogenes (Quilliam *et al.*, 1995)

En el caso de la HAS, la estrategia empleada hasta el momento consiste en identificar los genes candidatos de estudio. Estos se han identificado en estudios de ligamiento, o a partir del conocimiento sobre los diferentes sistemas involucrados en el control de la presión arterial. Una vez que estos genes se detectan, se someten a estudios de asociación con individuos no relacionados. Los genes candidatos se ordenan en varios grupos, de acuerdo con el sistema o mecanismo de regulación que los involucra.

Biológicamente los genes que son excelentes candidatos, porque codifican a proteínas que regulan la presión sanguínea, son aquellos que codifican para los componentes principales del sistema renina angiotensina (SRA) (Karet FE, 1997; Corvol P, 1997; Zee RY, 1992; Thammem F, 2008; Kunz R, 1997; Lalouel, 2007; Thiel B, 2000; Sethi AA, 2003; Izawa H, 2003; Mondry A, 2005). Fisiológicamente estos son los genes candidatos por excelencia, ya que el SRAA es el principal sistema de blanco terapéutico, es un sistema hormonal que ayuda a regular a largo plazo la presión sanguínea y el volumen extracelular corporal. La sobreexpresión de cualquiera de los componentes del SRA como la mayor actividad de las enzimas o la mayor afinidad del receptor por su ligando pueden conducir a una sobre activación del sistema.

Se conoce que el SRA presenta variantes genéticas relacionadas con una expresión variable de las proteínas, estas variantes tienen un efecto pequeño por separado sobre la presión arterial, pero su combinación posee un efecto acumulativo que podría dar lugar a un aumento en la presión sanguínea asociado a un mayor riesgo de episodios cardiovasculares como ataques cardíacos y enfermedad cerebrovascular. Todo esto resulta en un complejo mecanismo que lleva a alteraciones en la estructura de la pared vascular y del músculo cardíaco desencadenando la presencia de factores aterogénicos, inflamatorios e inmunológicos que finalmente desencadenan en esta patología (Pauletto P y Rattazzi 2006).

### 3.4. Sistema renina angiotensina (SRA)

El SRA es un sistema peptidérgico con características endocrinas que juegan un papel importante en la regulación de la PA a plazos tanto cortos como largos, el equilibrio hidrosalino y en el mantenimiento de la estructura y procesos fisiológicos del sistema cardiovascular (De Gasparo M et al, 2000). Como consecuencia de ello, el SRA está implicado en la génesis de la HAS y de la insuficiencia cardíaca y renal. El SRA consiste en una cascada de interacciones entre enzimas y sustratos (Mauer Díaz K, 2001). Los factores que influyen en la regulación de la presión, son los decrementos del volumen sanguíneo efectivo, o disminuciones de la resistencia periférica total que dan como resultado activar la liberación de renina a partir de los riñones.

La renina es una enzima que actúa sobre el AGT (sustrato de la renina) para catalizar la formación del decapeptido Ang I. A continuación, este decapeptido se desdobla mediante la ECA para dar como resultado el octapeptido Ang II. La Ang II actúa por medio de la coordinación de diversos mecanismos para aumentar la presión arterial hacia lo normal. Este péptido funciona de varias maneras con objeto de incrementar la resistencia periférica total y, así, contribuir a la regulación a corto plazo de la presión arterial. Por lo que la Ang II ha surgido como la hormona crítica afectando la función de prácticamente todos los órganos, incluyendo corazón, riñón, sistema vascular y el cerebro, teniendo efectos benéficos y patológicos (Thomas WG, 2006). La estimulación aguda con AngII regula la homeostasis de la volemia y natremia, así como la vasoconstricción, modulando la presión arterial, mientras que una estimulación crónica promueve hiperplasia e hipertrofia de las células del músculo liso vascular (CMLV). Además, la exposición a largo plazo de la AngII desempeña un papel fisiológico en la hipertensión, la remodelación, infarto al miocardio, hipertrofia, aterosclerosis, estenosis intra-stent, reducción de la fibrinólisis y fibrosis renal (MeHAS PK *et al.*, 2007; Elton TS *et al.*, 2007)

La AngII, es una hormona octapeptídica (1-8), producida sistémicamente a través de la vía clásica de SRA y vía local a través de SRA tejido específico. En la vía clásica de circulación renal del SRA, se deriva la renina que escinde AGT que es el sustrato principal de este sistema, esta alfa globulina es sintetizada por el hígado para formar el decapeptido AngI (1-10), que es muy inestable, siendo desdoblado rápidamente por acción de una carboxipeptidasa, la ECA procedente de los pulmones, dando origen al primer péptido activo del sistema la AngII. Alternativamente, una carboxipeptidasa

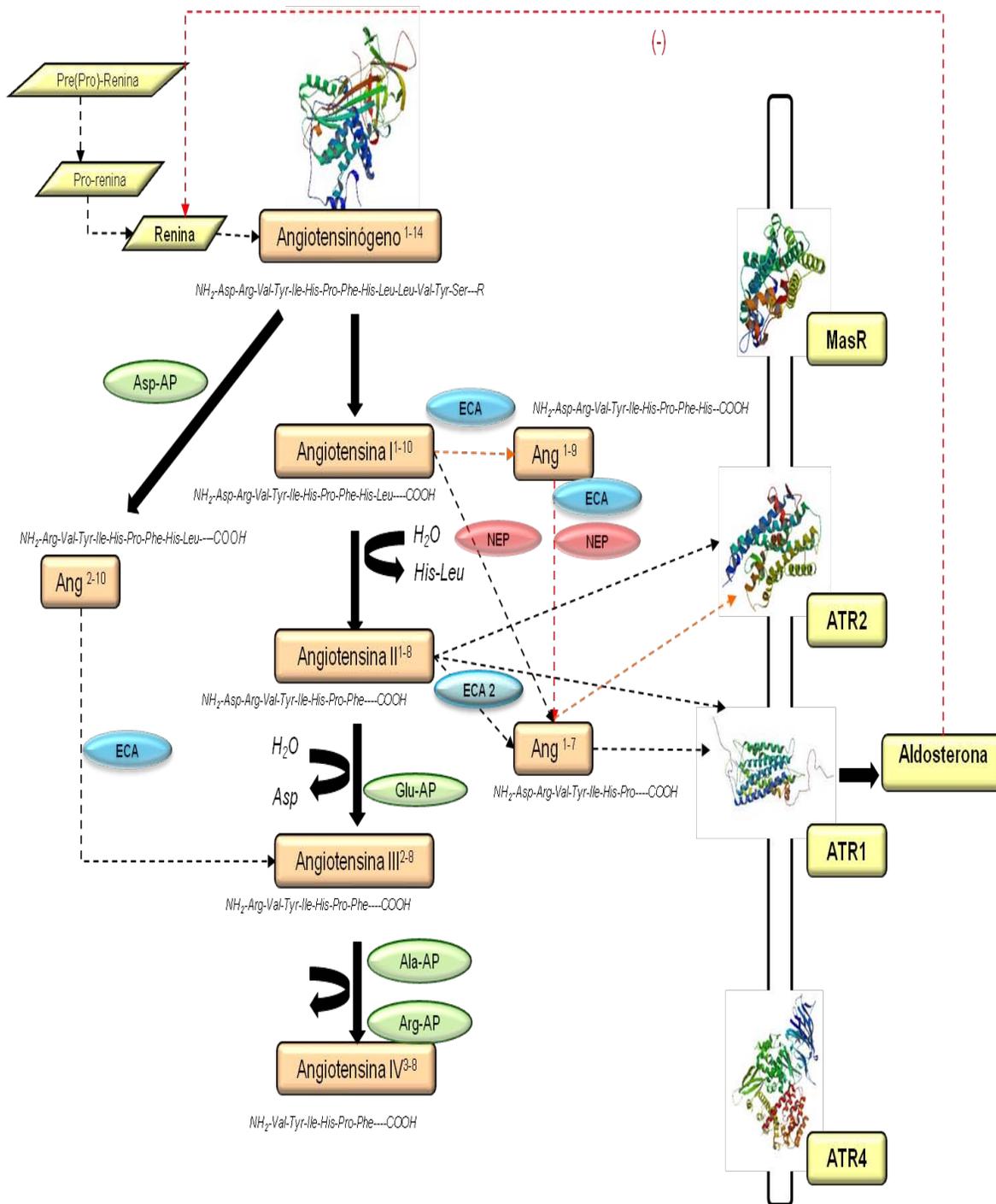
identificada recientemente, ECA2 escinde un aminoácido de AngI o AngII (Crackower MA *et al.*, 2002), disminuyendo los niveles de AngII y aumentando el metabolito Ang (1-7), que tiene propiedades vasodilatadoras. Por lo tanto, el equilibrio entre ECA y ECA2 es un factor importante para controlar los niveles de AngII. La AngII también es degradada por aminopeptidasas a AngIII (2-8) y AngIV (3-8) (Chappell MC *et al.*, 2004; Raizada MK *et al.*, 2007; Iwai M *et al.*, 2009). Originalmente el SRA era considerado como un sistema endocrino renal o sistémico; en donde la AngII que es liberada, tiene como blancos principales al riñón, glándulas suprarrenales y vasos sanguíneos (también en corazón, hígado, pulmón, cerebro y células sanguíneas), pero muchos de los componentes del SRA actúan de forma paracrina o autócrina cumpliendo funciones locales, tisulares y de tipo celular, demostrándose estas funciones a nivel del corazón, vasculatura, sistema nervioso, tracto reproductivo, piel, órgano digestivo, órgano sensitivo, tejido linfático y tejido adiposo. (Paul M *et al.*, 2006; Lavoie JL *et al.*, 2003). Además de las vías dependientes de ECA para la formación de AngII, también se han descrito las vías independientes de ECA, como es la vía de las quimotripsinas (CMA1) que pueden presentar un importante mecanismo de conversión de AngI en AngII en el corazón humano, riñones y vasos sanguíneos, siendo así una vía muy importante en condiciones patológicas como la enfermedad coronaria (Petrie MC *et al.*, 2001). Las respuestas biológicas de la AngII están mediadas por su interacción con dos distintos receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) designados como ATR1 y ATR2. Estos receptores poseen una afinidad similar para la AngII, sin embargo, farmacológicamente se pueden distinguir de acuerdo a la inhibición por antagonistas de los receptores de la angiotensina (ARBs). Diversos estudios han demostrado que la mayoría de los efectos fisiopatológicos (hipertensión, remodelación, infarto al miocardio e hipertrofia cardíaca) de la AngII son mediados vía ATR1, en contraste se cree que ATR2 contra regula la función de ATR1. También se especula que, durante la enfermedad cardiovascular, ATR2 es regulado positivamente por la activación de AngII, o por los fragmentos de péptidos de angiotensina [Ang III, Ang IV, y/o Ang (1-7)] que pueden limitar la hiperactividad mediada por ATR1 y favorecer en las patologías cardiovasculares. Aunque los receptores ATR1 y ATR2 se han investigado intensamente ahora está claro que los fragmentos de angiotensina pueden unirse y activar otros subtipos de receptores. Por ejemplo, Ang (1-7) actúa sobre el GPCR Mas (MasR) teniendo efectos vasodilatadores y antiproliferativos. Esta parte del SRA contrarresta los efectos de la AngII que actúa vía ATR1 (Oro C *et al.*, 2007; Porrello ER *et al.*, 2009; Jones ES, 2008). Además, la AngIV se puede unir al ATR4 que se une a un

receptor de aminopeptidasa regulado por insulina (APRI) y media la función cognitiva de forma incrementada, modula el flujo de sangre, aumenta la natriuresis, inhibe la hipertrofia de cardiomiocitos y mejorar la función endotelial en modelos de animales con aterosclerosis (Chai SY *et al.*, 2004; Vanderheyden PML. 2009). La Ang II es capaz de inducir y estimular la síntesis y liberación de aldosterona. Pero no solamente es la Ang II, sino toda una familia de angiotensinas (angiotensina II, III, IV, Ang 1-7, Ang 2-10) las que ejercen los efectos característicos que son atribuidos al sistema. Estos efectos están mediados a través de la estimulación de los receptores ATR1, ATR2, ATR4 y Mas (De Gasparo M, 1990; Gasparo M, 1994; De Gasparo M, 2008).

Finalmente, estudios recientes sugieren que la renina, la aspartil proteasa que escinde al AGT en AngI, y la pro-renina, que es la forma inactiva de la pro-enzima, pueden unirse a un receptor denominado como receptor de (pro)renina (RPR). De forma interesante, la unión de la renina al RPR ha demostrado que tiene dos importantes consecuencias. En primer lugar, incrementa la conversión de AGT a AngI, la pro-renina, que es inactiva en solución, pero también muestra actividad enzimática al unirse al receptor (Danser AHJ. 2009). En segundo lugar, se activa la vía de MAP cinasas, por ERK 1/2 y p38, que a su vez conduce la sobre regulación de genes profibróticos y de ciclooxigenasa-2, independientes de la generación de AngII (Nguyen G, 2010). Por lo tanto, la activación y potenciación de la actividad enzimática de renina/prorenina, junto con la señalización específica mediada por RPR, podrían tener efectos sorprendentes en la regulación cardiovascular (Danser AHJ *et al.*, 2010).

Estos estudios sugieren que SRA es complejo y puede actuar a múltiples niveles, además que surgen nuevos componentes y funciones del SRA que todavía deben estudiarse a profundidad en cuanto a la importancia fisiológica, ya que la relevancia clínica de estos factores se mantiene en gran medida sin definir, y el SRA sigue siendo un importante objetivo terapéutico para la enfermedades cardiovasculares y renales (Kobori H, *et al.*, 2007; Kobori H, *et al.*, 2007; Bader M y Ganten D, 2008).

La investigación de los sistemas locales del SRA indica que las cuatro proteínas principales de este sistema son: AGT, renina, ECA y ATR1, llegando a determinar, que el aumento de la actividad del sistema es un factor de riesgo independiente para el infarto agudo de miocardio (Fernández-Ortiz A, *et al* 1996)(**Figura 1**).



**Figura .Cascada del Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA).**

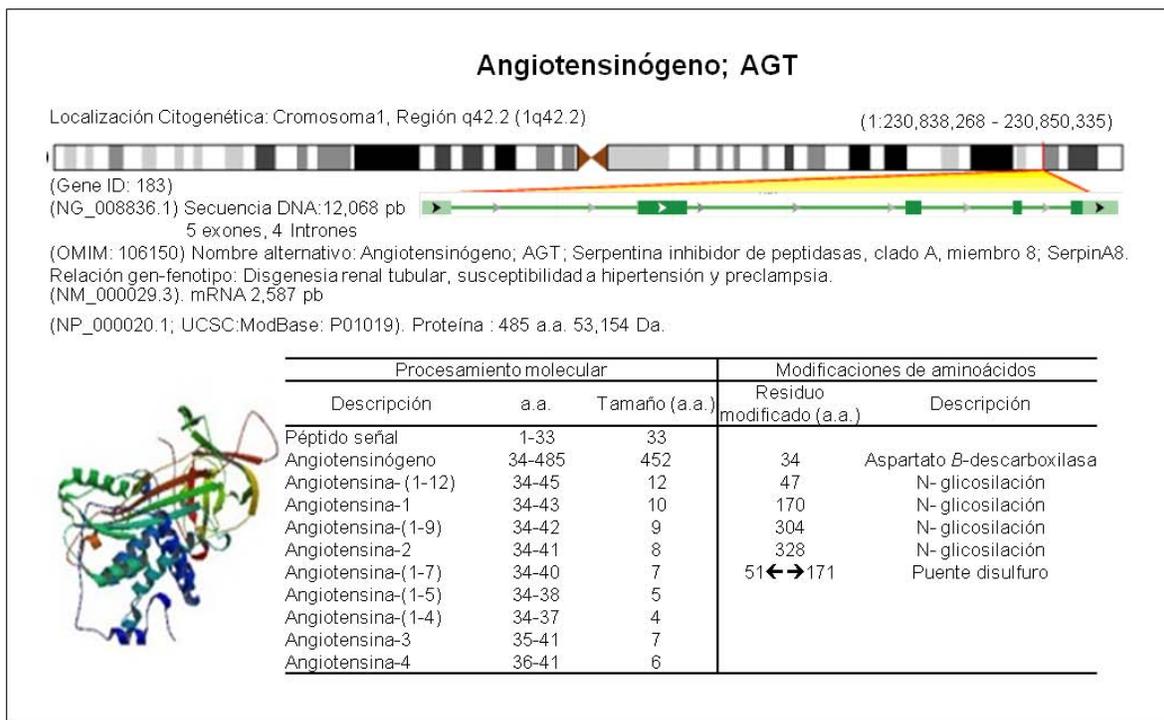
El principal péptido activo es la angiotensina II, pero la renina, ECA y angiotensinógeno, son los elementos indispensables para originar la angiotensina II. ATR2, receptor angiotensina tipo 2; AT1R, receptor angiotensina tipo 1; AT4R, receptor angiotensina tipo 4; Mas R, receptor Mas; Asp AP, aspartil aminopeptidasa; Glu AP, glutamil aminopeptidasa; Arg Ap, arginil aminopeptidasa; ECA, enzima convertidor de angiotensina; NEP, endopéptidasa neutral; ECA 2, enzima convertidor de angiotensina 2.

### 3.4.1. Características del angiotensinógeno (AGT)

El gen del AGT en roedores y humanos fue clonado, caracterizado y mapeado a lo largo de la década de 1980 (Ohkubo H *et al.*, 1983). Es conservado entre los vertebrados y tiene homología en los invertebrados (Takei Y, *et al.*, 2004). El gen del AGT en humanos es de una única copia, está localizado a 18Mb del extremo del brazo largo (qter) del cromosoma 1, en la región 42.2 (1q42.2) (Gaillard-Sanchez I., *et al.*, 1990; Isa M. N. *et al.* 1991, Boyd, E., *et al.* 1989)., extendido a lo largo de 12,068pb (230,838,268 - 230,850,335), contiene 5 exones y 4 intrones que codifican una proteína de 485 aminoácidos (aa) (Gaillard, I. *et al.*, 1989.). El primer exón contiene 505pb y abarca la región 5'UTR, el segundo exón codifica para un péptido señal de 33 a.a. y más de la mitad de la proteína madura. El exón 5 abarca el extremo C-terminal de la proteína y aproximadamente 600pb de la región 3'UTR (OMIM:106150) ( **Figura 1**).

La proteína de AGT, es una glicoproteína heterogénea de plasma, sintetizada principalmente en hepatocitos, también puede ser sintetizada en riñones, corazón y vasculatura, glándula adrenal, placenta, leucocitos, tejido adiposo y cerebro, lo cual apoya la idea de un SRA independiente. Después de la eliminación del péptido señal de 33 a.a., la proteína madura contiene 452 a.a. los primeros 10 a.a. corresponden a Ang I (34-43 a.a.) que se secreta en el plasma o compartimentos extracelulares y se encuentra en la fracción de alfa-2-globulina plasmática, es miembro de la familia de las Serpinas. Esta Ang I constituye el péptido precursor del SRA. La heterogeneidad de AGT en plasma es debida a los puntos de glicosilación, de los cuales contiene cuatro sitios putativos de N-glicosilación (Asn-Xaa-Thr/Ser): Asn14 (47 a.a.), Asn137 (170 a.a.), Asn271 (304 a.a.) y Asn295 (328 a.a.) (OMIM:106150). Los cuatro sitios pueden estar glucosilado, pero con preferencia esta se da en Asn14 y Asn271. El sitio de glucosilación Asn14 está cerca del sitio de escisión de la renina (Leu10-Val11), por lo que este punto reduce la afinidad del AGT por la renina. Estos sitios de glicosilación no parecen tener un papel crítico en el plegamiento, tráfico intracelular o la secreción de la proteína AGT. También cuenta con tres sitios de corte proteolítico, en donde actúan principalmente las enzimas renina y ECA. La proteína AGT humana contiene cuatro cisteínas, dos de ellas forman Cys18-Cys138 (51 y 171 a.a.) estas se conservan en todas las especies. La estructura cristalina del AGT humana muestra que la formación del puente disulfuro entre Cys18-Cys138 confiere un cambio conformacional que permite el acceso de la renina al sitio de escisión del AGT. Se

ha demostrado que el estado oxidativo del AGT tiene un impacto sobre la velocidad de reacción entre AGT-renina, y esta forma oxidada está presente en circulación en una relación cerca de 40:60, la transición redox sensible del AGT a una forma que se puede liberar más eficazmente de la angiotensina a nivel celular contribuye a la modulación de la presión arterial. El AGT se presenta en el plasma de dos formas, una molécula pequeña de 52 a 60 kDa y una molécula más grande de 450 a 500kDa (Zhou A, Carrell *et al.*, 2010) (Figura 2).



**Figura 1. Características del gen y proteína del Angiotensinógeno.**

**Se muestra región genómica, transcritos y productos; información recopilada de:**

**PUBMED: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.**

La regulación de expresión del gen del *AGT* se da bajo controles hormonales y de desarrollo de manera específica de acuerdo al tipo celular. La regulación predominante del *AGT* se produce a nivel transcripcional, aunque una pequeña parte se da a nivel post-transcripcional. La AngII ejerce una retroalimentación positiva en la producción de la proteína AGT, ya que mantiene la estabilidad y aumenta el ARNm del *AGT* en los hepatocitos a través de la activación del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), produciendo mayor cantidad de la proteína en plasma, a través de la acción de traducción de señales y

el activador de la transcripción que induce a la IL-6 (Jamaluddin M, *et al.*, 2000; Kobori H, *et al.*, 2007; Gonzalez-Villalobos RA, *et al.*, 2008; Brasier AR, *et al.*, 2000; Satou R, *et al.*, 2008). Existen múltiples elementos reguladores del ADN en el gen *AGT*, como son los glucocorticoides, estrógenos, y los elementos de respuesta de fase aguda, las secuencias de estos elementos se encuentran en una región de 1kb río arriba del gen del *AGT* (Jain S, *et al.*, 2007). La administración de dexametasona conduce a aumentos en el ARNm del *AGT* en hígado y en menores cantidades en cerebro. Sin embargo, son más notables los aumentos de ARNm, que de la proteína *AGT*. El estrógeno es otro regulador positivo de la síntesis del *AGT*, se ha visto que las concentraciones plasmáticas del *AGT* aumentan durante el embarazo. El estrógeno sintético de las píldoras anticonceptivas orales aumenta las concentraciones plasmáticas de *AGT* de manera dependiente de la dosis. Estos efectos pueden ser bloqueados por cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas. Pero aún hay muchos factores de confusión, como una dosis alta maligna, un cierto enfoque de la administración, interacciones con un gen o proteína secundaria que complican la interpretación de los hallazgos reportados (Deschepper CF. *et al.*, 1991).

El *AGT* es secretado rápidamente dentro de las células en compartimentos extracelulares. Por lo que la distribución de la síntesis del *AGT* se determina por las concentraciones de ARNm más que por la cantidad de proteína. El ARNm del *AGT* se ha detectado abundantemente en tejidos como el hígado, tejido adiposo, cerebro, corazón, riñones y los vasos y en concentraciones bajas o variables se ha identificado en la médula espinal, pulmones, glándulas suprarrenales, intestino grueso, estómago, bazo y ovarios.

Además de la renina, las enzimas tales como la catepsina D y G, calicreína, la pepsina, activador del plasminógeno tisular, serotonina, y la tripsina convierten al *AGT* en AngI o AngII. (Danser AH. 2003)

#### **3.4.1.1. Asociación genética del *AGT***

Los estudios genéticos han demostrado una función del *AGT* en la patogénesis de la HAS. En un informe inicial se examinó por primera vez el ligamiento y la asociación entre el gen del *AGT* y la HAS en una población Caucásica, con este estudio se proporcionó evidencia de la participación del gen del *AGT* en la patogénesis de la hipertensión esencial. En cada una de las poblaciones se mostró desequilibrio genético entre HAS y las variantes del gen *AGT* en hermanos afectados, y al comparar entre el grupo de casos

y controles, y en cuanto a las concentraciones del AGT, se observó un aumento en plasma de aproximadamente un 20% en sujetos hipertensos y homocigotos para la variante genética 235T (Jeunemaitre, X., *et al.*, 1992.). Se ha sugerido una relación funcional de la variante polimórfica M235T con el desarrollo de HAS y la asocia con el aumento de los niveles circulantes del AGT en los pacientes.

Numerosos estudios siguieron a este informe, para ver la distribución de estos alelos entre individuos hipertensos y normotensos, así como la asociación en otras enfermedades específicas y en diferentes grupos étnicos.

Algunas variantes del gen del *AGT* se han clonado y secuenciado (Kaplan NM, 2006; Mervaala E, 1999) pero sólo unos pocos polimorfismos en la región promotora (-217G> A, -20A> C, -6G>A) y el exón 2 (T174M y M235T) se han corroborado con fuertes asociaciones positivas y negativas con HAS y enfermedades cardiovasculares. Los resultados son contradictorios en varios estudios, esto se ha atribuido a que los estudios se han replicado en diferentes poblaciones, y con diferencias en el sexo y edad.

En un meta-análisis de más de 45.000 personas han presentado pruebas de que el locus *AGT* (T235M) está asociada con los niveles de AGT de plasma en los europeos y con hipertensión y en los asiáticos en una forma dependiente de la dosis. El alelo promotor -6A está en DL con 235T, y la presencia de la -6A conduce a aumento de la transcripción (Hata, *et al.*, 1994; Caulfield, M., *et al.*, 1994). Otros alelos en el promotor de *AGT*, incluyendo -20A, -217A, -532T y -793A, también afectan los niveles de AGT en plasma y los niveles de presión arterial (Caulfield, M., *et al.*, 1995; Hegele, R. A., *et al.* 1996; Guo, X., *et al.* 1999; Nakajima, T., *et al.* 2002). El haplotipo T174-T235 se vinculó a los niveles de AGT e HAS (Martinez E, Puras A, *et al.* 2002; Renner W, *et al.* 2005). Esta misma asociación se corroboró en población China (Yuan J, *et al.* 2009; Gray-McGuire C, *et al.* 2009), población de la India y en mujeres hipertensas (Srivastava K, *et al.* 2012; Mohana VU, *et al.* 2012). En metaanálisis en población China, y de Taiwán (Gu W, *et al.* 2012; Hwang BF, *et al.* 2012).

En cuanto a los estudios que involucran polimorfismos de la región proximal al promotor del gen *AGT*, muestra un cambio de A por G, a una distancia de 6pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (-6A/G), el cual actúa como un elemento transcripcional importantes del *AGT*, este sitio se encuentra en DL con la posición T235 (Inoue, I., *et al.* 1997), se ha observado que se afecta la interacción específica con factores de transcripción y esto podría estar relacionadas con la variabilidad interindividual en HAS y

los niveles de AGT (Neel, J. V., *et al.* 1998). La región -6 ubicada en el promotor codifica para la proteína YB1 (NSEP1), esta reduce la actividad basal del promotor de manera dependiente de la dosis, esta función podría deberse a las interacciones complejas que implican a otros factores nucleares (Nakajima, T., *et al.* 2002). Un estudio de distribución geográfica sugiere que la selección natural ha favorecido en general a la variante -6G sobre la variante -6<sup>a</sup>, esto en poblaciones de Asia y Europa, sugiriendo una hipótesis del escenario evolutivo para explicar la aparición de HAS (Nakajima, T., *et al.* 2004).

En otra región se identificó una mutación en la posición del aminoácido -30 del péptido señal de AGT, en la que una arginina es reemplazada por una prolina (R-30P). Los Individuos heterocigotos con R-30P mostraron una tendencia de niveles bajos de AGT en plasma en comparación con individuos normales en la familia, asociándose con HAS. Esto se explica por que el RNA mensajero del AGT humano tiene 2 codones en la fase de inicio de la traducción (AUG) rio arriba en el nucleótido 39 y 66 desde el sitio Cap, y este cambio R-30P se produce cerca del primer codón AUG, dando como resultado en alteración en cuanto a la clasificación intracelular de la proteína naciente (Nakajima, T., *et al.* 1999). En población afroamericanos y caucásicos, se encontró asociación de la región promotora e HAS (Markovic, D., *et al.* 2005; Gu, C. *et al.* 2005). El haplotipo 235T, 174T y -6A se correlacionó con altos niveles de ON y actividad de la ECA, con la asociación de HAS (Nejatizadeh A, *et al.* 2009).

Recientes estudios en población Europeo-Americana, han detectado nuevas asociaciones de los sitios polimórficos -1178G, 6066A, 6152A, 6233C, y 12822C, y en estos mismos estudios se confirmó la asociaciones de los sitios -1074T, -532T, -217A, -6A y 4072C con HAS. Con la depleción de sodio se presentó una mayor asociación con los niveles de AGT en plasma, el haplotipo que incluye las variantes -6A y 4072C, mostraron una reducción del flujo plasmático renal (Watkins WS, *et al.* 2010), lo que se detectó fue que la posición -6A/G es un marcador del haplotipo más que un polimorfismo funcional. Las variantes -1670A, -1562C, -1561T se agrupo con -6A y las variantes -1670G, -1562G, -1561G con -6G. Para complementar este estudio por medio de inmunoprecipitación de la cromatina se mostró que el factor HIF1-alfa y el factor del receptor de glucocorticoides (GR o GCCR) tuvo una mayor afinidad por el haplotipo -6A. Esto se corrobora en ratones transgénicos que expresaban el AGT humano, con el haplotipo -6A, se observa aumento de los niveles de AGT en plasma y aumento en la PA (Jain, S., *et al.* 2010).

Aunque metaanálisis en población China, de los polimorfismos A-6G y A-20C han asociado al polimorfismo A-6G con el modelo dominante (AA + AG vs GG). y la disminución del riesgo de hipertensión. El polimorfismo A-20C se asoció con riesgo a hipertensión al comparar el alelo C vs A y el modelo recesivo (CC vs CA + AA). (Gu W, *et al.* 2011). Otro metaanálisis en población China, mostro asociación de A-6G: GG, A-20C: CC, G-217A: AA (Xi B, *et al.* 2012), esto puede explicarse como se menciona en un metaanálisis en poblaciones de Chinas, donde se sugiere que el polimorfismo -6G, podría predisponer a HAS dependiendo de los grupos étnicos chinos específicos. (Li YY. *et al.* 2012). En población asiática los hombres con el genotipo -217AA tenían mayor riesgo al desarrollo de HAS, se encuentra en fuerte DL con -6G>A (Charita B, *et al.*2012).

En un estudio de individuos de seis diferentes regiones geográficas de México, se encontró que el alelo 704C, presento mayor frecuencia en la población Mestiza, Maya, Purépecha, Huicholes y Yaquis, esto al compararse con la población caucásica. En cuanto a la población Triki, el mismo alelo mostró un aumento de la frecuencia al compararse con la población caucásica, asiática y negra. El genotipo 704T estaba ausente en Trikis, Purépechas y Huicholes y era muy baja la frecuencia en mestizos, Mayas y Yaquis. (Juárez-Velázquez R, *et al.* 2010). En otro estudio realizado en población mexicana se analizaron 9 polimorfismos del gen *AGT*, las posiciones -532C/T, -217C/G, -20A/C, -6A/G, 3889C/T, 4072C/T, 6309C/T, 11535C/A, se encontró que cuatro polimorfismos, A-6, C4072, C6309 y G12775, se asociaron con un mayor riesgo a HAS, y la asociación más fuerte se encontró para el alelo C6309 con el modelo recesivo. Dos polimorfismos, A-20C y C3389T, se asociaron con un aumento de los niveles plasmáticos de *AGT*, pero no mostraron asociación con HAS. Se asociaron dos haplotipos H1 (CGAACCCCG) y H5 (CGCACCCCG) con HAS, utilizando un análisis filogenético, se observo que estos haplotipos son ancestrales y no solo explican el aumento en la concentración de *AGT* en plasma, sino que existen interacciones complejas entre los alelos de riesgo, lo cual podría estar sugiriendo que estos haplotipos actúan como "superalelos" (Balam-Ortiz E, *et al.* 2012).

### **3.4.2. Características de la renina (REN)**

El gen que codifica para la renina mide 11,522pb (204,123,943-204,135,464), al mapearlo se observa que está localizado a 45Mb del extremo del brazo largo (qter) del cromosoma

1 en la región 32.1 (1q32.1), consta de 9 exones y 8 intrones con una secuencia de codificación de 1,493pb. La forma activa de la renina es una glicoproteína que contiene 340 a.a., es sintetizada del producto primario de la traducción del gen de la renina una pre(pro)renina, que consta de 406 a.a. El péptido señal consta de 23 a.a. y es escindido a una (pro)renina, una forma madura pero inactiva de la proteína esto se lleva a cabo en el retículo endoplasmático justo antes de penetrar en el retículo endoplásmico rugoso. La (pro)renina es finalmente activada por la remoción enzimática de 43 a.a. de la región amino terminal, en la vía regulada, que en humanos sólo se ha demostrado en las células yuxtglomerulares de las arteriolas aferentes del riñón, la (pro)renina se convierte en renina, este proceso se lleva a cabo en los gránulos secretores densos (OMIM:179820) **(Figura 2)**.

La renina es una glucoproteína de la clase de las proteasas aspárticas, es secretada por las células del aparato yuxtglomerular renal donde se sintetiza como una pre(pro)enzima que después se convierte en (pro)renina, la forma madura pero inactiva de la enzima. La renina tiene una masa de 45kDa, está formada por dos lóbulos homólogos que contienen una hendidura con dos residuos aspárticos, en la que se encuentra la parte activa capaz de transformar el AGT en Ang I. La (pro)renina contiene un propéptido (fracción de 43 a.a.) que puede ocultar la parte activa de la enzima e impedir el acceso del AGT. Las concentraciones de (pro)renina en circulación son diez veces más que la de la enzima activa. La vida media de la renina en circulación es de aproximadamente 15 minutos (Pratt RE, *et al.* 1988). Para que la actividad de la renina ocurra necesita un pH alto y tenga una especificidad absoluta por el AGT. La liberación de la renina almacenada en los gránulos secretores ocurre después de estímulos apropiados, la renina humana puede ser sintetizada al menos por dos vías, una constitutiva para la secreción de (pro)renina y una regulada para la secreción de la renina madura. En la vía constitutiva, que está presente en el riñón, así como en lugares extra renales de expresión del gen de la renina, hay un flujo continuo de (pro)renina a la membrana celular y el espacio extracelular (Skott O y Briggs JP, 1987).

La renina y la (pro)renina son glucoproteínas y pertenecen a la clase de las proteasas aspárticas, las que se caracterizan por dos residuos en su centro activo, localizado en una hendidura entre los lóbulos homólogos (Tobian L, 1971). Las proteasas aspárticas son secretadas como cimógenos, los cuales poseen un propéptido N-terminal que obstruye la hendidura del sitio activo, inhibiendo así la actividad enzimática. Si bien la renina tiene la

estructura típica de las proteasas aspárticas, su cantidad óptima de pH más alto y su especificidad absoluta por el AGT la colocan aparte.

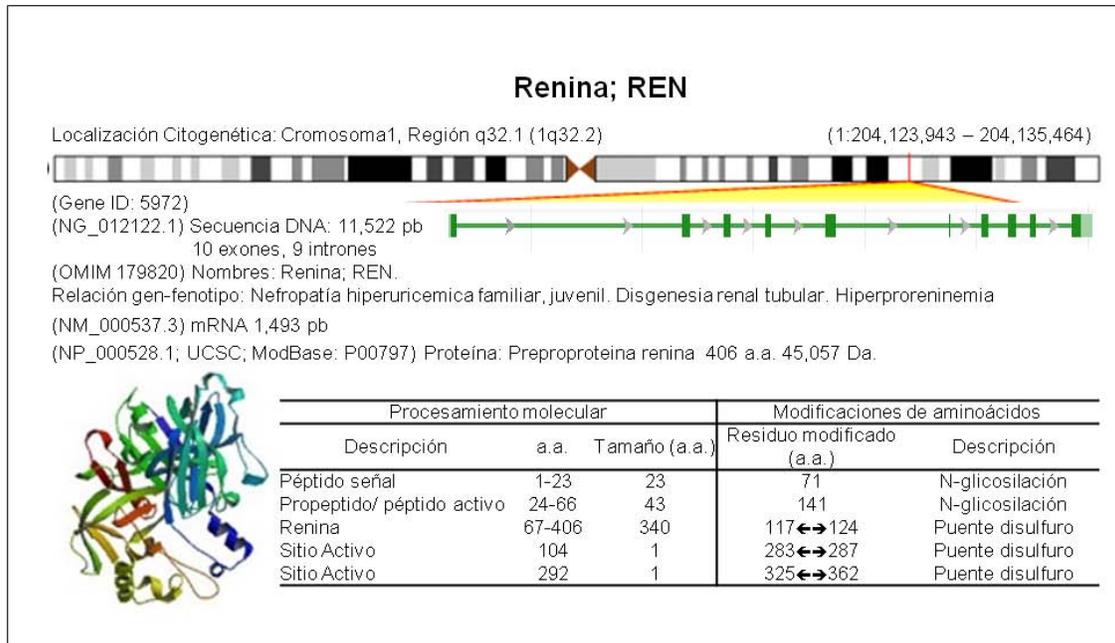
La proteólisis del AGT por la renina es una reacción de primer orden, de un sustrato. La concentración de AGT en el ser humano es aproximadamente de 1 500nM (Petrovic N y et.al.1997), la cual se halla cerca de una constante de Michaelis. Esto significa que la generación de Ang I en el plasma se ve determinada tanto por la concentración de renina como por la de AGT (Skott O y Briggs JP, 1987).

La regulación de la renina se da, por secreción de esta por las células granulares del aparato yuxtglomerular del riñón se halla regulada por muchos factores, predominantemente por tres principales vías, el primer mecanismo de control intrarrenal es el denominado vía de la macula densa, en donde incrementos del flujo de NaCl tubular captado por las células de la macula densa inhiben la liberación de renina y decremento del flujo NaCl estimulan la liberación de renina. Este proceso que se lleva a cabo en los gránulos secretores densos, es donde la enzima procesadora incide en el pro-segmento N-terminal de 43 aa. La liberación de la renina almacenada de los gránulos secretores ocurre después del estímulo apropiado. El segundo mecanismo intrarrenal de liberación de la renina es el denominado vía de los barorreceptores intrarrenales, en donde incrementos y decrementos en la presión sanguínea en los vasos pre-glomerulares, inhiben o estimulan la liberación de renina, respectivamente, encontrándose un flujo continuo de (pro)renina a la membrana celular y el espacio extracelular. El tercer mecanismo, es llamado vía de receptores B-adrenergicos, es mediada por la liberación de reflejos barorreceptores y de otros tipos que aumentan los impulsos simpáticos a las células yuxtglomerulares, incrementando la secreción de renina. Esto forma un sistema de regulación de la renina por medio de dos vías celulares; una vía constitutiva con la secreción de (pro)renina y una vía regulada por medio de la secreción de renina ya madura. También pueden influir en la secreción de la renina factores humorales.

Muchas de estas intervenciones originan en minutos un incremento en la renina plasmática. Debido a que la prorrenina no se almacena, sino que es secretada en forma continua por el riñón, éste no puede responder rápidamente a los estímulos. Sólo cuando persiste un estímulo aumentaran las concentraciones de (pro)renina. La mayoría de los estímulos que en forma aguda incrementan la secreción de renina también aumentaran las concentraciones de prorrenina a largo plazo, probablemente a través de la transcripción de genes aumentada (Tobian L, 1971).

Al parecer, la renina total está determinada por el estímulo subyacente y el grado de conversión de (pro)renina a renina aumenta con el incremento de las concentraciones de la renina total. Existen algunas excepciones a la regla, como el embarazo o la diabetes con complicaciones microvasculares. Sujetos con deficiencia de precalicreína o heterocigotos para la mutación del gen de la renina que causa un codón de parada prematuro (Petrovic N *et al.*, 1997), también tienen cifras de (pro)renina relativamente altas. No hay explicación lógica para este fenómeno. Se podría defender la hipótesis de que en tanto que la concentración de renina y de renina total se ajusten, el riñón responderá fisiológicamente a una alteración de la homeostasis a través de uno de los mecanismos ya mencionados de regulación de la liberación de renina y prorenina. Si la razón renina: renina-total está fuera de la línea puede haber alguna alteración en la maquinaria de síntesis de la renina y (pro)renina, posiblemente a nivel de la transcripción del gen de la renina extrarrenal o de la conversión intrarrenal de (pro)renina a renina (Dzau VJ, 1984).

A pesar del papel fundamental de la renina en la regulación de la presión sanguínea y en la HAS, las mediciones de renina y (pro)renina en el plasma normalmente no son de utilidad en el diagnóstico o el tratamiento. Las concentraciones de renina plasmática son similares en pacientes normotensos e hipertensos. El perfil de la renina (actividad de la renina plasmática *versus* la excreción de sodio de 24h) en la hipertensión esencial se ha defendido como indicador importante de pronóstico de enfermedad cardiovascular y como señal para el tratamiento (Sealey JE *et al.*, 1983). Su utilidad clínica, sin embargo, es objeto de controversia. Pacientes con concentraciones de renina plasmática bajas y, por tanto, con un RAS relativamente inactivo pueden todavía responder de modo favorable a los inhibidores de la ECA, aunque este efecto pueda estar mediado por la interferencia con sistemas distintos al RAS (Saris JJ *et al.*, 2002).



**Figura 2. Características del gen y proteína de la Renina.**

Se muestra región genómica, transcritos y productos; información recopilada de: PUBMED <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

### 3.4.2.1. Asociación genética de REN

Son pocos los estudios que se han descrito sobre polimorfismos para el gen de la renina, han sido más comunes los estudios sobre mutaciones puntuales, sin relación a patologías cardiovasculares (Van Hooft IMS, *et al.* 1991; Villard E, *et al.* 1994 y Ahmad U, *et al.* 2005). A pesar del papel fundamental de la renina en la regulación de la presión sanguínea y en la hipertensión, las mediciones de renina y (pro)renina en el plasma normalmente no son de utilidad en el diagnóstico o el tratamiento. Se ha visto que pacientes con concentraciones de renina plasmática baja y, por tanto, con un RAS relativamente inactivo pueden todavía responder de modo favorable a los iECA, aunque este efecto podría estar mediado por la interferencia con sistemas distintos al RAS. Al estudiar la actividad de la renina plasmática en hipertensos, observan que sus valores están inversamente asociados con la presión sistólica en hombres en una proporción 8,4%/1% respecto a las mujeres (Meade, *et al.* 1983). Estudios de este parámetro en relación con la sensibilidad a la sal no encontraron diferencias por géneros entre dietas altas y bajas sobre la PA, sin embargo, se observa un descenso mayor en mujeres con

dieta baja al compararlo con hombres (Ishibashi, *et al.* 1994), otro estudio no encuentra relación entre la actividad de la renina plasmática y la hipertensión esencial entre nigerianos (Osotimehin, *et al.* 1984), sin embargo, se detectan variaciones entre razas, observando menores niveles entre hipertensos negros al aparearlos con los blancos (Touyz, *et al.* 1995). Los factores genéticos sin duda desempeñan un papel en la HAS, y la renina es un posible gen candidato. Las variantes del gen de la renina en la hipertensión esencial se han investigado tanto en estudios de asociación como en estudios de ligamiento. Ninguno de los estudios logro involucrar al gen de la renina en la hipertensión. Por ello, el interés en el gen de la renina se ha desvanecido. Sin embargo, la heterogeneidad de la hipertensión ha podido oscurecer a un subgrupo de pacientes hipertensos en los que una variante del gen de la renina determina el fenotipo. La afinidad del AGT por la renina es la fase limitante en el sistema influyendo probablemente sobre los niveles de Ang II. Las mutaciones puntuales que se han estudiado en familias Caucásicas con alteraciones en patologías como la hiper(pro)reninemia, en donde se ha identificado una mutación puntual en el exón 10, que es una posición correspondiente al codón 387 del cDNA de la pre(pro)renin, presentando una transición de C a T que induce un codón de paro prematuro (TGA) en la secuencia del gen de la renina en lugar del codón CGA normal (arg), el alelo mutado dirige la síntesis de una forma truncada de la renina, con 20 a.a. eliminados del extremo carboxilo terminal (Morris BJ, *et al.* 1988). Pero también existen una serie de trabajos contradictorios que no encuentran relación entre la HAS y el gen de la renina, donde no había diferencias significativas en la actividad de la renina plasmática para los pacientes con HAS en el pre o postratamiento de la PA (Wang YH, *et al.* 2010) asimismo se excluye la asociación en familiares de hipertensos (Naftilan AJ, *et al.* 1989), hecho confirmado por un estudio de ligamiento realizado en gemelos el cual, descarta que el gen de la renina actúe en la patogenia de la hipertensión arterial (Jeunemaitre X, *et al.* 1992). Respecto al infarto agudo de miocardio se ha encontrado relación con el incremento de la renina circulante en pacientes hipertensos (Alderman MH, *et al.* 1991), sin embargo, no se confirma en otros trabajos (Meade TW, *et al.* 1993).

Los estudios donde se ha visto asociación del polimorfismo rs5707, son principalmente con mujeres postmenopáusicas donde se ha asociado al genotipo GG del este sitio con niveles de presión arterial en un grupo de mujeres caucásicas de más de 40 años (Mansego ML, *et al.* 2008) y con preclampsia se muestra en diferentes estudios la asociación con los sitios rs5707 y rs5705 (Wee L, *et al.* 2010).

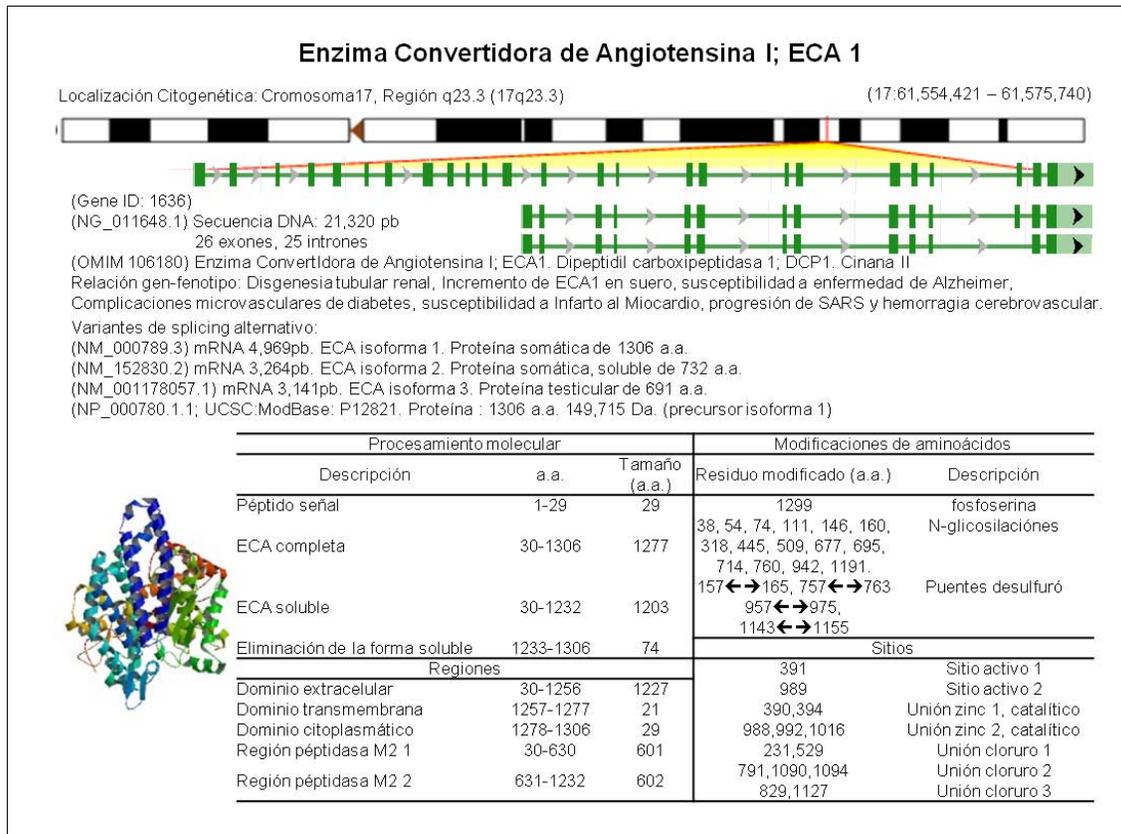
Un estudio en un grupo de mujeres encontró asociación de un haplotipos del gen *AGT* materno y el riesgo a desarrollar preclampsia, esto se trató de asociar con los niveles de renina fetal y con diferentes sitios polimórficos del feto, encontrando que no influía el haplotipo fetal de la renina en el haplotipo localizado de riesgo en la madre (Vefring HK, *et al.* 2010).

### **3.4.3. Características de la enzima convertidora de angiotensina (ECA)**

El gen ECA está localizado aproximadamente a 19Mb del extremo del brazo largo (qter) del cromosoma 17 en la región 23.3 (17q42.2), se extiende a lo largo de 21,320pb (61,554,421-61,575,740), contiene 26 exones y 25 intrones, con dos promotores alternos; un promotor somático localizado en el lado 5' del primer exón del gen, siendo el otro el promotor germinal. Dado que este gen, codifica para tres diferentes isoformas, la isoforma 1.ECA somática (4,969pb), isoforma 2.ECA testicular o germinal (3,264pb) y la isoforma 3.ECA plasmática o soluble (3,141pb). En el caso de la ECA testicular, es andrógeno-dependiente y tiene su promotor propio en el intrón 12, y es codificada desde la región 3' del gen (OMIM:106180).

La enzima convertidora de angiotensina (ECA) o dipeptidil carboxilasa pertenece a la familia de metalopeptidasas dependiente de zinc y cataliza la hidrólisis de dipéptidos a partir del grupo carboxilo terminal en gran variedad de oligopéptidos; esta dipeptidil carboxipeptidasa, se origina en gran parte en las células endoteliales por medio de un proceso proteolítico, la enzima está presente en corazón, cerebro, vasos capilares, glándulas adrenales, riñones, hígado, órganos reproductivos y con mayor abundancia en pulmón (Costerousse O *et al.*, 1992). La isoforma 1.ECA somática es la proteína completa, es una glicoproteína de 1306 aa, con una masa de 170 kDa. Es una ectoenzima bilobulada unida a la membrana celular que cuenta con una región homodimérica extracelular, la cual tiene dos dominios homólogos cada uno con un sitio catalítico N-terminal y C-terminal, un dominio de anclaje transmembrana y un extremo corto de carboxilo intracelular. El sitio C-terminal, es el sitio activo responsable del 75% de la actividad de la ECA y el responsable de la conversión de AngI a AngII (Corvol P *et al.*, 1995). La isoforma 2.ECA testicular o germinal (3,264pb) y la isoforma 3.ECA plasmática o soluble (3,141pb). La ECA convierte la AngI en AngII por la liberación de His-Leu terminal, esto da como resultado un incremento de la actividad vasoconstrictora de la Ang,

también puede inactivar a la bradicidina, un potente vasodilatador (Costerousse O *et al.*, 1992). La ECA también tienen actividad de glucosidasa, que libera proteínas ancladas a GPI de la membrana al escindir la unión de manosa (Tipnis SR *et al.*, 2000) (Figura 3).



**Figura 3. Características del gen y proteína de la Enzima convertidora de Angiotensina (ECA).**

Se muestra región genómica, transcritos y productos; información recopilada de:

PUBMED <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

### 3.4.3.1. Asociación genética de la ECA

La ECA es una enzima clave en el SRA y en el sistema calicreína-quinina (Erdos EG, *et al.* 1987; Domnita C, *et al.* 2000), juega un papel fundamental en la regulación de la PA y el balance de electrolitos. La ECA cataliza la conversión de Ang I a Ang II, uno de los más potentes vasoconstrictores conocidos en el humano. Diversos estudios han sugerido que los polimorfismos del gen de la ECA pueden explicar hasta el 47% de la variación en los

niveles séricos de la enzima (Esther CR, *et al.*1997; Rigat B, *et al.* 1990) y que esto determina el grado de actividad enzimática. Sin embargo, la mayoría de los estudios únicamente han incluido el análisis de un polimorfismo, una inserción/delección (I/D) del gen. Estos estudios han demostrado que los niveles séricos de la ECA en los individuos homocigotos para la delección (D/D) son dos veces mayores que en los individuos homocigotos para la inserción (I/I), teniendo niveles intermedios los individuos heterocigotos (I/D) (Tiret L, *et al.* 1992). Esta correlación es controversial ya que este polimorfismo se encuentra ubicado en un intrón del gen, con lo cual parece poco probable que tenga un papel funcional (Zhu X, *et al.* 2001). Otros trabajos han demostrado que este particular polimorfismo está relacionado con uno y quizá varios polimorfismos funcionales en el gen y que serían los que en realidad están condicionando las variaciones en los niveles séricos de la ECA (Tiret L, *et al.* 1992). Se ha demostrado que el loci con diferentes variantes polimórficas de esta secuencia son los que se encuentran en completo DL con el polimorfismo I/D (Rieder MJ, *et al.* 1999). La mayoría de los estudios en donde se ha corroborado el papel del polimorfismo de I/D y los niveles de la ECA, son en cardiopatías, en donde en pacientes infartados, existen diferencias de los niveles plasmáticos de ECA, con alelo D en menores de 55 años, sin embargo, los niveles de ECA plasmática en estos pacientes, descienden con la edad, indicando que los niveles plasmáticos pueden ser un factor de riesgo para infarto agudo de miocardio independiente del polimorfismo I/D (Cambien F, *et al.* 1994). En individuos con enfermedad arterial coronaria e infarto agudo de miocardio se observó que el incremento de la actividad de la ECA no es un factor de riesgo, pero DD es importante en el desarrollo de la patología en individuos sin factores de riesgo clásicos como son el fumar, tener un alto IMC e hiperlipidemias (Gardemann A, *et al.*1995). En otros estudios se ha observado un aumento de la actividad cardiaca de ECA, en los individuos DD, esto favorece los niveles cardiacos de Ang II y a su vez el riesgo de patologías cardiovasculares (Danser AH, *et al.* 1995), lo cual podría ser explicado por la asociación con el genotipo DD y un incremento de la reactividad a sustancias como la fenilefrina "*in vivo*" (Henrion D *et al.*, 1999), así como con la asociación por un aumento sobre la degradación de la bradicinina (Murphey LJ *et al.*, 2000). En cuanto a la asociación con HAS hasta ahora no se han encontrado evidencias de asociación entre los polimorfismos de ECA y los niveles de presión arterial sistólica y diastólica, ni siquiera en grupos de gemelos (Gu XX *et al.*, 1994) (Ishigami T *et al.*, 1995) (Berge KE y Berg K, 1994), aunque algunos trabajos encuentran ligamiento de este gen e HAS en una población de jóvenes caucásicos (O'Donnell, *et al.* 1998; Fornage,

*et al.* 1998), se ha asociado a DD con mayor respuesta al tratamiento con iECAs (Stavroulakis GA *et al.*, 2000), como predictor de riesgo de hipertensión al alelo D en población de la India (Ashavaid TF *et al.*, 2000.), en hipertensión maligna asociado al polimorfismo DD (43%) (Stefansson B *et al.*, 2000). En un metaanálisis, se encontró relación del polimorfismo con la actividad de la ECA, sin embargo, no se encuentra relación con PA, ni con el IAM, ni con patología isquémica cardíaca o patología cerebrovascular, solo en estudios con muestras pequeñas si existe un aumento de riesgo que va desde el 29% en II y ID y hasta un 47% en los DD (Agerholm-Larsen B *et al.*, 2000)

#### **3.4.4. Características del ATR1**

El gen que codifica para el ATR1 mide 45,133pb (148,415,657-148,460,789), al mapearlo se observa que está localizado a 45Mb del extremo del brazo largo (qter) del cromosoma 3 en la región 24 (3q24), consta de 5 exones y 4 intrones con una secuencia de codificación de 2,426pb. La forma activa de la renina es una glicoproteína que contiene 394 a.a., y un peso molecular de 41 KDa., este receptor atraviesa la membrana celular 7 veces, es un receptor acoplado a proteína G (OMIM:106165) (**Figura 4**).

El ATR1 se encuentra ampliamente distribuido en tejidos periféricos y cerebro, siendo el mediador más importante de las funciones vasoconstrictoras de la Ang II. El receptor ATR1 pertenece a la familia de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a la proteína G y a sistemas de segundos mensajeros. La inhibición de la adenilato ciclasa a través de la proteína G reduce la concentración de AMP cíclico y activa a la fosfolipasa D, A2 y C, lo cual resulta en la generación de eicosanoides y en la activación de la vía del fosfoinositol, respectivamente. El resultado final de esta activación es el aumento intracelular de calcio y la activación de la proteína quinasa C, lo cual se asocia con la generación de factores transcripcionales asociados con el crecimiento (FTC) (Vázquez *et al.*, 1998; Stroth y Unger, 1999).

Mediante técnicas de biología molecular, se ha comprobado la existencia de dos subtipos en el receptor ATR1: el ATR1A y el ATR1B, que se diferencian en la secuencia de aminoácidos de la zona C-terminal de su estructura molecular (De Gasparo *et al.*, 2000). El receptor ATR1A está altamente expresado en hígado, riñón, aorta, útero, ovario, bazo,

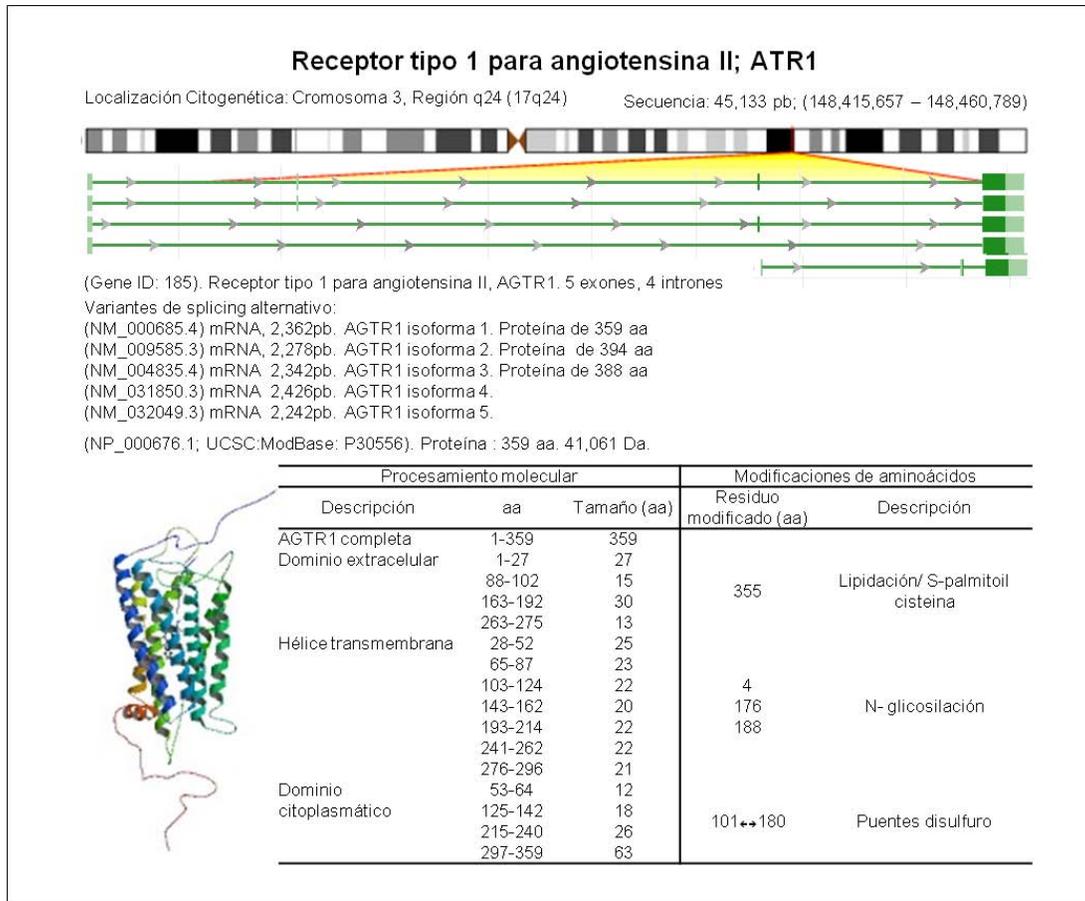
pulmón y cerebro. El receptor ATR1B se expresa en la hipófisis, glándula adrenal, riñón, útero e hígado, y está ausente en el corazón, cerebro y bazo (Escalante, 2004). La importancia funcional de los receptores ATR2 queda de manifiesto al comprobar el efecto vasodilatador de la Ang II, que se produce al bloquear el receptor ATR1 que media los efectos vasoconstrictores de la Ang II. Los efectos biológicos de la Ang II se encuentran balanceados por una activación dual de vasoconstricción y vasodilatación a través de estos dos receptores. Así pues, en el sistema cardiovascular el efecto vasopresor de la Ang II está acoplado al receptor ATR1.

Entre los péptidos con actividad biológica de este sistema, la Ang II y la Ang III ejercen sus efectos mediante la unión a los receptores ATR1 y ATR2, mientras que la Ang IV se une de forma específica al receptor ATR4. Estudios llevados a cabo con antagonistas selectivos (Fontes *et al.*, 1994; Santos y Campagnole-Santos, 1994) han puesto de manifiesto que otro de los péptidos activos del RAS, la Ang (1-7), actúa a través de un receptor distinto a los ATR1 y ATR2 (Santos y Campagnole-Santos, 1994). Este receptor es el protooncogen MAS, fue detectado por primera vez *in vivo* debido a sus propiedades pro-tumorales (Young *et al.*, 1986; Rabin *et al.*, 1987). Este protooncogen codifica una proteína con siete dominios transmembrana hidrofóbicos, y se considera que forma parte de la familia de receptores acoplados a la proteína G (Zohn *et al.*, 1998). Los primeros estudios de transfección realizados indicaron que el gen MAS podría codificar un receptor para la Ang II. Además, el receptor MAS y el ATR1 parecían estar relacionados, ya que los incrementos en la concentración celular de  $Ca^{2+}$  en las células transfectadas con MAS sólo ocurren cuando dichas células también expresan el receptor ATR1.

Al unirse el péptido Ang (1-7) al receptor MAS estimula la liberación de ON y prostaglandinas, provocando vasodilatación e inhibición del crecimiento celular (Sampaio *et al.*, 2007), efectos que tendrían como consecuencia una mejora de la función endotelial. De hecho, en las aortas de los ratones MAS-Knockout no se ejerce el efecto vasodilatador de la Ang (1-7) (Santos *et al.*, 2003). La estimulación de la liberación de ON por la Ang (1-7), mediada por el receptor MAS, no se acompaña de una modificación en la concentración de calcio intracelular, lo que sugiere la participación de una vía de señalización no dependiente del calcio (Heitsch *et al.*, 2001).

Por otro lado, uno de los mecanismos más importantes a través del cual el SRA modula la función vascular es mediante la regulación del estado redox. En este sentido, la Ang II actúa como un factor pro-oxidante, ya que aumenta la producción del anión superóxido

mediante la activación de la NAD(P)H oxidasa. Por el contrario, la Ang (1-7) mediante su unión al receptor MAS y el aumento en la liberación de ON es capaz de contrarrestar los efectos pro-oxidantes de la AngII (Rabelo *et al.*, 2011). Los datos disponibles hasta la fecha señalan al receptor MAS y al péptido Ang (1-7) como importantes moduladores de los efectos perjudiciales ejercidos por la AngII a través del receptor ATR1.



**Figura 4. Características del gen y proteína del receptor tipo 1 para angiotensina II (ATR1).**

Se muestra región genómica, transcritos y productos; información recopilada de:

PUBMED <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

#### 3.4.4.1. Asociación genética del ATR1

El primer estudio donde se exploró la asociación del gen ATR1 con HAS, se observó que, los polimorfismos de la región UTR-3' estaban implicados con hipertensión en familias caucásicas (Bonnardeaux A, *et al.* 1994). Posteriormente algunos de estos sitios se

asociaron con un aumento de la vasoconstricción en arteriola eferente, existiendo relación entre los polimorfismos de región codificante y la respuesta hemodinámica renal y humoral al bloqueo del receptor y a la infusión de Ang II intrarrenal y periférica (Miller JA, *et al.* 1999). Estos polimorfismos se asociaron con vasoconstricción en arterias coronarias, cuya importancia clínica parece venir definida por un aumento de la respuesta a la Ang II, encontrándose en DL, lo que puede explicar la relación descrita entre este polimorfismo y anormalidades cardiovasculares (van Geel PP, *et al.* 2000). Varios hallazgos recientes y meta-análisis corroboran esta asociación (Shahin DS, *et al.* 2014; Wang J-L, *et al.* 2010); sin embargo, existen varios resultados contradictorios que también son reportados por algunos estudios (Sugimoto K, *et al.* 2014; Liu Y, *et al.* 2002). Sin embargo, no parece existir correlación directa entre la influencia de este polimorfismo sobre la HAS y la acción de los agentes farmacológicos que bloquean la acción del receptor, los antagonistas del receptor ATR1, son altamente exitosos en el tratamiento de hipertensión arterial, es un importante diana para el control de la hipertensión arterial dependiente de Ang II.

### **3.4.5. Péptidos del SRA**

El angiotensinógeno (1-14), como se ha comentado anteriormente da origen a dos principales péptidos Ang I y la Ang II.

La Angiotensina I o Ang (1-10) (34-43 aa), es un decapeptido que no tiene prácticamente actividad biológica por su rápida conversión a Ang II. Cuando el ECA está inhibido, puede ejercer acciones similares a la Ang II, pero muy inferiores en cuanto a su potencia (Fyhrquist F, *et al.*, 2008). Se ha observado que la Ang I es capaz de estimular la liberación de las catecolaminas de la médula adrenal e inducir sed (efecto dipsógeno), cuando se inyecta directamente en el sistema nervioso central (SNC) (Hertting G. y Meyer D.K. 1974).

Angiotensina II o Ang (1-8) (34-41 aa), La Ang II es el principal péptido bioactivo del SRA. Se trata de un octapéptido de intensa acción vasoconstrictora y corta vida de aproximadamente un minuto. Este péptido juega un importante papel en la regulación de las funciones renales, vasculares y cardíacas (Kobori H, *et al.* 2007; Kobori H, *et al.* 2007). Sus funciones principales son provocar la secreción de vasopresina, estimular la

sensación de sed, efecto vasoconstrictor, estimular la secreción de aldosterona y favorecer la transmisión sináptica, además de ejercer su conocido efecto de elevación de la presión sanguínea por otros mecanismos (Touyz y Schiffrin, 2000). Por ejemplo, en el corazón la Ang II incrementa el flujo del calcio y la fuerza de contracción del músculo (Tamargo, 1996). Existen diferencias interespecíficas debidas al aminoácido que está en la posición 5. La forma humana tiene isoleucina mientras que la forma bovina, que se emplea en clínica y experimentalmente, tiene valina en esta posición. La Ang II desempeña un papel clave en la regulación de la homeostasis cardiovascular, regulando tanto la resistencia vascular como el volumen de sangre. El amplio espectro de tejidos diana que presenta la Ang II incluye las glándulas suprarrenales, los riñones, el cerebro, la hipófisis, el músculo liso vascular, y el sistema nervioso simpático (SNS). La Ang II es una hormona que se produce y actúa en la circulación, pero que también se forma localmente en muchos tejidos tales como el cerebro, el riñón, el corazón y los vasos sanguíneos. Esto ha llevado a sugerir que la Ang II también puede funcionar mediante mecanismos parácrinos y autócrinos, induciendo el crecimiento celular, la proliferación y el control de la formación de la matriz extracelular (De Gasparo *et al.*, 2000). El mecanismo de acción de la Ang II es muy similar al de la endotelina. Logra su acción mediante un aumento del  $Ca^{2+}$  en el citosol por la vía de la fosfolipasa C y de la proteína quinasa, pero con la propiedad de activar a los protooncogenes; de ahí su efecto nocivo a nivel estructural a largo plazo. Lo anterior permite concluir que la Ang II es un mitógeno, disfrazado de vasoconstrictor. La Ang II normalmente se une al receptor ATR1, pero cuando este receptor es bloqueado, se une a los receptores ATR2 los cuales son muy activos en la vida embrionaria, en el proceso de diferenciación y de vasculogénesis. Paradójicamente, la Ang II ligada a este receptor ATR2 se vuelve vasodilatadora, antimitógena y antiproliferativa. Estos receptores también estimulan la producción del ON. Por lo que la Ang II puede ser perjudicial o benéfica, según el receptor al que se una (De Gasparo *et al.*, 1994; De Gasparo, 2002).

La Ang III (35-41 aa) o Ang (2-8), fue descrita en los años 70, La Ang III se genera a partir de la Ang II por acción de la aminopeptidasa A (AP-A o Glu-AP), esta AP A, es una zinc metalopeptidasa que ha adquirido relevancia fisiológica ya que es la principal enzima responsable de la formación de Ang III. Esta aminopeptidasa (AP) rompe el enlace peptídico entre los aminoácidos Asp-1 y Arg-2 y convierte a la Ang II en Ang III. De esta forma, la Ang III es el primer metabolito de la Ang-II (Banegas *et al.*, 2006) sus efectos son similares a los de la AngII tiene efecto vasoconstrictor y de liberación de aldosterona,

aunque es menos potente y tiene vida media más corta. Estimula receptores ATR1 y ATR2 (De Gasparo *et al.*, 2000; Banegas *et al.*, 2008), no está claro su papel fisiológico, pero puede ser más importante que la Ang II para la liberación de vasopresina, acción que estaría mediada por receptores ATR1, pero su vida media es tan corta que sus efectos globales son débiles. (Zini S, *et al.* 1996). La inhibición central, pero no periférica, de esta AP-A provoca un descenso de la PA. Esta observación ha despertado el interés por encontrar un inhibidor selectivo de la enzima para el tratamiento de la HAS, que pueda atravesar la barrera hematoencefálica y actúe a nivel central (Réaux *et al.*, 2001).

Se ha descrito que en ratas la Ang III, a diferencia de la Ang II, puede producir incremento de la natriuresis a través del estímulo de receptores ATR2, este efecto es mayor cuando se bloquea la aminopeptidasa-N encargada de la conversión en Ang IV o Ang (3-8) (36-41 aa) (Padia SH, *et al.* 2008). La Ang IV procede de la Ang III por la AP-M, que rompe el enlace entre Arg-1 y Val-2 de la Ang III o de la Ang II, puede producir vasodilatación renal y liberación de mediadores e intervenir en procesos cognitivos, como la memoria, a través de diferentes vías relacionadas con péptidos de acción central. Este péptido biológicamente activo ha alcanzado un interés creciente a raíz del descubrimiento y la clonación de unos receptores con actividad aminopeptidasa y que son regulados por la insulina (IRAP/ATR4), con gran afinidad por el péptido Ang IV. (Albiston AL, *et al.* 2001), pero también podría estimular el receptor ATR1 (LiXC, *et al.* 2006). Las acciones de la Ang IV mediadas por IRAP incluyen vasodilatación renal, así como hipertrofia y activación de NF- $\kappa$ B que conduce a una mayor expresión del activador de plaquetas. Varios estudios indican que la Ang IV tiene importantes funciones reguladoras en el metabolismo renal, el daño cardiovascular la regulación de los flujos sanguíneos locales, incluido el cerebral, pero también se le ha asignado un papel en procesos cognitivos, estrés, ansiedad y depresión (Ribeiro-Oliveira A, *et al.* 2008). Participa en la regulación del crecimiento de los fibroblastos cardiacos, las células endoteliales y las del músculo liso vascular. Estos efectos ligados a la liberación de mediadores inflamatorios como el PAI-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ , lo que lo hace tener un papel importante en la fisiopatología de la enfermedad cardiovascular (Ruiz-Ortega M, *et al.* 2007) En el riñón aumenta el flujo renal cortical sin modificar la PA y disminuye el transporte de sodio en el túbulo proximal. La producción de la Ang IV parece tener un papel importante a nivel tisular pero no en plasma.

La Ang (1-7) (34-40 aa), Durante mucho tiempo se pensó que el péptido Ang (1-7) carecía de efectos biológicos, pero desde hace unos años han ido apareciendo numerosos

trabajos que demuestran la existencia de tales efectos. Esta angiotensina se forma a través de un mecanismo enzimático independiente del ECA, cuyo origen puede ser la Ang I por medio de la peptidasas en las células musculares lisas vasculares (CMLV); por medio de la endopeptidasa neutra (en células endoteliales (CE); y de la prolil endopeptidasa en el cerebro canino y en células vasculares de la aorta y venas umbilicales. También, se genera a partir de Ang II o de Ang I por el ECA 2, aunque la conversión a partir de Ang II es mucho más eficiente (500 veces). Por otro lado, la Ang (1-7) se forma en la circulación a partir de Ang I por una vía independiente de la generación de Ang II. Se genera a partir de Ang (1-9) por medio del ECA y la neprililina. Tiene efectos contrarios a los de Ang II, principalmente vasodilatadores y antitroóficas (inhibición de síntesis proteica). Interviene en la regulación de la PA y posee efectos antiproliferativos. Aunque las evidencias indican que la Ang (1-7) actúa como vasodilatador, los inhibidores selectivos de los receptores ATR1 y ATR2 no alteran la vasodilatación inducida por este péptido. Se ha propuesto la existencia de una interacción entre la Ang(1-7) y el sistema bradicinina-ON, dado que el heptapéptido potencia los efectos de la bradicinina y puede incrementar la liberación de ON en la pared vascular. La Ang(1-7) tendría un papel inhibidor de la síntesis de proteínas en los cardiomiocitos. El receptor para Ang(1-7) es un oncogén llamado Mas (Ferrario CM 2006), datos recientes demuestran que está ligado a una proteína G y activa la ON-sintetasa lo que aumenta la producción de ON (SampaioWO, *et al.* 2007.). Los pacientes tratados con iECAs o ARAII presentan niveles urinarios elevados de Ang(1-7) lo que ha llevado a pensar que puede jugar algún papel en su efecto antihipertensivo, por el contrario los niveles están disminuidos en hipertensos no tratados (VaragicJ, *et al.* 2008). De este péptido se ha visto la formación de dos péptidos más Ang(1-5) (34-38 a.a.), Ang(1-4) (34-37 a.a.), aun no asociados a alguna función específica.

La Ang(1-9) (34-42 a.a.), es generada a partir de la Ang I por acción de la ECA 2, enzima que también participa en la síntesis de Ang(1-7). Se desconoce el papel de este péptido, pero cada vez hay más datos a favor de que la ECA 2 pueda ser un importante regulador del SRA al ser capaz de degradar la Ang II y modular sus efectos presores. Su expresión aumenta en las células cardíacas después de un infarto, además existen concentraciones elevadas en el riñón y se ha postulado su papel renoprotector (CrackowerMA, *et al.* 2002; DanilczykU *et al.* 2006.). Las concentraciones de Ang(1-9) en corazón y riñón se incrementan como consecuencia del tratamiento con IECA, este tipo de fármacos no inhiben la actividad enzimática de la ECA 2 (FerrarioCM, *et al.* 2005; Ferrario CM

2010; Ferrario CM, Varagic J. 2010). Recientemente se ha caracterizado un péptido más del SRA es la Ang(1-12), procedente del AGT, solo se ha demostrado su existencia invitro en diferentes órganos y tejidos de rata, encontrándose concentraciones elevadas en corazón, riñón y muy bajas en la pared vascular. Provoca la contracción de arterias aisladas de rata in vivo, tiene efectos presores que no se producen si el animal es pretratado con IECA o ARA II, lo que sugiere que este nuevo componente del SRA puede ser un precursor de la Ang I y que sus efectos estarían mediados por conversión a AngII(NagataS, 2006). Aun no se ha dilucidado el papel específico de este péptido así como no hay la suficiente información sobre las enzimas que pueden participar en la síntesis de Ang(1-12) ni en su conversión en Ang I y Ang II.( Drozdowicz D, *et al.*2012)

En resumen, a pesar de los importantes progresos en el entendimiento de los sistemas fisiológicos que regulan la presión sanguínea en el humano, la gran mayoría de los factores genéticos que determinan la variabilidad de la PA permanecen aún desconocidos. La PA es un rasgo cuantitativo multifactorial que muestra una distribución continua en la población general y, aunque múltiples líneas de evidencia demuestran la importancia de los factores genéticos en la variabilidad de la presión sanguínea, es claro que su impacto en el desarrollo de hipertensión está íntimamente relacionado con factores demográficos y ambientales. El entendimiento de su fisiopatología, así como el discernimiento de los factores que en esta participan conducirá a un adecuado tratamiento, reduciendo de esta manera el daño a órganos diana y la mortalidad a largo plazo.

Aunque existe una gran cantidad de estudios en estos genes, es importante mencionar que no han sido replicados en las diferentes poblaciones de estudio, debido a un sin número de variables, que incluyen tamaño de muestra pequeña, origen étnico, estratificación poblacional, etcétera. Por lo que es necesario realizar estudios de replicación en las diferentes poblaciones, incluyendo a la nuestra para saber si éstos causan susceptibilidad. Es bien conocido que entre las poblaciones existe una gran heterogeneidad genética, esto trae la posibilidad que SNPs asociados en esta patología en poblaciones caucásicas no se repliquen en hispanas, africanas u otras. Se debe además evaluar la correlación entre genotipos y el aspecto clínico y de tratamiento. Por otro lado, es necesario evaluar el efecto funcional de los SNPs ubicados en los intrones, exones, promotores, 5' y 3' Otras, *enhancer*, etcétera, en los diversos genes asociados a

esta patología, de esta manera podremos determinar la relevancia biológica dentro de una célula, tejido u organismo entero y ver su efecto en el fenotipo hipertenso.

El presente trabajo es parte de un proyecto de investigación multidisciplinario para la detección, control y tratamiento óptimo de la HAS en el contexto de la población Mexicana. Particularmente de los genes candidatos del SRA.



## **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La HAS es un factor de riesgo inminente para sufrir un evento cardiovascular o cerebrovascular catastrófico. En los últimos años se ha observado un incremento en la prevalencia e incidencia de la HAS, en adultos mayores. Siendo esta un padecimiento crónico degenerativo y silencioso, que disminuye la esperanza de vida.

La regulación de la presión arterial es una de las funciones fisiológicas más complejas, ya que depende de las acciones integradas de los sistemas cardiovasculares, renales, neurales y endocrinos. Uno de los sistemas hormonales de regulación más importante es el Sistema Renina Angiotensina (SRA), ya que regula a largo plazo la presión sanguínea y el volumen extracelular corporal, los componentes moleculares de este sistema interactúan con los principales fármacos antihipertensivos. Los genes encargados de codificar las moléculas de este sistema han sido asociados al desarrollo de HAS, lo que sugiere que estos factores genéticos participan en diferenciar a la enfermedad, así como, en la respuesta a fármacos y el tratamiento.

Los hallazgos en diversos estudios no son aplicables a la población mexicana, debido a que presenta características distintivas a otras poblaciones, ya que presentan variantes genéticas propias de susceptibilidad que no están completamente identificadas.

Estas consideraciones fundamentaron el interés e importancia para realizar el presente estudio.

### **4.1. Pregunta de Investigación**

¿Cuáles son los polimorfismos del SRA que contribuyen a la susceptibilidad para HAS y cuál es su distribución en la población mexicana?



## 5. JUSTIFICACIÓN

Este padecimiento es un principal factor de riesgo para sufrir un evento cardiovascular mayor y llegar a ocasionar la muerte. En México según el Censo de población y vivienda 2000, se registraron 49.7 millones de mexicanos entre los 20 y 69 años, de los cuales 15.16 millones (30.05%) se consideraron portadores de HAS. Además, se ha estimado que en países en vías de desarrollo cada año entre 1.5% y 5% de la población muere por causas directamente relacionadas a HAS.

Si se considera únicamente a la tasa más baja de mortalidad por HAS (1.5%), en el año 2000 ocurrieron 227,400 muertes potencialmente atribuibles a HAS (53.1%; que no reciben tratamiento). En otras palabras, ocurre una muerte cada 2 minutos. Si bien a este número de muertes potenciales habría que restar 14.6% de personas hipertensas que logran controlar la enfermedad, con esto dicha cifra se reduciría a 194,199 muertes, cambiando la estimación a una muerte por cada 3 minutos.

El aumento en la prevalencia e incidencia de HAS a nivel mundial y en nuestro país, en todas las edades y el alto costo que conlleva su atención y la de sus comorbilidades en la edad adulta, obliga a desarrollar estrategias de predicción diagnóstica y prevención desde etapas tempranas de la vida.

Este padecimiento es de origen multifactorial, ya que en su desencadenamiento participan tanto factores genéticos como ambientales. Estudios previos han sugerido que el componente genético juega un papel importante en el desarrollo de la HAS, llevando a resaltar la participación que pueden desempeñar los polimorfismos de los genes que codifican para las proteínas involucradas en el SRA y la regulación de la presión sanguínea. En la población mexicana no existen estudios sobre la relación de los polimorfismos de los genes del SRA en la susceptibilidad al desarrollo de HAS, y las observaciones realizadas en otras poblaciones no son aplicables a la nuestra debido a que la estructura genética del mestizo mexicano es particular, (para los años 90's se sabía que el genoma del mexicano se conformaba por 56% de genes amerindios, 40% de genes caucásicos y 4% de genes negroides) (Lisker, *et al.* 1990). Recientemente en estudios realizados sobre marcadores de ancestría se indicó que la estructura del genoma de los mexicanos se compone de 69% de genes amerindios, 26% de genes caucásicos y 5% de genes negroides (Juárez-Cedillo, *et al.* 2008). Debido a esta particularidad en la estructura del genoma del mexicano es necesario realizar estudios específicos en nuestra

población para establecer una posible asociación entre dichos polimorfismos y el desarrollo de la HAS.

En los modelos de prevención y predicción, deben incorporarse los antecedentes familiares de HAS así como, los genes candidatos asociados en la población. Bajo esta perspectiva este estudio pretende contribuir en identificar a los genes del SRA que codifican para proteínas relevantes en la patogénesis de la HAS y definir marcadores de susceptibilidad o resistencia a este padecimiento que pudieran ser nativos en la población mexicana. Dada la alta heredabilidad de la enfermedad en población mexicana, la identificación del perfil genético contribuirá a la detección de población en riesgo. Con esto un beneficio potencial será contribuir a la prevención del desarrollo de la HAS.

## 6. HIPÓTESIS

- Si las proteínas del SRA participan en la regulación de la presión sanguínea y los genes que las codifican presentan sitios polimórficos que regulan su producción, entonces algunos de sus alelos podrían diferenciar a los individuos hipertensos de los normotensos y ser por tanto marcadores de susceptibilidad y/o resistencia para el desarrollo de la HAS.

## 7. OBJETIVOS

### 7.1. General

Identificar los polimorfismos de los genes *AGT*, *REN*, *ECA* y *ATR1* del SRA, relacionados con la presencia de HAS en la población mexicana y los efectos aditivos de aquellos que confieran mayor susceptibilidad.

### 7.2. Específicos

1. Conocer las frecuencias alélicas y genotípicas de los distintos sitios polimórficos de los genes que codifican para las proteínas SRA en el grupo de individuos mexicanos con HAS y el grupo de individuos normotensos.
2. Identificar la asociación de los polimorfismos de los genes del SRA con la presencia de HAS mediante la comparación del perfil genético entre casos-controles en la población mexicana.
3. Analizar los modelos de herencia de los sitios polimórficos asociados y conocer cómo se lleva a cabo la interacción con las covariables, para definir cuál es el factor de riesgo de cada una de ellas.
4. Evaluar el desequilibrio de ligamiento y construir los haplotipos entre las variantes polimórficas de cada gen del SRA.
5. Identificar diferencias con los parámetros clínicos-demográficos y los parámetros bioquímicos entre los genotipos.
6. Relacionar los hallazgos genéticos con la alteración en las concentraciones de las proteínas de los componentes del SRA.



## **8. METODOLOGÍA**

### **8.1. Diseño**

Tipo de estudio:

Estudios epidemiológico, de casos y controles, retrospectivo, observacional y analítico.

### **8.2. Población**

Se incluyeron participantes del estudio GEA (Genética de la Enfermedad Aterosclerosa) en su fase basal. El estudio GEA fue diseñado en el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” para identificar y analizar las bases genómicas que predisponen a la enfermedad arterial coronaria (EAC), y examinar la relación de factores de riesgo tradicionales y emergentes con la aterosclerosis establecida y la forma subclínica de la enfermedad en población mexicana. El estudio total incluyó 1,500 pacientes con EAC prematura y 1,500 individuos control sin manifestaciones clínicas de enfermedad cardiovascular, podían tener HAS y DM2 bajo control y tratamiento médico, de ambos sexos, con edad de 30 a 75 años.

El grupo de interés para este estudio fueron los participantes del grupo control, estos fueron seleccionados de la población que acudio con fines de donación al Banco de Sangre del INCICH y mediante invitación por medios escritos.

Los criterios de inclusión fueron individuos sin historia personal ni familiar, en primer grado, de EAC prematura. Se incluyó solo un miembro por familia que, después de conocer las características del estudio, aceptaron participar mediante la firma de un consentimiento informado. A todos los participantes se les aplicaron cuestionarios estandarizados para obtener información demográfica, nivel de escolaridad, ingreso económico, historia familiar y personal de enfermedad cardiovascular, hábitos dietarios, actividad física, consumo de alcohol, uso de medicamentos y suplementos vitamínicos, así como antropometría, química sanguínea, tomografía, ultrasonido de carótidas y determinación de grasa corporal.

Para fines de este estudio se selecciono un grupo de hipertensos con niveles PAS $\geq$ 140 mmHg y/o PAD $\geq$ 90 mmHg, o bien diagnóstico previo de hipertensión y que tomaran medicamentos antihipertensivos de forma controlada.

Para el caso de los individuos que conformaron el grupo normotenso, debieron tener niveles de presión arterial normal, es decir PAS $<$ 140mmHg y PAD $<$ 90 mmHg.

Los criterios de exclusión para ambos grupos fueron que tuvieran alguna enfermedad no relacionada con hipertensión que represente per se un riesgo de morbimortalidad a mediano o corto plazo, cualquier historia de accidente cerebro vascular, insuficiencia hepática grave, renal o Insuficiencia cardiaca grave o terminal, embarazo o lactancia, obesidad mórbida extrema, intolerancia a medicamentos antihipertensivos de uso común, enfermedad autoinmune, cáncer, enfermedad pulmonar de importante repercusión clínica así como con problemas tiroideos sin tratamiento o tratamiento con corticosteroides, o cualquier condición médica por la cual el individuo este impedido para completar el estudio, no fueron seleccionados.

Fue requisito que el participante y dos generaciones previas a él fueran mestizos (españoles-amerindios) y hayan nacido en México. Cabe mencionar que el presente protocolo cumple con los requisitos del Comité Institucional de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Cardiología, por quien fue aprobado.

### **8.3. Tamaño de la muestra**

Para el cálculo de tamaño de muestra, se consideraron de forma individual la frecuencia de cada uno de los polimorfismos incluidos en el estudio. La estimación se realizó mediante el programa Quanto V2.1. En este modelo logístico se considero un tipo de herencia multifactorial, con una prevalencia de la enfermedad de 32%, un alfa de 0.01, poder de 0.8 y el dato de la frecuencia de la variante génica reportada en el HapMap para cada polimorfismo. Se identificó además la estimación del riesgo (OR) de cada uno de los polimorfismos reportado en la literatura, considerando los siguientes aspectos:

1. Información disponible sobre HAS, si no se encontraba información se consideraron estudios en enfermedades con fisiopatología común a la enfermedad (obesidad, síndrome metabólico, dislipidemia).

2. Se dio prioridad a la información publicada en población mexicana, México-americana o americana. En los casos en que no se contaba con información se consideró información en población europea, asiática o africana.

El cálculo de tamaño de muestra se hizo de forma individual para cada uno de los polimorfismos y los tamaños de muestra variaron entre 20 a 115, considerando  $OR \geq 1.5$ ,  $\alpha = 0.01$ , poder 0.8. Bajo estos criterios el presente trabajo incluyó a 610 participantes del grupo control del estudio GEA, los cuales se definieron como hipertensos a 239 individuos.

#### **8.4. Antropometría**

El peso se midió en una báscula calibrada y la talla utilizando un estadímetro de pared SECA 222 (Hamburgo, Alemania). El IMC se calculó con la fórmula  $(\text{kg})/(\text{m}^2)$ . La circunferencia de cintura se midió con una cinta métrica de fibra de vidrio, en el punto medio de la distancia entre la parte inferior de la última costilla y la cresta iliaca. La tensión arterial se midió en posición sedente, después de por lo menos 10 minutos de reposo, utilizando un esfigmomanómetro digital Welch Allyn, series 52000 (Shaneateles Falls, N.Y. EUA), para el análisis de los niveles de presión arterial se tomó el promedio de las dos últimas de tres mediciones consecutivas.

#### **8.5. Parámetros bioquímicos**

Después de un ayuno de 12 horas y 15 minutos de reposo en posición sedente, se colectan 45 ml. de sangre venosa en tubos con y sin EDTA. El plasma y el suero fueron separados en alícuotas. A las alícuotas de plasma se añadieron inhibidores de proteasas (Aprotinina 100 KIU/ml, Benzamidina 1mM), todas las alícuotas se conservaron a  $-70^\circ\text{C}$ . Las determinaciones de colesterol total, TG y glucosa en plasma, se realizaron en muestras frescas con un autoanalizador Hitachi 902 (Hitachi LTD Tokio, Japan), utilizando estuches enzimáticos comerciales (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania). El colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) se determinó mediante un método enzimático homogéneo (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania). El colesterol de las

lipoproteínas de baja densidad (C-LDL) se calculó mediante la fórmula de Friedwald modificada por De Long. La precisión y la exactitud de las determinaciones de lípidos son evaluadas periódicamente por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta (CDC, por sus siglas en inglés).

## 8.6. Estudio genético

### 8.6.1. Selección de SNPs

Se incluyeron polimorfismos para los cuales existieran antecedentes publicados de su relación con HAS y que estuvieran descritos y validados en las bases de datos públicas.

Se consultó la base de datos de acceso libre dbSNP (National Center Biotechnology Information, NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>), aquí están todos los polimorfismos descritos en el genoma humano y ofrece información sobre su localización en las distintas regiones del gen, se consultó la base Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>); la cual mantiene una anotación automática de los genomas e integra cualquier información biológica relacionada con características derivadas de la secuencia del genoma, como es el caso de las variantes polimórficas, la base PupaSuite (<http://bioinfo.cipf.es/>) permite la selección de polimorfismos con efectos funcionales. Su interfaz interactiva permite utilizar filtros de información funcional, tanto a nivel transcripcional como traduccional, así como frecuencias alélicas y parámetros de DL. Los criterios para escoger polimorfismos funcionales de las bases de datos públicas anteriormente descritas, fueron los siguientes:

- SNPs codificantes de cambio de aminoácido.
- SNPs promotores, localizados en posibles sitios de unión a factores de transcripción o a otros elementos reguladores.
  - SNPs intrónicos que pudieran afectar al procesamiento de splicing.
  - SNPs en regiones transcritas pero no traducidas, regiones 3'UTR y 5'UTR.

Para aquellos polimorfismos que estaban previamente validados en las bases de datos públicas, se tuvo en cuenta que el alelo menos común tuviera una frecuencia superior al 1% (Minor Allele Frequency o MAF < 0.01).

Con esto para los estudios de asociación entre polimorfismos del SRA se eligieron 21 polimorfismos de nucleótido sencillo (SNP por sus siglas en inglés), 5 pertenecientes al gen del *AGT*, 5 al gen del receptor *ATR1*, 2 pertenecientes al gen *REN* y 9 del gen de la *ECA* (Tabla 1).

**Tabla 1. Polimorfismos seleccionados para el estudio.**

Gen	Identificación del SNP <sup>a</sup>	Localización	Tipo de SNP	Cambio alelo	Cambio de aa
<b>AGT</b> <b>Chr. 1</b>	rs5046	Promotor	Sustitución transición	A/G	
	rs5049	5' UTR	Sustitución transición	C/T	
	rs5051	5' UTR	Sustitución transición	C/T	
	rs4762	3' UTR	sin sentido	ACG ⇒ ATG	Thr[T] ⇒ Met[M]
	rs699		sin sentido	ATG ⇒ ACG	Met[M] ⇒ Thr[T]
<b>ATR1</b> <b>Chr 3</b>	rs275651	Promotor	Región gen 5´	A/T	
	rs275652	Promotor	Región gen5´	G/T	
	rs275653	Promotor	Región gen5´	A/G	
	rs5182	Exón 3	Mutación silente	CTC ⇒ CTT	Leu[L] ⇒ Leu[L]
	rs5183	Exón	Mutación silente sinónima	CCA ⇒ CCG	Pro[P] ⇒ Pro[P]
<b>ECA</b> <b>Chr. 7</b>	rs4291	Promotor	Sustitución transversión	A/T	
	rs4318	Intrón	Mutación con cambio de sentido	A/G	
	rs4335	Intrón	Sustitución transición	A/G	
	rs4646994	Intron	Inserción/ Delección	(289BP ALU)-	
	rs4343	Exón	Sustitución transición	A/G	
	rs4344	Intrón	Sustitución transición	A/G	
	rs4353	Intrón	Sustitución transición	A/G	
	rs4362	Exón	No sinónima	TTT ⇒ TTC	F [Phe] ⇒ F [Phe]
<b>REN</b> <b>Chr.1</b>	rs5707	Intron	Sustitución transición	G/T	
	rs5705	Exon	Sustitución transición	ACA ⇒ ACC	T [Thr] ⇒ T [Thr]

<sup>a</sup>Nombre que recibe de acuerdo a la base del NCBI;dbSNP

<sup>b</sup>Orden de cada polimorfismo en cada gen desacuerdo a la posición en el cromosoma

ECA: Enzima convertidora de angiotensina

AGT: Angiotensinógeno

ATR1: Receptor tipo I de angiotensina II

REN: Renina

Chr: Cromosoma

a.a: aminoácido

### 8.6.2. Extracción de ADN

El aislamiento del ADN se realizó partir de la muestra de sangre periférica obtenida en tubos con EDTA, por la técnica de extracción salina con Tritón X-100 (modificado de Lahiri y Numberger, 1991). La pureza y concentración se cuantificó por espectrofotometría a 260/280nm , que indican la pureza de los acidos nucleicos con respecto a sales, alcoholes y otros reactivos y a proteínas (Fluorímetro ND-1000; NanoDrop; Thermo Scientific) y por fraccionamiento electroforetico se verificó la integridad del ADN en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etilio. Finalmente, los ADN genomicos se ajustaron a una concentración de 200ng/ul con TE (Tris-EDTA) y se hicieron alícuotas, las cuales se guardaron a -70°C, -20°C y a 4°C y 10ng/ul, para su óptima preservación y uso posterior.

### 8.6.3. Detección de SNP's

Los estudios genéticos se realizaron mediante la plataforma Taqman® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), por la tecnica de PCR en tiempo real en un equipo ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los genotipos de cada muestra fueron determinados automáticamente estableciendo las medidas de fluorescencia alelo específico para detectar la amplificación de productos mediante lectura láser. Los resultados se analizaron empleando un software de discriminación alélica, que permite definir los distintos alelos de forma exacta. Para verificar las sondas en la muestra, estas debieron de amplificar en más del 90% de las muestras, porsteriormente se tomo al azar un 30% de la muestra (n=183) y se verifico que la concordancia de los datos fuera >98%. El polimorfismo *I/D* fue determinado por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los iniciadores 5'-CTGCAGACCACTCCCATCCTTTCT-3' y 5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3' como previamente fue descrito por Rigat y colaboradores (10). Con el fin de eliminar errores en la genotipificación de los individuos con genotipo *D/D*, las muestras de estos individuos fueron sujetas a una segunda amplificación utilizando los iniciadores 5a: 5'-TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC-3' y 5c: 5'-TCGCCAGCCCTCCCATGCCATAA-3') (16).

#### 8.6.4. Análisis bioinformático

Se utilizaron herramientas bioinformáticas para el análisis más detallado del posible efecto funcional de algunas de las variantes. Para información adicional SNPinfo (<https://snpinfo.niehs.nih.gov/>). Para el análisis de variables reguladoras que podrían afectar sitios de unión a factores de transcripción se utilizó regSNP (<http://viis.abdn.ac.uk/regsnp/Home.aspx>), esta herramienta utiliza las bases TRANSFAC (<http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html>) y JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>) para la predicción de los sitios reguladores, proporcionando una puntuación para cada uno de los alelos del SNP. Además, se consultó la herramienta is-rSNP (<http://omictools.com/in-silico-regulatory-snp-detection-tool>) que predice, para un SNP determinado, un grupo de factores de transcripción cuya unión podría verse afectada por la variante, asignando un valor de  $p$  a cada una de las predicciones. Para el análisis de variantes que podrían afectar el splicing se utilizaron los programas de predicción de sitios donadores y aceptores ESEfinder (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>), FSPLICE (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fsplce&group=programs%20&subgroup=gfind>) y HSF (<http://www.umd.be/HSF3/>). Las variantes de cambio de aminoácido se analizaron, inicialmente, con las herramientas PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), que nos dice que tan probable la variante puede ser benigna o perjudicial, y SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) predice el efecto del cambio de aminoácido en función del grado de conservación del residuo. Finalmente el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) se utilizó para realizar alineamientos múltiples de las secuencias de la región 3'UTR.

### 8.7. Estudio molecular

#### 8.7.1. Cuantificación de ECA

Los niveles séricos de ECA fueron cuantificados utilizando estuches comerciales de ELISA. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La densidad óptica de las muestras se leyó a 450 nm y se extrapoló en la

curva estándar correspondiente, los datos se expresan en pg/mL; el kit usado fue ECA: (Human ACE ELISA Kit; EK0557).

### **8.7.2. Cuantificación de Ang II y Ang (1-7)**

Se determinaron simultáneamente en el suero o plasma de los individuos hipertensos y normotensos, los péptidos Ang II y la Ang 1-7, por electroforesis capilar de zona, bajo detección UV por arreglo de diodos a 200 nm, según la metodología de Tenorio *et al.*. Las muestras fueron procesada y analizadas directamente con el sistema P/ACE™ MDQ de Beckman Coulter (Urbana, IL, USA). Las concentraciones de los péptidos Ang II y Ang 1-7 se determinan mediante el empleo de una curva estándar y se expresan en pmoles/ml. (Tenorio-López FA, *et al.* 2010)

## **8.8. Análisis estadístico**

### **8.8.1. Análisis descriptivo y de asociación**

Se analizaron las variables demográficas y clínicas entre los grupos de hipertensos y normotensos con Stata v.12.0 para Windows. Se analizó la estadística descriptiva (concentración y dispersión) de las variables estudiadas y se identificaron diferencias en las alteraciones metabólicas entre los hipertensos y normotensos, por medio de la prueba U de Mann Whitney, presentando los datos como mediana y percentiles 25 y 75. Las variables categóricas se analizaron con la prueba de Chi-cuadrada o exacta de Fisher según se requiera, los datos se presentaron como frecuencias absolutas y proporciones.

En cuanto al análisis genético se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de los genes del SRA por conteo directo. En cada grupo de estudio se evaluó la calidad de los datos en relación a la proporción de muestras de éxito genotípico (mayor al 90%), la frecuencia del alelo menor y el equilibrio de Hardy Weinberg.

Para el análisis de asociación de los polimorfismos con la enfermedad, las diferencias entre grupos (hipertensos y normotensos) se determinó usando la prueba de  $X^2$  de Mantel-Haenzel, la cual combina tablas de contingencia de 2x2 usando el programa

estadístico EpilnfoV 5.0 (USD Incorporated 1990, Stone Mountain, GA, USA). Cuando el número comparado en alguna celda menor a 5, se utilizó la prueba Exacta de Fisher. El nivel de significancia establecido fue  $p < 0.05$ , este valor se corrigió por medio de la prueba de Bonferroni ( $p_C$ ) multiplicando el valor de  $p$  obtenido por el número de comparaciones realizadas en cada locus, con nivel de significancia establecido como  $p_C < 0.05$ . El riesgo relativo con intervalo de confianza del 95% (IC) fue evaluado como razón de momios (RM) utilizando el método de Woolf (Woolf, 1995)

### **8.8.2. Modelos genéticos**

Se utilizó un análisis de asociación entre los genotipos de los diversos polimorfismos y las variables de respuesta mediante una regresión logística bivariada para estimar el riesgo de los polimorfismos y la hipertensión, la significancia estadística se estableció en  $p \leq 0,05$ .

De acuerdo con el número de copias necesarias a fin de modificar el riesgo, se consideraron cinco modelos de herencia: Modelo co-dominante, dominante, recesivo, heterocigoto y aditivo, con el fin de estimar el riesgo de asociación entre cada genotipo y la enfermedad en los grupos de estudio. Estas comparaciones se realizan mediante el test de la razón de verosimilitud, eligiendo el mejor modelo de acuerdo al menor valor del criterio de información de Akaike ( $AIC = -2\log[L] + \#\text{parámetros}$ ), donde  $L$  es la verosimilitud del modelo, este criterio pondera el ajuste del modelo ( $-2\log L$ ) con la complejidad (número de parámetros).

Se construyeron modelos logísticos múltiples con el fin de identificar las variables que explican mejor el riesgo de desarrollar hipertensión entre los grupos estudiados.

Los modelos fueron construidos incluyendo una variable a la vez, hasta encontrar el modelo de efectos principales que incluyó a las variables con relevancia biológica o con significancia estadística, o ambos, así como las variables potencialmente confusoras o modificadoras de efecto, en donde sesgo de confusión fue aceptado cuando los cambios en los odds ratios estimados (OR) fueron iguales o mayores al 10%, para la modificación del efecto y se construyeron y probaron interacciones, los términos que se incluyeron en el modelo fueron cuando el valor  $p \geq 0.20$ . Se realizó la prueba de bondad de ajuste Hosmer-Lemeshow para cada modelo logístico múltiple.

### 8.8.3. Haplotipos y TagSNPs

Con el fin de obtener la máxima información sobre la variabilidad genética de los genes estudiados, se utilizó la información de la base de datos del HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) y el programa Haploview versión 4.2 (<https://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/programs/medical-and-population-genetics/haploview/haploview>) (*Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology and Harvard University, Cambridge, MA, Estados Unidos*). Con el cual se estimó el DL, se construyeron los haplotipos de las variantes polimórficas e identificaron los SNPs que fueran marcadores (tagSNPs) de los principales bloques de haplotipos. En dicho programa se ingresaron los genotipos obtenidos de cada polimorfismo, de los hipertensos y normotensos. Haploview crea varias mediciones de desequilibrio de ligamiento (DL) que utiliza para crear una representación gráfica, conocida como mapa de haplotipos. El DL hace referencia a una situación en la que una combinación particular de alelos, en dos loci próximos segregan ligados más frecuentemente que lo que cabría esperar por azar dada su frecuencia en la población. Las medidas de DL establecidas fueron  $D' \times 100$  y  $LOD \geq 2.0$ . El método escogido para realizar la selección de tagSNPs fue de pares (pairwise) y el coeficiente de correlación,  $r^2$ , de medida de DL, se fijó en  $\geq 0.8$

## 9. RESULTADOS

### 9.1. Características de la muestra de estudio

La población estudiada incluyó un total de 610 individuos, de los cuales 239 individuos fueron hipertensos (120 hombres y 119 mujeres), con mediana de 58 años y un grupo de 371 individuos normotensos (168 hombres y 203 mujeres) con mediana de 56 años. Las características clínico demográficas de los individuos hipertensos y normotensos se muestran en la **Tabla 2**.

Al comparar entre los grupos de estudio, los individuos hipertensos, mostraron un incremento en el IMC (29.3 vs 27.1;  $p<0.000$ ), elevación en los niveles de glucosa (95 vs 90;  $p<0.000$ ), triglicéridos [160 vs 142;  $p=0.0029$ ], y niveles de presión arterial sistólica [137.5 vs 111.5;  $p<0.000$ ] y diastólica [81.5 vs 69.5;  $p<0.000$ ], en cuanto a los hábitos del grupo hipertenso el consumo de alcohol fue más elevado, de un 61% ( $p=0.0250$ ), estos datos al compararse con el grupo normotenso.

En cuanto al grupo de individuos normotensos, se encontraron diferencias en factores de riesgo como son el hábito de fumar con un 28% y antecedentes familiares de hipertensión con un 59%. El promedio de edad, distribución por sexo, niveles de colesterol total, LDL y HDL, así como diabetes mellitus tipo 2, fueron similares en ambos grupos de estudio, sin diferencias significativas.

**Tabla 2. Características generales de la población de estudio.**

Variables	Hipertensos (≥140/90 mmHg) (n=239)			Normotensos (≤140/90 mmHg) (n=371)			P
	P25	Mediana	P75	P25	mediana	P75	
Edad (años)	51	58	63	52	56	62	NS
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	<b>26.8</b>	<b>29.3</b>	<b>32.1</b>	24.5	27.1	29.8	<b>0.0000</b>
Glucosa (mg/dl)	<b>88</b>	<b>95</b>	<b>108</b>	83	90	115	<b>0.0000</b>
Colesterol (mg/dl)	175.3	196	215	166	193	211	NS
HDL (mg/dl)	36	44	54	37	45	56	NS
LDL (mg/dl)	99.6	121.4	138	98	118.8	137	NS
Triglicéridos (mg/dl)	<b>117</b>	<b>160</b>	<b>215</b>	105	142	191	<b>0.0029</b>
Presión Arterial							
Sistólica (mmHg)	<b>127</b>	<b>137.5</b>	<b>151</b>	103	111.5	121	<b>0.0000</b>
Diastólica (mmHg)	<b>74.3</b>	<b>81.5</b>	<b>87.5</b>	65	69.5	76	<b>0.0000</b>
Sexo; n (%)							
Masculino		120(50)			168(45)		NS
Femenino		119(50)			203(55)		
Habito de fumar; n(%)							
Si		43(18)			<b>104(28)</b>		<b>0.0030</b>
No		196(82)			267(72)		
Consumo de Alcohol							
Nunca		94 (39)			177 (48)		<b>0.0250</b>
>= 6g/ por día		<b>145 (61)</b>			194 (52)		
Diabetes Mellitus tipo II							
Si		33 (14)			71 (19)		NS
No		206 (86)			300 (81)		
Antecedentes familiares de hipertensión							
Si		181(48)			<b>140(59)</b>		<b>0.0110</b>
No		190(52)			99(42)		

Variables continuas, los datos se muestran como mediana y percentiles 25 y 75, por prueba U de Mann Whitney.

Variables cualitativas, se analizaron por medio de  $\chi^2$  o prueba exacta de Fisher, según corresponda, los datos se muestran como n y porcentajes [n(%)], p<0.05.

C-HDL: colesterol asociado a las lipoproteínas de alta densidad; C-LDL: colesterol asociado a las lipoproteínas de baja densidad. IMC, Índice de masa corporal. NS; no significativo.

## 9.2. SNPs del gen AGT

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los cinco polimorfismos estudiados rs699, rs4762, rs5051, rs5049 y rs5046 en el gen del AGT en los individuos hipertensos y normotensos se muestran en la **Tabla 3**. Las frecuencias observadas y esperadas en todos los sitios polimórficos estudiados en este gen se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg. En cuanto a la una distribución alélica y genotípica de los polimorfismos de este gen fueron similares en ambos grupos de estudio, sin mostrarse diferencias estadísticamente significativas.

**Tabla 3. Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos del gen AGT.**

Polimorfismos	Alelos Genótipos	Hipertensos (n=239) n(%)	Normotensos (n=371) n(%)	P*
<b>rs5046</b>	C/T	442 (92)/36 (8)	698 (94)/44 (6)	<b>0.136</b>
	CC/CT/TT	204 (85)/34 (14.6)/1 (0.4)	330 (89)/38 (10.2)/ 3 (0.8)	<b>0.286</b>
<b>rs5049</b>	T/G	35 (7)/ 443 (93)	40 (5)/ 702 (95)	0.085
	TT/ TG/ GG	1 (0.4)/ 33 (13.8)/ 205 (85.8)	2 (0.5)/ 36 (9.7)/ 333 (89.8)	0.291
<b>rs5051</b>	A/G	310 (65)/ 521 (70)	168 (35)/ 221 (30)	<b>0.025</b>
	AA/ AG/GG	98 (41)/ 114 (48)/ 27 (11)	180 (48)/ 161 (43)/ 30 (8)	<b>0.135</b>
<b>rs4762</b>	C/ T	72 (10)/ 670 (90)	61 (13)/ 417 (87)	NS
	TT/CT/CC	185 (77)/ 47 (20)/ 7 (3)	303 (82)/ 64 (17)/ 4 (1)	NS
<b>rs699</b>	C/T	315 (66)/ 163 (34)	519 (70)/ 223 (30)	NS
	CC/CT/TT	100 (42)/ 115 (48)/ 24 (10)	178 (48)/ 163 (44)/ 30 (8)	NS

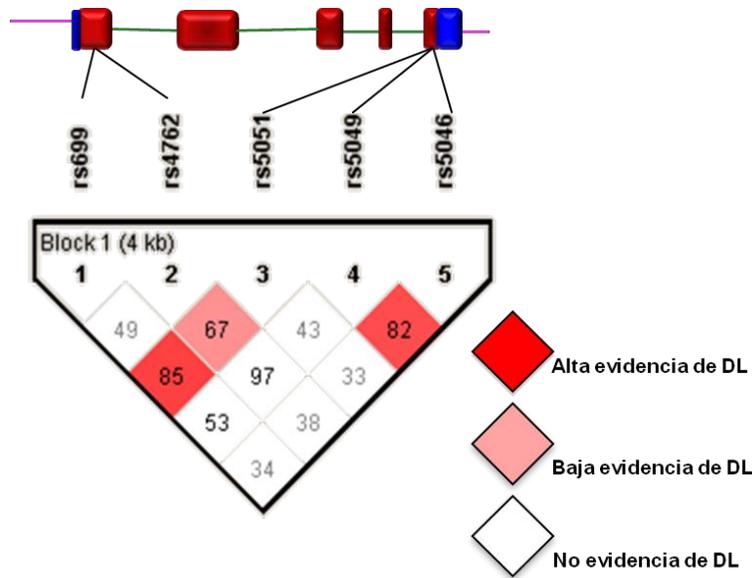
Prueba de  $\chi^2$  para diferencia de la distribución entre grupos.

Frecuencias alélicas y genotípicas expresadas como número y porcentaje [n (%)].

$p < 0.05$ ; NS; no significativo.

### 9.2.1. DL del gen AGT

El análisis de DL entre los polimorfismos del gen *AGT*, se conformo por un bloque compuesto de siete haplotipos H1: **CCAGC**, H2:**TCGGC**, H3:**CTAGC**, H4:**CCAAT**, H5:**CCGGC**, H6:**TCAGC**, H7:**TTGGC** (el orden de los polimorfismos en las secuencias de haplotipos es rs699, rs4762, rs5051, rs5049 y rs5046) (**Figura 6**). El haplotipo H1: **CCAGC** mostró fuerte asociación, con un incremento de frecuencia en el grupo de individuos normotensos al ser comparado con los individuos hipertensos ( $p=0.0025$ , RM=0.69, IC del 95%= 0.55 a 0.87). La distribución de los haplotipos H2 al H7 fue similar entre los individuos hipertensos y normotensos, sin diferencias significativas (**Tabla 4, Figura 6**).



**Figura 5. Mapa de DL del gen AGT.**

Se muestra el valor del coeficiente de DL en cada casilla (valores de  $D'$  cercanos 100). La combinación de colores dentro del mapa de haplotipos representa las relaciones de DL, los cuadros color rojo brillante representan alto DL (logaritmo de odds [LOD] score  $\geq 2$  y  $D'=1$ ), los cuadros color rojo claro o rosa indican bajo DL (LOD score  $\geq 2$  y  $D' < 1$ ), y los cuadros color blanco significan que no existe DL y segregación independiente (LOD score  $\leq 2$  y  $D' < 1$ ).

**Tabla 4. Frecuencia de haplotipos del gen AGT.**

Haplotipos	Secuencia	Frecuencias		RM (95% CI)	P
		Hipertensos	Normotensos		
H1	C-C-A-G-C	0.447	0.537	0.69 (0.55-0.87)	0.0025
H2	T-C-G-G-C	0.281	0.250	--	NS
H3	C-T-A-G-C	0.102	0.081	--	NS
H4	C-C-A-A-T	0.048	0.037	--	NS
H5	C-C-G-G-C	0.035	0.027	--	NS
H6	T-C-A-G-C	0.024	0.025	--	NS
H7	T-T-G-G-C	0.016	0.010	--	NS

Análisis Haploview v.4.2 y StatCalc EpiInfo v7.0.

RM: Razón de momios; IC: intervalo de confianza, NS; no significativo.

P<0.05

El orden de los polimorfismos corresponde a la posición que ocupan en el cromosoma (rs699, rs4762, rs5051, rs5049 y rs5046).

En este haplotipo las mejores medidas de DL, entre los polimorfismos, y la combinación de las frecuencias alélicas de los loci involucrados en el cálculo con evidencia de DL se presento entre los marcadores rs699 y rs5051 ( $D'=0.854$ ,  $LOD=134.66$ ,  $r^2=0.721$ ), el

marcador rs4762 y rs5051 ( $D'=0.673$ ,  $LOD=3.49$ ,  $r^2=0.026$ , y los marcadores rs5049 y rs5046 ( $D'=0.826$ ,  $LOD=57.82$ ,  $r^2=0.637$ ) y una leve evidencia de DL entre los marcadores rs4762 y rs5051 ( $D'=0.673$ ,  $LOD=3.49$ ,  $r^2=0.026$ ), la relación entre los otros marcadores mostraron valores de DL bajos o no existentes, sugiriéndose una segregación independiente (**Tabla 5**).

**Tabla 5. Medidas de DL entre polimorfismos del gen AGT; valores  $D'$ , LOD y  $r^2$**

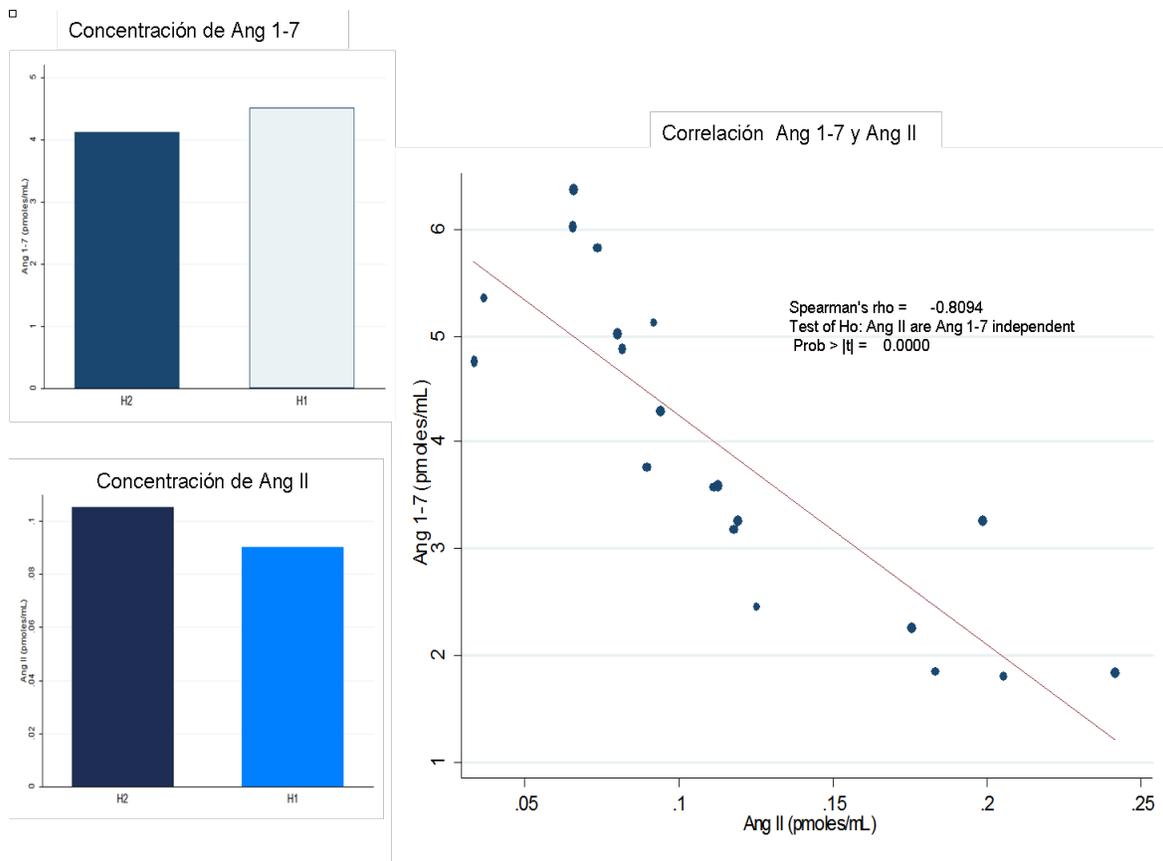
SNP 1	SNP 2	$D'$	LOD	$r^2$
rs699	rs4762	0.497	1.71	0.014
rs699	rs5051	0.854*	134.66	0.721*
rs699	rs5049	0.536	1.44	0.009
rs699	rs5046	0.349	0.6	0.004
rs4762	rs5051	0.673	3.49	0.026
rs4762	rs5049	0.978	0.88	0.008
rs4762	rs5046	0.387	0.19	0.001
rs5051	rs5049	0.434	1.02	0.006
rs5051	rs5046	0.332	0.53	0.004
rs5049	rs5046	0.826*	57.82	0.637*

Los valores de  $D' < 0.8$ ,  $LOD > 2$  y  $r^2 > 0.8$ , son medidas de alto DL y selección de un TagSNP, en cada caso son los valores de la relación entre los SNPs.

Los colores concuerdan con el Mapa de DL; rs699-rs5051 y rs5049-rs5046 en color rojo brillante, presentan alto DL, y rs4762-rs5051 en color rosa, con bajo DL y la relación de los otros SNPs en color blanco DL baja o nula.

### 9.2.2. Cuantificación de Ang II y Ang (1-7)

Para corroborar el efecto biológico del haplotipo H1: **CCAGC** del gen del AGT, que se presentó con mayor frecuencia en el grupo de individuos normotensos. Se determinaron los niveles de dos péptidos principales y bioactivos del SRA el Ang II y Ang (1-7), siendo estos procesados y formados apartir del angiotensinogeno (**Figura 1**). Estas mediciones se realizaron en el plasma de 169 Individuos, separadas en 2 grupos; un grupo que incluyó las muestras de 33 individuos con el haplotipo de protección (H1:**CCAGC**) y otro grupo que incluyó las muestras de 136 individuos conformados por las otras combinaciones de los diferentes haplotipos (H2:**TCGGC**, H3:**CTAGC**, H4:**CCAAT**, H5:**CCGGC**, H6:**TCAGC**, H7:**TTGGC**). El haplotipo protector H1 presentó una diferencia en los niveles bajos de Ang II e incremento de Ang (1-7) ( $\beta=-31.75$ , IC:(-49.8, -13.7),  $R^2=0.4508$ ;  $p=0.002$ ) al ser comparados con los haplotipos H2 al H7 (**Figura 7**).



**Figura 6. Niveles de Ang (1-7) y Ang II en los haplotipos del gen AGT.**

Haplotipo de protección (H1:CCAGC), y haplotipos de riesgo H2 (TCGGC, CTAGC, CCAAT, CCGGC, TCAGC, TTGGC). Correlación entre Ang (1-7) y Ang II, en el haplotipo protector H1:CCAGC.

### 9.3. SNPs del gen *REN*

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los dos sitios polimórficos estudiados del gen *REN* el rs5705 y rs5707, en individuos hipertensos y normotensos presentaron una distribución similar, sin diferencias estadísticamente significativas al compararse entre los grupos. En cuanto al equilibrio de Hardy-Weinberg, estos no presentaron desviaciones (Tabla 6).

**Tabla 6. Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos del gen *REN*.**

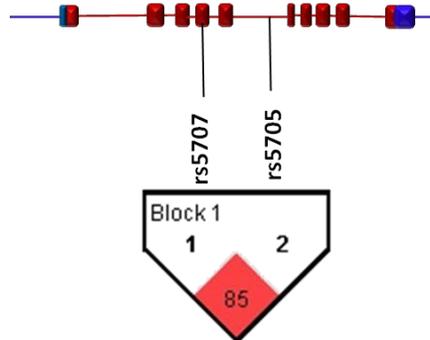
Polimorfismos	Alelos Genótipos	Hipertensos	Normotensos	<i>p</i>
		(n=239) n(%)	(n=371) n(%)	
rs5705	A	401 (84)	611 (91)	0.491
	C	77 (16)	131 (18)	
	AA	168 (70)	253 (68)	
	AC	65 (27)	105 (28)	
	CC	6 (3)	13 (4)	
rs5707	G	77 (16)	131 (18)	0.491
	T	401 (84)	611 (82)	
	GG	20 (8)	26 (7)	
	GT	90 (38)	128 (35)	
	TT	129 (54)	217 (58)	

Prueba de  $X^2$  para diferencia de la distribución entre grupos.

Frecuencias alélicas y genotípicas expresadas como número y porcentaje [n(%)].  
 $p < 0.05$ ; NS, no significativo.

### 9.3.1. DL del gen *REN*

El análisis de DL de los alelos de los polimorfismos del gen *REN* rs5707 y rs5705 (**Figura 8**) mostraron una distribución en un bloque compuesto por tres haplotipos [H1: **TA**, H2: **GA**, H3: **TC**]. La distribución de estos tres haplotipos fue similar en el grupo de hipertensos y normotensos, sin diferencias estadísticamente significativas, con una distribución de los haplotipos en las poblaciones estudiadas de 58.2% H1:TA, 24.8% H2: GA y H3: TC 16.4%. (**Tabla 7**). Las medidas de DL fueron de  $D' = 0.853$ ,  $LOD = 7.9$  y  $r^2 = 0.051$ .



**Figura 7. Mapa de DL del gen *REN*.**

Se muestra el valor del coeficiente de DL en la casilla (valores de  $D'$  cercanos 100).  
 Con un alto DL (logaritmo de odds [LOD] score  $\geq 2$  y  $D' = 1$ ).

**Tabla 7. Frecuencia de haplotipos del gen *REN*.**

Haplotipos	Secuencia	Frecuencias	
		Hipertensos	Normotensos
H1	T-A	<b>0.572</b>	<b>0.588*</b>
H2	G-C	0.267	0.235*
H3	T-C	0.156	0.169*

Haploview v4.2.

El orden de los polimorfismos corresponde a la posición que ocupan en el cromosoma (rs5707 y rs5705). \* No se encontraron diferencias significativas al comparar las frecuencias haplotípicas.

#### **9.4. SNPs del gen *ECA***

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los sitios polimórficos rs4291, rs4335, rs4344, rs4353, rs4362 y rs4363 presentaron diferencias significativas al comparar los grupos de individuos hipertensos y normotensos. La distribución de la frecuencia para alelos y genotipos de los sitios rs4318, rs4646994 y rs4343 fue similar entre ambos grupos de estudio (**Tabla 8**). No se observó ninguna desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg para ocho de los sitios polimórficos rs4291, rs4318, rs4335, rs4646994, rs4344, rs4353, rs4362 y rs4363. Sin embargo, el rs4343 no se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg en el grupo de individuos normotensos. Para los sitios polimórficos en los que se encontraron diferencias significativas se construyeron los modelos de regresión logística para el tipo de herencia (**Tabla 9**).

**Tabla 8. Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos del gen *ECA***

SNPs	Alelos Genótipos	Hipertensos	Normotensos	P
		(n=239) n (%)	(n=371) n (%)	
rs4291	A/T	310(64.9)/168(35.1)	525(70.8)/217(29.2)	<b>0.030</b>
	AA/AT/ TT	96(40.17)/118(49.37)/25(10.46)	188(50.67)/149(40.16)/34(9.16)	<b>0.038</b>
rs4318	A/G	471(98.5)/7(1.5)	730(98.4)/12(1.6)	NS
	AA/AG/GG	232(97.07)/7(2.93)0	359(96.77)/12(3.23)/0	NS
rs4335	A/G	254(53.1)/224(46.9)	463(62.4)/279(37.6)	<b>0.001</b>
	AA/AG/GG	62(25.91)/130(54.39)/47(19.67)	147(39.62)/169(45.55)/55(14.82)	<b>0.002</b>
rs4646994	I/D	107(0.224)/371(0.776)	183(0.247)/559(0.753)	NS
	DD/ ID/ II	138(57.74)/95(39.75)/6(2.51)	206(55.53)/147(39.62)/18(4.85)	NS
rs4343	A/G	279(58.4)/199(41.6)	468(63.1)/274(36.9)	NS
	AA/AG/ GG	81(33.89)/117(48.95)/41(17.5)	136(36.66)/196(52.83)/39(10.51)	NS
rs4344	A/G	244(51) /234(49)	433(58.4)/309(41.6)	<b>0.012</b>
	AA/AG/ GG	60(25.10)/124(51.88)/55(23.10)	131(35.31)/171(46.09)/69(18.60)	<b>0.027</b>
rs4353	A/G	227(47.5)/251(52.5)	305(41.1)/437(58.9)	<b>0.028</b>
	AA/AG/ GG	49(20.50)/129(53.97)/61(25.52)	67(18.06)/171(46.09)/133(35.85)	<b>0.028</b>
rs4362	C/T	257(53.8)/221(46.2)	442(59.6)/300(40.4)	<b>0.045</b>
	CC/CT/ TT	62(25.94)/133(55.67)/44(18.41)	136(36.66)/170(45.82)/65(17.52)	<b>0.018</b>
rs4363	A/G	255(53.3)/223(46.7)	448(60.4)/294(39.6)	<b>0.015</b>
	AA/CG/GG	63(26.36)/129(53.97)/47(19.67)	139(37.47)/170(45.82)/62(16.71)	<b>0.017</b>

Prueba de  $X^2$  para diferencia de la distribución entre grupos.

Frecuencias alélicas y genotípicas expresadas como número y porcentaje [n(%)].

$p < 0.05$ ; NS, no significativo.

**Tabla 9. Asociación entre los polimorfismos del gen *ECA* y modelos de herencia.**

Modelos de herencia	Genotipos <sup>a</sup>	RM	IC 95%	p*
<b>rs4291</b>				
Co-dominante	AA	1		
	AT	1.551	1.099-2.189	0.013
	TT	1.440	0.813- 2.551	0.211
Dominante	AT+TT vs AA	1.530	1.101- 2.127	0.011
Recesivo	TT vs AT+AA	0.864	0.501-1.488	0.597
Heterocigoto	AT vs AA+TT	0.688	0.496- 0.955	0.025
<b>rs4335</b>				
Co-dominante	AA	1		
	AG	1.824	1.254-2.652	0.002
	GG	2.026	1.242-3.306	0.005
<b>Dominante</b>	<b>AG+GG vs AA</b>	<b>1.873</b>	<b>1.312-2.675</b>	<b>0.001*</b>
Recesivo	GG vs AG+AA	0.711	0.463-1.091	0.119
Heterocigoto	AG vs AA+GG	0.701	0.506-0.972	0.033
<b>rs4344</b>				
Co-dominante	AA	1		
	AG	1.583	1.079-2.322	0.019
	GG	1.740	1.090-2.778	0.020
<b>Dominante</b>	<b>AG+GG vs AA</b>	<b>1.873</b>	<b>1.311-2.675</b>	<b>0.001*</b>
Recesivo	GG vs AG+AA	0.711	0.463-1.091	0.119
Heterocigoto	AG vs AA+GG	0.701	0.506-0.972	0.033
<b>rs4353</b>				
Co-dominante	GG	1		
	AG	1.031	0.389-1.010	0.055
	AA	0.627	0.668-1.591	0.888
<b>Dominante</b>	<b>AG+AA vs GG</b>	<b>1.630</b>	<b>1.137-2.337</b>	<b>0.008*</b>
Recesivo	AA vs AG+GG	0.854	0.566-1.288	0.453
Heterocigoto	AG vs AA+GG	0.729	0.526-1.010	0.058
<b>rs4362</b>				
Co-dominante	CC	1		
	CT	1.716	1.178- 2.500	0.005
	TT	1.485	0.913-2.415	0.111
<b>Dominante</b>	<b>CT+TT vs CC</b>	<b>1.652</b>	<b>1.155-2.364</b>	<b>0.006*</b>
Recesivo	TT vs CT+CC	0.941	0.617-1.437	0.779
Heterocigoto	CT vs CC+TT	0.674	0.486- 0.935	0.018
<b>rs4363</b>				
Co-dominante	AA	1		
	AG	1.674	1.150- 2.437	0.007
	GG	1.672	1.033-2.708	0.036
<b>Dominante</b>	<b>AG+GG vs AA</b>	<b>1.674</b>	<b>1.172- 2.390</b>	<b>0.005*</b>
Recesivo	GG vs AG+AA	0.820	0.539-1.247	0.353
Heterocigoto	AG vs AA+GG	0.721	0.520- 0.999	0.050

\*Regresión logística p<0.05.

RM; razón de momios, IC; interval de confianza.

<sup>a</sup>Modelos de herencia agrupando los genotipos para un polimorfismo en un locus bialélico.

\*Selección del mejor modelo de herencia de acuerdo a los criterios de AIC.

Al construir los modelos de herencia de cada uno de los sitios polimórficos, el mejor modelo de efectos principales con cada uno de los sitios polimórficos fue el modelo de herencia dominante, estos se ajustaron por edad, genero, IMC, triglicéridos, consumo de alcohol y el habito de fumar (**Tabla 10**).

**Tabla 10. Evaluación de riesgos de los polimorfismos del gen ECA usando el modelo de herencia dominante.**

Modelo Dominante Genotipos		RM	IC 95%	p*
<b>rs4291</b>	AT+TT vs AA	1.530	1.101- 2.127	<b>0.011</b>
<b>rs4335</b>	AG+GG vs AA	1.873	1.312-2.675	<b>0.001</b>
<b>rs4344</b>	AG+GG vs AA	1.873	1.311-2.675	<b>0.001</b>
<b>rs4353</b>	AG+AAvs GG	1.630	1.137-2.337	<b>0.008</b>
<b>rs4362</b>	CT+TT vs CC	1.652	1.155-2.364	<b>0.006</b>
<b>rs4363</b>	AG+GGvs AA	1.674	1.172- 2.390	<b>0.005</b>

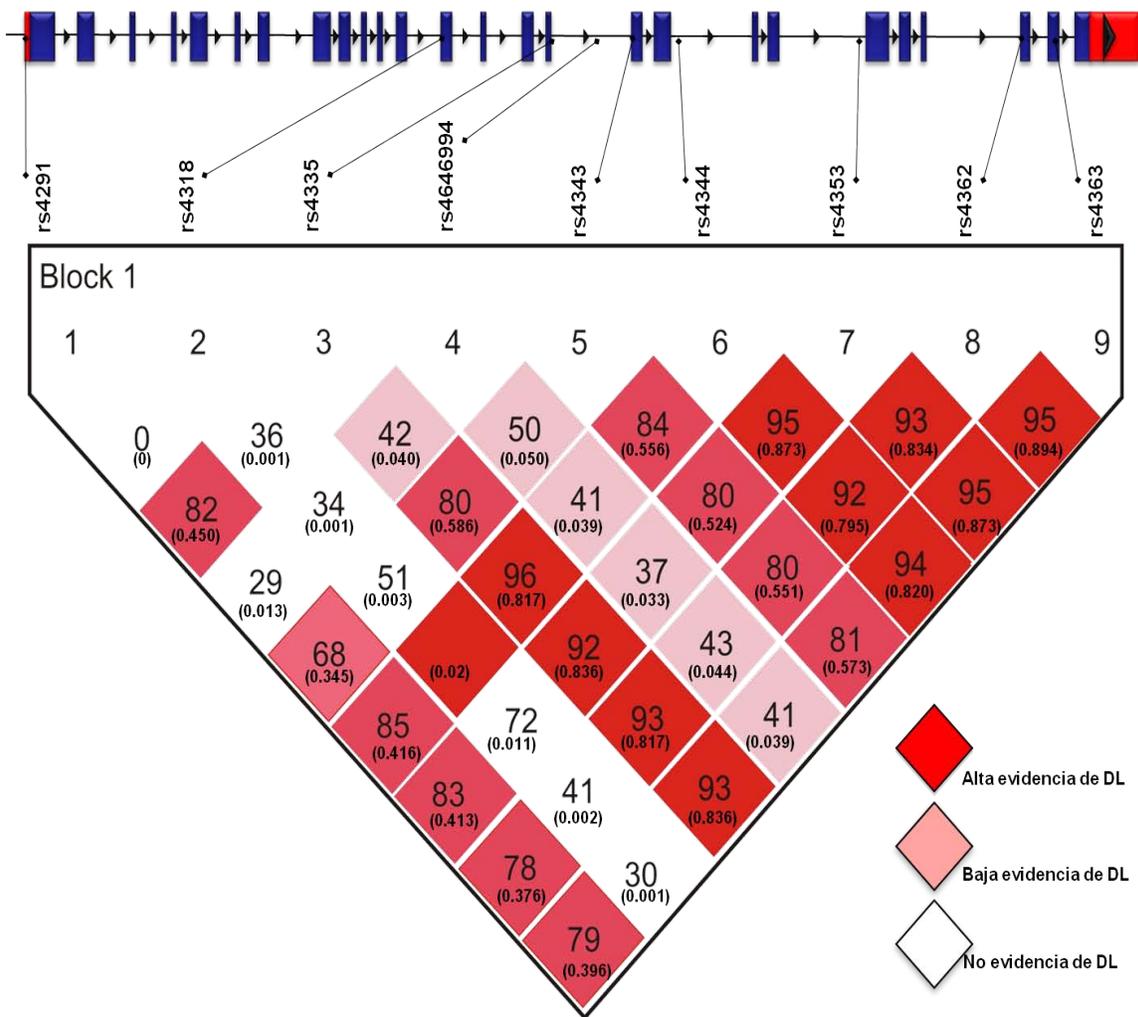
\*Regresión logística múltiple

Estimación ajustada por sexo, edad IMC. Triglicéridos, consumo de alcohol y habito de fumar.

RM; razón de momios, IC; intervalo de confianza, \*p<0.05.

#### 9.4.1. DL del gen ECA

El análisis de DL se realizó incluyendo a los nueve sitios polimórficos estudiados en este gen (**Figura 9**). Posteriormente se seleccionaron e incluyeron únicamente los sitios polimórficos que presentaron mejores medidas de DL, específicamente un alto DL (valores de  $D' > 0.9$  y de  $r^2 > 0.8$ ) (**Tabla 11, Figura 9**). Bajo este criterio solo cinco sitios polimórficos fueron incluidos rs4335, rs4344, rs4353, rs4362, rs4363 (**Tabla 12; Figura 10**).



**Figura 8. Mapa de DL del gen *ECA*.**

Se muestra el valor del coeficiente de DL en cada casilla  $D'$  (valores de  $D'$  cercanos a 100). La combinación de colores dentro del mapa de haplotipos representa las relaciones de DL. Los cuadros color rojo brillante representan una alta evidencia de DL (logaritmo de odds [LOD] score  $\geq 2$  y  $D' = 1$ ), los cuadros color rojo claro o rosa indican una baja evidencia de DL (LOD score  $\geq 2$  y  $D' < 1$ ), y los cuadros color blanco significan que no existe DL y segregación independiente (LOD score  $\leq 2$  y  $D' < 1$ ). Los números entre paréntesis representan los valores de  $r^2$  ( $\geq 0.8$ ; TagSNP).

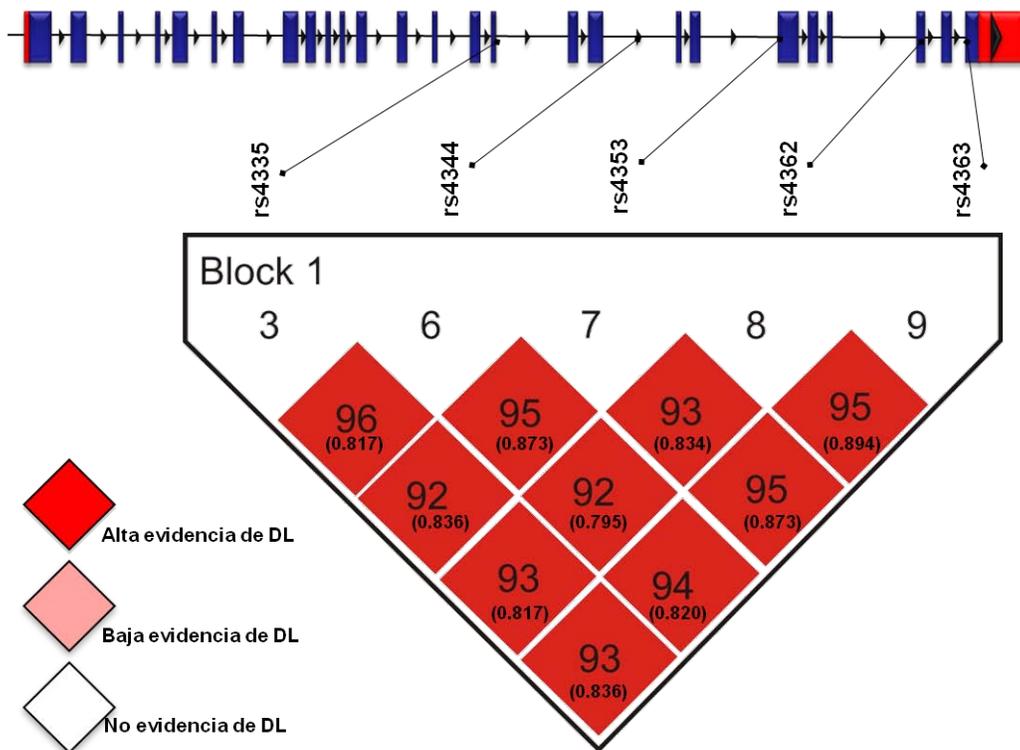
**Tabla 11. Medidas de DL entre polimorfismos del gen ECA; valores D', LOD y r<sup>2</sup>**

SNP1	SNP2	D'	LOD	r <sup>2</sup>
rs4291	rs4318	0.00	0	0
rs4291	rs4335	0.83	78.61	0.45
rs4291	rs4646994	0.30	1.66	0.01
rs4291	rs4343	0.69	53.22	0.34
rs4291	rs4344	0.85	75.13	0.42
rs4291	rs4353	0.83	72.86	0.41
rs4291	rs4362	0.78	63.01	0.38
rs4291	rs4363	0.79	68.4	0.40
rs4318	rs4335	0.36	0.26	0.00
rs4318	rs4646994	0.34	0.05	0.00
rs4318	rs4343	0.51	0.47	0.00
rs4318	rs4344	1.00	3.75	0.02
rs4318	rs4353	0.72	1.86	0.01
rs4318	rs4362	0.41	0.27	0.00
rs4318	rs4363	0.30	0.12	0.00
rs4335	rs4646994	0.43	5.06	0.04
rs4335	rs4343	0.80	104.81	0.60
rs4335	rs4344	0.97*	185.4	0.82
rs4335	rs4353	0.93*	168.74	0.78*
rs4335	rs4362	0.93*	180.07	0.82*
rs4335	rs4363	0.94*	187.4	0.84*
rs4646994	rs4343	0.50	6.44	0.05
rs4646994	rs4344	0.42	5.59	0.04
rs4646994	rs4353	0.37	4.12	0.03
rs4646994	rs4362	0.43	5.35	0.04
rs4646994	rs4363	0.41	5.06	0.04
rs4343	rs4344	0.84	101.09	0.56
rs4343	rs4353	0.80	91.78	0.52
rs4343	rs4362	0.80	96.99	0.55
rs4343	rs4363	0.82	103.24	0.57
rs4344	rs4353	0.95*	205.43	0.87*
rs4344	rs4362	0.92*	174.73	0.80*
rs4344	rs4363	0.95*	185.64	0.82*
rs4353	rs4362	0.93*	187.22	0.83*
rs4353	rs4363	0.96*	204.26	0.87*
rs4362	rs4363	0.95*	210.99	0.89*

Análisis de DL (medidas de DL: D', LOD y r<sup>2</sup>; en cada caso son la relación entre los SNPs).

Los colores concuerdan con el Mapa de DL; rojo brillante; alto DL, rosa; bajo DL y en color blanco DL no existe.

\*La selección de los mejores marcadores fue con base a los criterios de D>0.9 y r<sup>2</sup>>0.8.



**Figura 9. Mapa de DL del gen *ECA***

Se muestra el valor del coeficiente de DL en cada casilla  $D'$  (valores de  $D'$  cercanos a 100). De color rojo brillante únicamente los SNP's con alto DL (logaritmo de odds [LOD] score  $\geq 2$  y  $D' = 1$ ). Los números entre paréntesis representan los valores de  $r^2$  ( $\geq 0.8$ ; TagSNP).

**Tabla 12. Medidas de DL entre polimorfismos del gen *ECA*; valores  $D'$ , LOD y  $r^2$**

SNP1	SNP2	$D'$	LOD	$r^2$
rs4335	rs4344	0.97*	185.4	0.82*
rs4335	rs4353	0.93*	168.74	0.78*
rs4335	rs4362	0.93*	180.07	0.82*
rs4335	rs4363	0.94*	187.4	0.84*
rs4344	rs4353	0.95*	205.43	0.87*
rs4344	rs4362	0.92*	174.73	0.80*
rs4344	rs4363	0.95*	185.64	0.82*
rs4353	rs4362	0.93*	187.22	0.83*
rs4353	rs4363	0.96*	204.26	0.87*
rs4362	rs4363	0.95*	210.99	0.89*

Los valores de  $D'$ , LOD y  $r^2$ , en cada caso son la relación entre los SNPs.

Color rojo brillante, alto DL

\*La selección de la relación de los marcadores fue con base a los criterios de  $D' > 0.9$  y  $r^2 > 0.8$ .

El análisis de estos marcadores dio como resultado un bloque compuesto por cuatro haplotipos [H1:AAGCA, H2:GGATG, H3:AGATG y H4:AGACA]. El haplotipo H1:AAGCA mostró mayor distribución en el grupo de normotensos, al compararse con el grupo de hipertensos, lo que sugiere un menor riesgo para HAS (OR = 0.77, IC del 95 %=0.66-0.97;  $p= 0.023$ ), mientras que el haplotipo H2:GGATG, se encontró en una mayor distribución en el grupo de hipertensos (OR=1.41 , IC del 95 %=1.11-1.80;  $p= 0.004$ ), sugiriendo una asociación al riesgo de HAS (**Tabla 13**). Se analizó el riesgo de la distribución de los alelos que conformaban cada haplotipo en función de los modelos de herencia (**Tabla 14**).

**Tabla 13. Frecuencia de haplotipos del gen ECA**

Haplotipos	Secuencia	Frecuencias		RM (95% CI)	$p^*$
		Hipertensos	Normotensos		
H1	A-A-G-C-A	0.489	0.556	0.77 (0.66-0.97)	0.023
H2	G-G-A-T-G	0.426	0.346	1.41 (1.11-1.80)	0.0040
H3	A-G-A-T-G	0.011	0.022		
H4	A-G-A-C-A	0.013	0.014		

Haploview v4.2, StatCal EpiInfo v7.0.\* $p<0.05$ .

RM: Razón de momios; IC: intervalo de confianza.

El orden de los polimorfismos en el haplotipos es de acuerdo a la posición en el cromosoma (rs4335, rs4344, rs4353, rs4362, rs4363).

**Tabla 14. Análisis de haplotipo de riesgo en función del modelo de herencia en individuos hipertensos y normotensos.**

Modelo de herencia	Haplotipos Distribución por genotipos	RM	IC 95%	$p^*$
Co-dominante	H1/H1:AA-AA-GG-CC-AA	1.0		
	H1/H2:AG-AG-AG-CT-AG	1.849	1.228-2.784	0.003
	H2/H2:GG-GG-AA-TT-GG	1.726	1.012-2.943	0.045
Dominante	H1/H1:AA-AA-GG-CC-AA vs H1/H2:AG-AG-AG-CT-AG+ H2/H2:GG-GG-AA-TT-GG	1.817	1.231- 2.681	0.003
Recesivo	H2/H2:GG-GG-AA-TT-GG vs H1/H2:AG-AG-AG-CT-AG + H1/H1:AA-AA-GG-CC-AA	0.842	0.528-1.343	0.472
Heterocigoto	H1/H2:AG-AG-AG-CT-AG vs H1/H1:AA-AA-GG-CC-AA + H2/H2:GG-GG-AA-TT-GG	0.655	0.458- 0.937	0.021

Regresión logística, \* $p < 0.05$

RM; razón de momios, IC; interval de confianza

Se observó el riesgo que proporciona la combinación de alelos que conforman los haplotipos en aquellos que tenían un haplotipo de riesgo H1/H2 (RM=2.009, IC 95%=1.294-3.118; p=0.002) o dos H2/H2 haplotipos (RM=2.090, IC 95%=1.180-3.704; p=0.011), al compararse con el haplotipo protector H1/H1, ajustados por variables asociadas, resultando estos en un riesgo similar para HAS (**Tabla 15**).

**Tabla 15. Evaluación de riesgo de los haplotipos del gen ECA por distribución de genotipos usando el modelo de herencia co-dominante.**

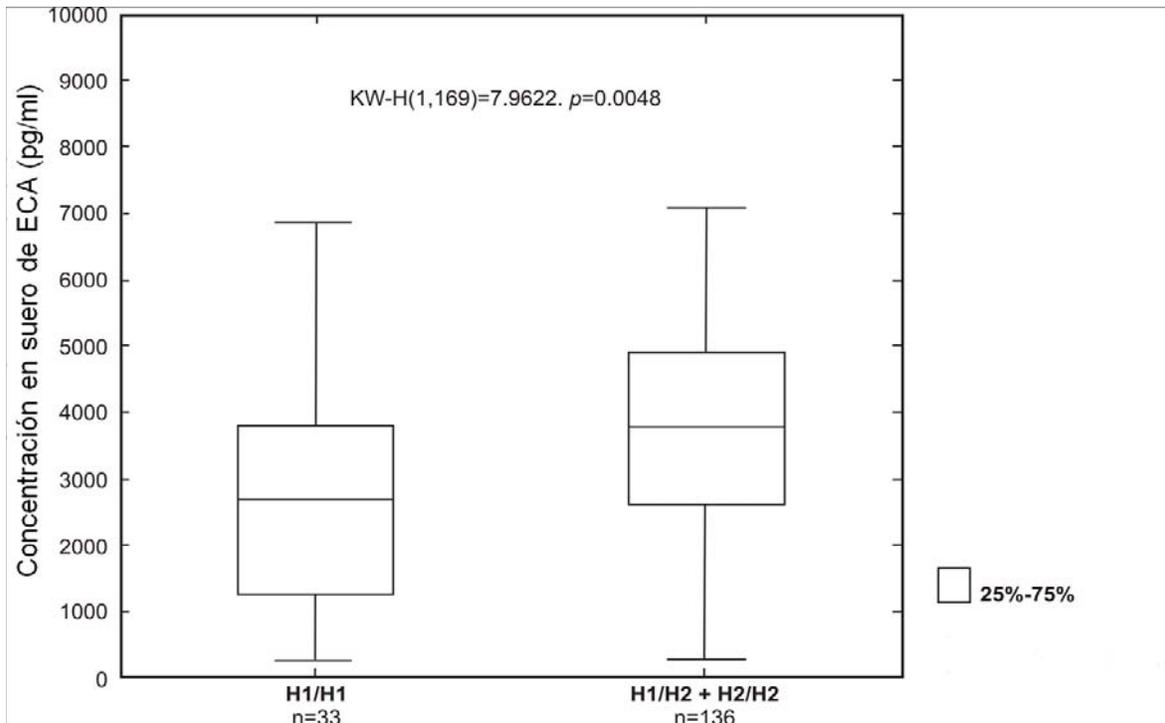
Modelo de herencia	Haplotipos Distribución por genotipos	RM	IC95%	p*
Co-dominante	H1/H1:AA-AA-GG-CC-AA	1.0		
	H1/H2:AG-AG-AG-CT-AG	2.009	1.294-3.118	<b>0.002</b>
	H2/H2:GG-GG-AA-TT-GG	2.090	1.180-3.704	<b>0.011</b>

\*Regresión logística múltiple p<0.05.

Estimación ajustada por sexo, edad, IMC triglicéridos, hábito de fumar y consumo de alcohol. RM; razón de momios, IC; intervalos de confianza

#### 9.4.2. Cuantificación de la ECA

Para corroborar el efecto biológico de la contribución de los sitios polimórficos, se analizó la relación entre los haplotipos de riesgo y protección, y la relación de estos con los niveles séricos de la ECA en individuos hipertensos sin tratamiento farmacológico. De la muestra de los 239 hipertensos, se encontraron con tratamiento farmacológico a 154 (64.4%) individuos, de los cuales el uso de fármacos fue; iECA (n=37 individuos), betabloqueadores (n=38), antagonistas de ATR1 (n=33), diuréticos (n=28) y antagonistas de canales de calcio (n=18) y 85 individuos se detectaron con niveles de PA $\geq$ 140/90mmHg en el momento del estudio. Se descartaron aquellos individuos que estuvieran bajo tratamiento con inhibidores de la ECA, por lo que la muestra en la que se realizó la cuantificación de la ECA fue en el suero de 169 individuos con la siguiente distribución; 33 individuos homocigotos para el haplotipo asociado a protección H1(H1/H1) y 136 individuos con al menos un haplotipo de riesgo H2(H1/H2 y H2/H2) (Figura Se encontró una elevación significativa de las concentraciones séricas de la ECA en los individuos con un haplotipo o ambos haplotipos de riesgo H2/H2 y H1/H2 (mediana 3,802.37 pg/ml) en comparación con los individuos con el haplotipo protector H1/H1 (mediana 2,692.73 pg/ml) (p=0.0048) (**Tabla 16**).



**Figura 10. Concentraciones de ECA en el suero de individuos con HAS por haplotipo.**

Los límites de las cajas representan la media del 50% de los valores de datos; la extensión de las líneas abarca el rango intercuartil. La línea central dentro de cada caja representa la mediana.

H1/H1=homocigotos de protección

H1/H2=heterocigotos de protección/riesgo y H2/H2= homocigotos de riesgo.

n; número de individuos por grupo.

**Tabla 16. Evaluación de la concentración de ECA por distribución de haplotipos.**

Haplotipos	N	P25	Mediana (pg/ml)	P75	$p^*$
H1/H1	33	1289.78	2692.73	3806.34	0.0048
H1/H2 + H2/H2	136	2629.52	3802.375	4925.17	

Los cálculos de las concentraciones por grupo de haplotipo se presentan como mediana y percentiles 25 y 75,

\*U de Mann Whitney,  $p < 0.05$

## 9.5. SNPs del gen *ATR1*

Se observó una distribución similar de las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos rs275651, rs275652, rs275653 y rs5183 al comparar a los individuos hipertensos y normotensos. En cuanto al polimorfismo rs5182 la distribución de los genotipos al comparar entre los individuos hipertensos y normotensos fue diferente ( $p = 0.016$ ). Todos los sitios polimórficos estudiados en este gen se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg (**Tabla 17**).

**Tabla 17. Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos del gen ECA.**

Polimorfismos	Alelos Genótipos	Hipertensos	Normotensos	P
		(n=239) n (%)	(n=371) n (%)	
rs275651	A/T	79(10.6) / 663 (89.4)	49(10.3) / 429 (89.7)	NS
	AA/AT/TT	8 (2.2) / 63 (16.9)/ 300 (80.9)	5 (2.1)/ 39(16.3) / 195 (81.6)	
rs275652	G/T	80 (10.7)/ 662 (89.3)	51 (10.7)/ 427 (89.3)	NS
	GG/GT/TT	3 (0.9)/ 74 (19.9)/294 (79.2)	5(2.1)/ 41(17.2)/193 (80.7)	
rs275653	A/G	664 (89.5)/78 (10.5)	433 (90.6)/ 45(9.4)	NS
	AA/AG/GG	296 (79.8)/ 72(19.4)/ 3(0.8)	198 (82.8)/ 37 (15.5)/ 4 (1.7)	
rs5183	A/G	708 (95.4)/ 34 (4.6)	457 (95.6)/ 21(4.4)	NS
	AA/AG/GG	339 (91.4)/30 (8.1)/2(0.5)	219 (91.6)/19(8)/ 1(0.4)	
rs5182	C/T	325(44)/417 (56)	245 (51) / 233 (49)	NS
	CC/CT/TT	<b>69 (18.6)</b> /187 (50.4)/115 (31)	<b>68 (28.5)</b> /109 (45.6)/62 (25.9)	

Prueba de  $\chi^2$  para diferencia de la distribución entre grupos.

Frecuencias alélicas y genotípicas expresadas como número y porcentaje [n(%)].

$p < 0.05$ ; NS, no significativo.

En el análisis de los modelos de herencia para el polimorfismo rs5182, con mejor ajuste fue el modelo de herencia co-dominante, de esto que los individuos con el genotipo **CC** tenían un riesgo mayor e independiente de desarrollar hipertensión (CT; RM=1.08, IC del 95%=0.733-1.595 y CC; RM=1.83, IC del 95%=1.159-2.883, TT; RM=1.0) ( $p = 0.009$ ) (**Tabla 18**).

**Tabla 18. Análisis del polimorfismo rs5182 en función de los modelos de herencia.**

Modelo de herencia	Genotipos	RM	CI 95%	P
Co-dominante	TT	1.0		<b>0.009</b>
	CT	1.08	0.733-1.595	
	CC	1.83	<b>1.159-2.883</b>	
Dominante	CT+TT vs CC	1.282	0.892-1.844	
Recesivo	TT vs CT+CC	0.780	0.542-1.121	
Heterocigoto	CT vs CC+TT	1.212	0.875-1.680	

\*Regresión logística  $p < 0.05$ .

RM; razón de momios, IC; intervalos de confianza

Con respecto al análisis del modelo de efectos principales se observó que las interacciones entre el modelo de herencia co-dominante y las variables con contribución significativa y mejor ajuste, fueron edad, índice de masa corporal, triglicéridos y consumo de alcohol. Se identificó el hábito de fumar como un factor protector significativo en este modelo (**Tabla 18**).

**Tabla 19. Evaluación de riesgo del polimorfismo rs5182 utilizando el modelo de herencia co-dominante.**

Modelo de herencia	RM	CI 95%	P
rs5182 (Co-dominante)			
Genotipos:			
TT	1.0		
CT	1.082	0.713-1.643	
CC	1.854	1.139-3.016	0.013
Edad (años)	1.025	1.260-2.600	0.020
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	1.136	1.088-1.186	0.000
Triglicéridos	1.003	1.001-1.005	0.003
Consumo de alcohol(Si/No)	1.807	1.260-2.600	0.001
Habito de Fumar (Si/No)	0.463	0.321-0.668	0.000

\*Regresión logística múltiple  $p < 0.005$ .

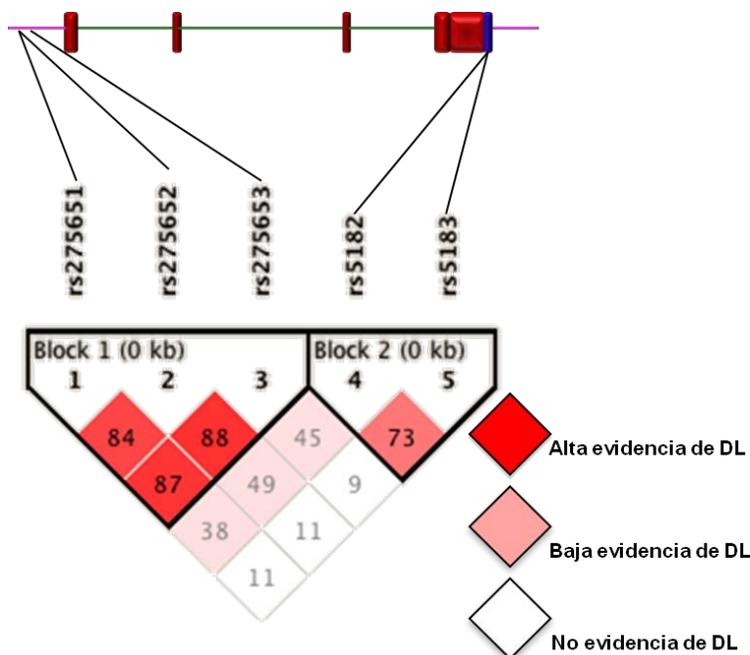
Estimación ajustada por edad, IMC triglicéridos, consume de alcohol y habito de fumar.

RM; razón de momios, IC; intervalos de confianza

### 9.5.1. DL del gen *ATR1*

El análisis del DL de los polimorfismos rs275651, rs275652, rs275653, rs5183 y rs5182 del gen *ATR1* (**Figura 12**), muestra que la combinación de los alelos de estos marcadores forman un bloque compuesto por cinco haplotipos. De estos el haplotipo H1: TTATA ( $p=0.016$ ,  $RM=0.75$ , IC del 95%=0.59 a 0.94) y H2: TTACA presentaron diferencias significativas al comparar los grupos de estudio (**Tabla 20**).

Se observó que la diferencia entre estos haplotipos esta dada principalmente por el marcador rs5182, y el tener el alelo T de protección o C de riesgo para hipertensión, por lo que los polimorfismos fueron distribuidos en dos bloques; el bloque 1 incluye las variantes polimórficas rs275651, rs275652 y rs275653, mientras que el bloque 2 incluye los polimorfismos rs5183 y rs5182 (**Figura 12**). En cuanto a la distribución de las secuencias del bloque 1 fueron similares en los individuos hipertensos y normotensos. Sin embargo, la distribución de las combinaciones del bloque 2 fueron diferentes al compararse entre ambos grupos de estudio, encontrando un aumento de la frecuencia del haplotipo **CA** y disminución de la frecuencia del haplotipo **TA** en los individuos hipertensos en comparación con los normotensos ( $p = 0.015$ ,  $OR = 1.33$ , IC del 95%=1.06 a 1.68 y  $p=0.019$ ,  $OR=0.75$ , IC del 95%:=0.59 a 0.94, respectivamente), corroborando con esto que la diferencia está dada principalmente por los alelos del sitio rs5182, donde el alelo T es más frecuente en el grupo normotenso y el alelo C se encontró con mayor frecuencia en el grupo hipertenso (**Tabla 20**).



**Figura 11. Mapa de DL del gen *ATR1*.**

Se muestra el valor del coeficiente de DL en cada casilla  $D'$  (valores de  $D'$  cercanos a 100). La combinación de colores dentro del mapa de haplotipos representa las relaciones de DL. Los cuadros color rojo brillante representan una alta evidencia de DL (logaritmo de odds [LOD] score  $\geq 2$  y  $D' = 1$ ), los cuadros color rojo claro o rosa indican una baja evidencia de DL (LOD score  $\geq 2$  y  $D' < 1$ ), y los cuadros color blanco significan que no existe DL y segregación independiente (LOD score  $\leq 2$  y  $D' < 1$ ).

**Tabla 20. Frecuencia de haplotipos del gen *ATR1*.**

Haplotipos	Secuencia	Frecuencias		RM (95% CI)	P
		Hipertensos	Normotensos		
Bloque 1 (rs275651, rs275652, rs275653)					
	T-T-A	0.869	0.875	--	NS
	A-G-G	0.076	0.091	--	NS
Bloque 2 (rs5182 y rs5183)					
	T-A	<b>0.483</b>	<b>0.554</b>	<b>0.75(0.59-0.94)</b>	<b>0.019</b>
	C-A	<b>0.472</b>	<b>0.401</b>	<b>1.33(1.06-1.68)</b>	<b>0.015</b>
	C-G	0.038	0.039	--	NS

Haploview v4.2, StatCal, EpiInfo v7.0

RM; razón de momios, IC; intervalos de confianza,  $p < 0.05$ .

El orden de los polimorfismos en el haplotipos es de acuerdo a su posición en el cromosoma.

Los valores de alta evidencia de DL y mayor valor de  $r^2$  se presentaron entre los marcadores rs275651 y rs275652 ( $D'=0.844$ ,  $LOD=88.39$ ,  $r^2=0.712$ ), rs275651 y rs275653 ( $D'=0.879$ ,  $LOD=88.14$ ,  $r^2=0.712$ ). Las combinaciones que contenían el marcador rs5182 que presentó diferencia significativa entre alelos mostraron una leve evidencia de DL y menor valor de  $r^2$ , esto se observó específicamente entre los marcadores rs275651 y rs5182 ( $D'=0.386$ ,  $LOD=2.94$ ,  $r^2=0.02$ ), rs275652 y rs5182 ( $D'=0.491$ ,  $LOD=4.39$ ,  $r^2=0.033$ ), rs275653 y rs5182 ( $D'=0.457$ ,  $LOD=3.82$ ,  $r^2=0.027$ ) y rs5182 con rs5183 ( $D'=0.731$ ,  $LOD=4.86$ ,  $r^2=0.029$ ) (**Tabla 21**).

**Tabla 21. Medidas de DL entre polimorfismos del gen *ATR1*; valores  $D'$ , LOD y  $r^2$**

SNP1	SNP2	$D'$	LOD	$r^2$
rs275651	rs275652	0.844*	88.39	0.712*
rs275651	rs275653	0.879*	88.14	0.721*
rs275651	rs5182	0.386**	2.94	0.02**
rs275651	rs5183	0.11***	0.64	0.005***
rs275652	rs275653	0.889***	90.49	0.736***
rs275652	rs5182	0.491**	4.39	0.033**
rs275652	rs5183	0.11***	0.64	0.005***
rs275653	rs5182	0.457**	3.82	0.027**
rs275653	rs5183	0.093***	0.46	0.004***
rs5182	rs5183	0.731**	4.86	0.029**

Los valores de  $D'$ , LOD y  $r^2$ , en cada caso son la relación entre los SNPs.

\*rojo brillante, alto DL

\*\*rosa, bajo DL

\*\*\*Blanco DL nulo..

## 10. DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo fue el estudio de la variabilidad genética de los polimorfismos del SRA y su relación con HAS. A continuación se discutirán los resultados más relevantes en relación a los objetivos propuestos. Se hará una discusión relativa a los resultados de asociación de los estudios relacionados con presión arterial, de aquellos estudios de asociación poblacional y algunos estudios realizados en modelos animales para corroborar la funcionalidad en las variantes genéticas, para cada uno de los genes analizados.

La HAS es una enfermedad que implica interacciones de factores genéticos y ambientales. Desde el punto de vista genético, se ha prestado especial atención al estudio de los genes implicados en el SRA.

Por lo que en este estudio se analizaron 21 polimorfismos distribuidos en los genes de los principales componentes del SRA, en un grupo de individuos mexicanos con HAS y otro grupo de individuos normotensos, la distribución de estos polimorfismos fue la siguiente: cinco polimorfismos localizados en el gen *AGT*, dos en el gen *REN*, nueve en el gen *ECA* y cinco en el gen *ATR1*, algunos de estos sitios fueron elegidos por estudios previos de GWAS en donde se relacionaron con el desarrollo de HAS o niveles de presión arterial elevados o bien ya han sido reportados en diferentes poblaciones y se asociaron con algún rasgo de presión arterial, y en algunos casos por su funcionalidad a nivel molecular.

En cuanto a los polimorfismos analizados, las frecuencias de los alelos y genotipos están en la población de estudio en equilibrio de Hardy-Weinberg, lo que disminuye la posibilidad de que los resultados obtenidos en el presente trabajo sean el reflejo de la endogamia, posibles errores de tipificación de los grupos, apareamiento no al azar (estratificación poblacional), la presencia de mutaciones y la consecuencia de la migración de la población analizada (Deng HW, *et al.* 2001; Nielsen R. 1998). Los grupos de estudio son representativos de la población y sus descendientes próximos son mestizos-mexicanos (Lisker R, *et al.* 1990), la población, tanto en su conjunto como por lo que respecta entre grupos de hipertensos y normotensos, cuenta con una notable homogeneidad ya que la población no presenta características extrañas.

## 10.1. SNPs del gen ATR1

El conocimiento de los receptores de la Ang II se ha incrementado drásticamente, desde el desarrollo de herramientas moleculares específicas, las cuales han permitido la caracterización de los subtipos de receptores de la Ang, el uso de diferentes antagonistas selectivos han permitido una mejor definición de la función de los receptores en cuanto a su caracterización. Al considerar sus mecanismos de acoplamiento y su expresión regulada recíprocamente, estos receptores pueden equilibrarse entre sí, sobre todo en circunstancias patológicas. En el presente estudio se determinaron cinco polimorfismos del gen ATR1 en los individuos hipertensos y normotensos. Los polimorfismos analizados, están distribuidos tres de ellos en la región 5'UTR (rs275651, rs275652 y rs275653) y dos en la región 3'UTR (rs5182 y rs5183). Estas regiones están involucradas en regular la expresión génica en múltiples niveles, pueden tener efectos en el pre-mRNA. Están implicadas en la formación del extremo 3' del mRNA y la poliadenilación, en el mRNA maduro determinan algunas propiedades como la estabilidad, la degradación, la exportación nuclear, la localización subcelular y la eficiencia de traducción, esto se corrobora con el análisis funcional de las regiones 3'UTR, aunque todo indica que, efectivamente, estos cambios podrían tener consecuencias en la expresión del gen, hay que tener en cuenta que las regiones reguladoras del RNA habitualmente dependen de la combinación de la estructura primaria y secundaria y de la secuencia adyacente a estos elementos. En cuanto las variantes genéticas de los sitios rs5182 y rs5183 se encuentran en la región codificante y están involucradas con la elevación de los niveles plasmáticos de AGT, se han relacionado con las cifras elevadas de PA. Este polimorfismo parece ser responsable de una mayor tasa de transcripción y de las variaciones plasmáticas de la proteína AGT, esto podría deberse a que se encuentra en DL con alguno de estos sitios rs275651, rs275652 y rs275653 del promotor del gen, esto ya se ha demostrado en otros estudios. (Inoue I, *et al.* 1997; Morgan T *et al.* 1997).

La variante A (-6)G se ha asociado con una concentración plasmática de aldosterona elevada (Fardella C, *et al.* 1999). Se han descrito distintas variantes en el promotor de AGT, entre estas, quizá sea especialmente importante el sitio C(-20)A, puesto que se ha demostrado que afecta a la tasa de transcripción *in vitro* (Yanai K, *et al.* 1997) y se ha asociado a HAS (Ishigami T, *et al.* 1997), el polimorfismo C(-18)T, de igual forma se ha asociado a HAS y a una diferente actividad transcripcional (Sato N, *et al.* 1997).

En nuestro estudio, observamos un aumento de la frecuencia del alelo C y genotipo CC del sitio polimórfico rs5182, ubicado en la región 3'UTR, esto en el grupo de individuos hipertensos, lo que sugiere que este polimorfismo tiene un papel importante en la susceptibilidad genética a padecer hipertensión. Este polimorfismo ha sido estudiado en varias enfermedades con resultados contradictorios, en un primer estudio donde se escaneo el exón 5 y la región 3' UTR, se identificaron cinco variantes polimórficas que estuvieron presentes en una mayor frecuencia: +573 (rs5182), 1062, +1166, +1517 y +1878, los autores utilizaron grupos de casos-controles e individuos relacionados para estudios de ligamiento y examinaron la asociación entre los polimorfismos del gen *ATR1* y la hipertensión esencial, de los cinco polimorfismos que se describen, sólo la variante +1166 localiza en la región 3' UTR, se asoció de forma significativa con hipertensión. (Bonnardeaux A, *et al.*, 1994). Esta asociación fue más pronunciada en aquellos individuos con inicio temprano de hipertensión o un grado de hipertensión más severa. Por otro lado, encontraron que el genotipo TT del polimorfismo rs5182 podría ser un factor de protección genética en los pacientes con hipertensión esencial y la regulación de excreción urinaria de albúmina (Chaves FJ, 2001). En un estudio posterior, se localizó un haplotipo que contiene los polimorfismos rs5182 alelo C y rs5183 alelo G, y se asoció con HAS en un grupo de individuos Afroamericanos ( $p < 0.05$ ). En este estudio al realizar las pruebas de DL se observó que el haplotipo "CG" se transmite a través de la descendencia con HAS ( $p = 0.0002$ ). No se encontró asociación en la muestra en población caucásica-americana (Zhu X, *et al.*, 2003).

En nuestro estudio, al realizar el análisis de haplotipos observamos una distribución de los polimorfismos del gen *ATR1* conformada por dos bloques, uno de estos bloques incluye los polimorfismos rs5182 y rs5183 (bloque 2). En este bloque, el haplotipo que encontramos asociado con hipertensión fue "CA"; este haplotipo incluye el mismo alelo C del sitio rs5182 presente en el haplotipo informado con anterioridad, sin embargo, nuestro bloque incluye al alelo A del polimorfismo rs5183 que es diferente al reportado. Esto sugiere una importante participación del polimorfismo rs5182 en la susceptibilidad genética al desarrollo de HAS en población mexicana.

Contrario a nuestro resultado sobre la participación del polimorfismo rs5182 y la asociación del alelo C en la susceptibilidad a desarrollar hipertensión, se ha informado en otros trabajos de una fuerte asociación entre este polimorfismo rs5182 y la disminución de la función renal en un grupo de hipertensos con trasplante renal, donde se encontró que

el alelo T de esta misma variante polimórfica rs5182 estaba asociada con tener un doble o triple riesgo en la disminución de hasta el 50% en la tasa de filtración glomerular en pacientes que fueron recibieron trasplante de riñón. Los autores sugieren que este polimorfismo puede afectar la función del aloinjerto renal a través de varios mecanismos potenciales. El polimorfismo rs5182 está en la región codificante del gen, los mecanismos que estos autores sugieren para poder explicar el fenómeno observado son que el polimorfismo pudiera implicar modificaciones pos-trasplante o que probablemente este polimorfismo podría estar en DL con otra variante que tuviera implicaciones más evidentemente funcionales o bien que se encuentre localizado en las inmediaciones que den lugar a una variación de splicing del ARNm dando como resultado que se vea afectado el sitio de corte o empalme y de esta forma se genere alguna isoforma que permita una respuesta ajustada por la regulación de la abundancia relativa de la isoforma, dando como resultado una alteración en la función del ATR1. La diversa participación del sitio polimórfico rs5182 en la hipertensión y en el deterioro de la función renal es compatible con la complejidad de las interacciones y los mecanismos mediante los cuales el gen *ATR1* podría participar en la función renal y vascular. (Israni AK, *et al.*, 2007)

Además, los estudios de intervención han sugerido que los polimorfismos de *ATR1* pueden predecir la respuesta fisiológica a las maniobras farmacológicas. En otro trabajo se desarrolló un perfil genético para predecir los beneficios del tratamiento con inhibidores de enzima convertidora de angiotensina (IECA) en pacientes con enfermedad arterial coronaria. Este estudio incluyó el análisis de 52 polimorfismos localizados en el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) y la vía de calicreína-bradiquinina. Se encontró que dos polimorfismos localizados específicamente en el gen *ATR1* estaban asociados significativamente con el beneficio del tratamiento. Una de estas variantes polimórficas fue la del sitio rs5182, asociada a hipertensión en nuestro estudio (Brugts JJ, *et al.*, 2010). Otros estudios similares reportaron asociación del polimorfismo con la respuesta al tratamiento con inhibidores de la ECA. (Brugts JJ, *et al.*, 2009; Brugts JJ, *et al.*, 2011)

En cuanto a los estudios clínicos que se han reportados sobre la asociación entre los polimorfismos del SRA y los diferentes fenotipos patológicos han sido muchos y muy diversos (Kabadou IA, *et al.*, 2013; Yadav S, *et al.*, 2013; Sakai T, *et al.*, 2013; Yang SJ, *et al.*, 2013; Jing Q, *et al.*, 2013; Rasyid H, *et al.*, 2012; Dhar S, *et al.*, 2012; Yang W, *et al.*, 2012; Zhang XL, *et al.*, 2012; Zhang Z, *et al.*, 2012)

Un estudio reciente en donde la hipertensión es un factor de riesgo importante para las lesiones de la materia blanca en el cerebro (WMLS), se observó en población caucásica de entre 60-65 años, equilibrio de ligamiento del polimorfismo rs699 del gen AGT y rs5182 del gen *ATR1* con WMLS ( $P = 0.03$ ) y esta asociación se observó con el ajuste por hipertensión ( $p=0.045$ ). (Assareh AA, *et al.*, 2014).

En nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas entre los sitios polimórficos rs275651, rs275652 y rs275653 ubicados en la región 5'UTR, ya que en ambos grupos de estudio la distribución de frecuencias fue similar.

Sobre estos sitios polimórficos, un estudio reciente, en donde se secuenciaron los exones del gen *ATR1*, flanqueando la región 5'-3'-UTR (incluyendo 250 pb río arriba del promotor 5'-UTR) en población caucásica, se observó que dos polimorfismos del promotor del gen *ATR1*, rs422858 y rs275653, se encontraban en alto DL, y se asociaron significativamente con vejez. Se replicó el dato del polimorfismo rs275653 en una cohorte independiente de origen japonés (598 más de cincuenta años y 422 controles más jóvenes) y se confirmó la asociación con el grupo de mayor edad. El análisis asoció el sitio rs275653 a la longevidad, con el modelo recesivo ( $p=0.007$ , odds ratio (OR) 3.57) o el genotipo ( $p=0.015$ ). La significación se mantuvo después de corregir los factores de confusión. Los sujetos homocigotos para el alelo menor del rs275653 tenían menos células polimorfonucleares de sangre periférica (AT1R-positivo). Por otra parte, rs275653/GG se asoció a disminuir la presión arterial sistólica en personas mayores de cincuenta años, con lo que *ATR1* podría ser un posible candidato entre los genes de la longevidad (Benigni A, *et al.*, 2013)

## 10.2. SNPs del gen ECA

La ECA es una metalopeptidasa de zinc ubicua que desempeña una función importante en la regulación de la presión sanguínea y la homeostasis cardiovascular al influir directamente en la síntesis de angiotensina II, así como en la degradación de bradicidina. Sin embargo, la ECA posee una amplia especificidad de sustrato y es capaz de degradar varios péptidos. La ECA es una ectoenzima unida a membranas que se encuentra en muchos tejidos, como son pulmón, vasos sanguíneos, corazón, cerebro, riñón y suprarrenales. La ECA también puede participar en funciones de inmunidad, reproducción

y procesamiento de neuropeptidos. La ECA tiene gran importancia como principal blanco farmacológico, ya que su inhibición reduce la presión sanguínea elevada e impulsa la regresión de la hipertrofia vascular cardíaca. Varios estudios clínicos han reportado una asociación entre los polimorfismos de la ECA y fenotipos patológicos (). En el presente estudio, se genotipificaron nueve sitios polimórficos del gen ECA en un grupo de individuos son HAS y normotensos, estos se encuentran distribuidos en regiones codificantes y no codificantes cubriendo un segmento de 21kb. De estas variantes polimórficas identificamos a seis de los nueve sitios (rs4291, rs4335, rs4344, rs4353, rs4362 y rs4363) asociados con hipertensión en nuestro grupo de pacientes. Estas asociaciones fueron independientes de otros factores de riesgo asociados a hipertensión. El polimorfismo rs4343 no se asoció con hipertensión debido a que este polimorfismo no estaba en equilibrio de Hardy-Weinberg en el grupo de individuos normotensos. De los polimorfismos estudiados, sólo el sitio rs4291 se ha estudiado previamente en pacientes con hipertensión, en donde en otros trabajos se informó que el alelo T del polimorfismo rs4291 está asociado con un aumento de la presión arterial (Zhu X, *et al.*, 2003), esto coincide con el hallazgo encontrado en nuestro estudio en los grupos de individuos hipertensos y normotensos de la población mexicana.

Por otro lado, las herramientas bioinformáticas que utilizamos nos ayudaron a predecir la función de estas variantes, encontrando que los sitios polimórficos rs4335, rs4353 y rs4363 tienen un potencial efecto funcional ya que se encuentra involucradas en el sitio de unión para factores de transcripción AML-1, GATA-1 y SRp40. La presencia de alelos específicos en estos polimorfismos podría resultar en la pérdida o reducción de la unión al ADN de estos factores de transcripción con consecuencias importantes en el control de la expresión genética de la enzima.

Con el análisis de los polimorfismos de este gen podemos recalcar la importancia de no solo analizar el efecto individual de los distintos polimorfismos funcionales del gen, sino que en este caso el efecto combinado en los haplotipos y bloques de DL en que se encuentran sus alelos. Con el fin de seleccionar TagSNPs, esto nos permitió reducir el número de SNPs analizados manteniendo la capacidad para detectar variantes asociadas y un TagSNP nos proporciona una cobertura más completa de la región de interés. Por lo que al realizar el análisis de DL, cinco de los nueve polimorfismos estudiados (rs4335, rs4344, rs4353, rs4362, rs4363) estaban en alto DL, y cumplieron con el criterio de las mejores medidas de DL ( $D' > 0.9$  y  $r^2 > 0.8$ ), el bloque estaba conformado por cuatro

diferentes haplotipos, uno de estos haplotipos se asoció con riesgo (**H2:GGATG**) y otro con protección (**H1:AAGCA**) para hipertensión. En un estudio realizado previamente en pacientes hipertensos de población afroamericana y europeo-americana, en donde estudiaron 10 polimorfismos, de los cuales en nuestro estudio incluimos a 8 variantes polimórficas de estas 10 variantes reportadas por este grupo. En este estudio detectaron un haplotipo con tres variantes polimórficas que asociaron a hipertensión, sin embargo, el haplotipo asociado fue diferente en los pacientes afro-americanos y europeo-americanos. En el grupo de afroamericanos, el haplotipo asociado incluye los polimorfismos rs4343, rs4353 y rs4363 (haplotipo AAA), mientras que en los europeo-americanos el haplotipo incluyó los polimorfismos rs4335, rs4343 y rs4344 (haplotipo GGG) (Zhu X, *et al.*, 2003). Este dato es importante ya que el haplotipo de riesgo que nosotros detectamos en nuestro estudio en población mestiza mexicana (H2: **GGATG**) incluye al polimorfismo rs4335 alelo G y el polimorfismo rs4344 alelo G, que concuerdan con los alelos detectados en la población europea-americana y el alelo A del polimorfismo rs4353 un alelo detectado en individuos afroamericanos. Nuestros resultados muestran por primera vez la distribución de las frecuencias de estos polimorfismos y haplotipos de estos sitios polimórficos en población mexicana y con esto establecemos importantes diferencias entre las poblaciones mexicanas y lo ya reportado en poblaciones caucásicas, asiáticas y africanas. Lo que podría ser explicado por la amplia mezcla genética que nos caracteriza. Con este hallazgo de asociación genética, decidimos medir los niveles séricos de la ECA, con el fin de buscar si algún haplotipo detectado se asocia con esta característica con los individuos hipertensos. El resultado obtenido fue una elevación significativa de los valores en los niveles de la ECA en suero en los individuos hipertensos que tenían los haplotipos de riesgo en comparación con los individuos que tenían el haplotipo protector. Este resultado apoya el papel de los haplotipos detectados en la susceptibilidad genética a desarrollar HAS.

En un estudio se observó que dos polimorfismos representan variaciones en la concentración de ECA, la posición A2350G con el efecto más significativo, representando el 19% de la variación total en los niveles de ECA, mientras rs4291 ubicado en la región 5' UTR del gen representó el 6% de la variación en los niveles. Los efectos de estos dos polimorfismos fueron descritos bajo un modelo de herencia aditivo. Tras ajustar por el efecto del sitio A2350G, el polimorfismo I/D ya no se asocia con la ECA, lo que indica que es en DL con el sitio A2350G donde se ve la diferencia en los niveles de ECA y con esto es poco probable que sea un polimorfismo funcional. En este estudio previo, se estableció

que el alelo A del polimorfismo rs4291 es el que se asocia con incremento en los niveles de ECA (Zhu X, *et al.* 2001). En nuestro estudio, la posición polimórfica rs4291, no se asoció con hipertensión o con los niveles de la ECA en la población mestiza mexicana. Existen diversos estudios en donde la asociación de otros polimorfismos de la ECA, incluyendo este sitio, con la relación de los niveles de la enzima es contradictorio con asociaciones positivas y negativas. (Villard E, *et al.* 1996; Keavney B, *et al.* 1998; Baghai TC, *et al.* 2006; Chung CM, *et al.* 2010)

En un estudio previo, se analizó la relación entre los niveles de la ECA y siete polimorfismos del gen de la ECA, ubicados en pequeñas regiones que comprendían una amplia región del gen. Ninguno de los polimorfismos estudiados en este trabajo fue incluido en nuestro estudio, pero este grupo también detectó un haplotipo asociado con los niveles de ECA. Lo que nos sugiere que es importante extender estos estudios a otros grupos étnicos y analizar la asociación de DL con otras regiones, con el fin de observar cuales son los polimorfismos que pueden ser marcadores específicos y así establecer otras regiones reguladoras del gen de la ECA (Zhu X, *et al.* 2000).

### **10.3. SNP del gen *REN***

El riñón es el encargado de liberar renina a los tejidos extrarenales, incluidos el corazón y los vasos sanguíneos, para formar tanto Ang I como Ang II en esos tejidos. Además la prorenina puede ser absorbida de la circulación y volverse enzimáticamente activa, mediante la conversión proteolítica a renina o cambio estructural no proteolítico. La presencia de prorenina en el plasma, en concentraciones relativamente altas, continúa siendo enigmática y aun queda por aclarar como es su activación. Investigaciones clínicas sobre los inhibidores de la renina se han detenido, pero estos fármacos son atractivos como herramienta de investigación y también potencialmente como agentes terapéuticos. Las variantes del gen de la renina no han mostrado influir en el fenotipo, pero no se han estudiado fenotipos intermedios. En cuanto a las variantes polimórficas rs5705 y rs5707 del gen de la renina (*REN*) en nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas al comparar las frecuencias alélicas y genotípicas en el grupo de hipertensos y normotensos, la distribución de las frecuencias fueron similares en ambos grupos. Los estudios relacionados con estas variantes son controversiales, ya que al igual que los

nuestros, existen muchos estudios de ligamiento y estudios de casos-controles en donde no se ha encontrado asociación de estos polimorfismos con los niveles de presión arterial o el riesgo de hipertensión (Morris BJ, Griffiths LR. 1988; Jeunemaitre X, *et al.* 1992; Hasimu B, *et al.* 2003; Naftilan AJ, *et al.* 1989). Las principales evidencias de asociación de estos dos sitios polimórficos son en mujeres post-menopáusicas con riesgo a tener niveles elevados de presión arterial o hipertensión (Mansego ML, *et al.* 2008). Esta relación podría deberse a la interacción entre el impacto del fondo genético, con el género y edad, y en este caso principalmente a la caída de los estrógenos lo cual podría explicar la asociación de mujeres de estos rangos de edad, ya que el efecto global de los estrógenos es el que limita la producción de la angiotensina II y protege contra el desarrollo de la hipertensión (Harrison-Bernard LM, *et al.* 2003; Armando I, *et al.* 2002). Al no existir esta cantidad de hormonas se podría plantear la hipótesis de que el alelo G del polimorfismo rs5707 podría estar asociada con un aumento en la síntesis de renina. Esto puede contribuir con el aumento de los valores de PA como consecuencia de la generación de angiotensina II a través de la cascada de SRA o después de la unión y la absorción a través de receptores específicos en muchos sistemas celulares (Nguyen G. 2006). Al tratar de normalizar los niveles de estrógeno, el impacto en términos de elevación de la PA sería mínima, pero se hace evidente cuando la actividad del estrógeno cae. Estos polimorfismos también se han estudiado ampliamente en trabajos relacionados con mujeres embarazadas y el riesgo a desarrollar preclampsia (Vefring HK1, *et al.* 2010), el mecanismo sugerido es por una mayor producción de renina en la placenta que entra en circulación materna interactuando con la AGT y provocando un aumento de los síntomas de la preclampsia (Takimoto E, *et al.* 1996).

Al analizar el total de nuestro grupo de estudio y al hacer la estratificación por género no se encuentran diferencias significativas, pero coincidimos en los datos de la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas que reportan la mayoría de trabajos donde se han estudiado estas variantes polimórficas, en donde para el caso del polimorfismo rs5707 el alelo T, es el alelo ancestral y de mayor frecuencia y el alelo G es el alelo menos frecuente. Y para el caso del rs5705 el alelo A es el ancestral y el alelo C es el de menor frecuencia en la población mexicana.

## 10.4. SNPs del gen AGT

Estudios fisiológicos sugieren que, aunque los cambios en el angiotensinógeno pueden afectar la velocidad de formación de angiotensina, las concentraciones de angiotensinógeno varían relativamente poco, y esas variaciones son compensadas por cambios en la secreción de renina para mantener una producción constante de angiotensina. Aunque los datos de estudios en animales transgénicos y manipulación génica sugieren que las concentraciones de angiotensinógeno pudieran desempeñar una función en el control de la presión sanguínea, esos hallazgos son engañosos debido a su regulación no fisiológica de la renina. Los estudios genéticos han proporcionado la mayoría de las pruebas de la existencia de una función del angiotensinógeno en la HAS. Sin embargo, los hallazgos de esos estudios han sido mezclados, tanto dentro de poblaciones como entre ellas. La cuestión clave que permanece sin respuesta, es cómo una mutación en el gen del angiotensinógeno que causa un incremento pequeño (15%) en las concentraciones del angiotensinógeno circulante puede causar hipertensión. Aunque hay algún efecto no identificado de tal mutación, el efecto sobre la presión sanguínea es difícil de reconciliar con estudios en animales y en humanos que muestran que las concentraciones del angiotensinógeno pueden cambiar cuatro o cinco veces sin ningún efecto sobre la presión sanguínea, mientras la secreción de renina continúe siendo regulada normalmente. En este estudio se analizaron cinco variantes polimórficas del gen del angiotensinógeno (*AGT*), tres polimorfismos se localizan en la región promotora: rs5046, rs5049 y rs5051 y dos polimorfismos más en el exón 2 las variantes rs4762 y rs699. En cuanto a la distribución alélica y genotípica de estos sitios polimórficos no se encontraron diferencias significativas al compararse con los grupos de estudio. La asociación de los sitios polimórficos rs4762 (T174M) y rs699 (M235T), han sido confirmados en algunos estudios (Mondry A, *et al.*2005; Ji LD, *et al.*2010). Otros estudios sugieren que los polimorfismos rs5046 (C-532T), rs5049 (G-217A) y rs5051 (A-6G) de la región promotora están implicados en la regulación de la transcripción y expresión del gen *AGT*. Se han realizado diversos estudios en donde los SNPs de la región promotora son de gran relevancia en la expresión del gen del angiotensinógeno ya que estos juegan un papel relevante en los controles de los niveles de angiotensinógeno. Se ha examinado el potencial de impacto de este polimorfismo en el sitio de inicio de la transcripción, donde se ha visto reducida la actividad basal del promotor angiotensinógeno de dos maneras, en la

modulación de la expresión de angiotensinógeno, y la segunda en donde funcionalmente ocurre en un contexto de interacciones complejas, donde participan diversos factores nucleares (Ishigami T, *et al.* 1997). El sitio polimórfico rs5051 (A-6G) a sido reportado con la posible asociación con de niveles de plasma de AGT y presión arterial (Hunt SC, *et al.* 1998), aunque estos resultados son contradictorios en otras poblaciones (Velez DR, *et al.* 2006). El análisis de estos haplotipos provee más información sobre el efecto de la interacción genética, especialmente cuando los alelos tienen un efecto sinérgico.

Diversos estudios indican que la frecuencia de los haplotipos que contienen el sitio polimórfico rs5051 (A-6G) en sujetos con hipertensión esencial y presión arterial normal, muestran diferencias significativas (Qi Y, *et al.* 2008; Xi B, *et al.* 2012).

En estudios en familias México-americanas se reporta DL con hipertensión esencial pero no hay asociación entre los niveles de plasma de AGT y el polimorfismo M235T. En mestizos mexicanos, la variante T174M está asociada fuertemente con el rasgo. No se encontró asociación entre M235T y T-6C (Atwood LD, *et al.* 1997). Estudios similares se han realizado en población Japonesa, donde se muestra variabilidad en el control genético de los niveles en plasma de AGT, pero no se observa asociación con M235T solo se relacionó a la posición 174M como un marcador para la hipertensión esencial sensible a sal, esto es de suma importancia en esta población ya que en los últimos años los estudios epidemiológicos han documentado un incremento de la prevalencia de hipertensión y una tasa de mortalidad elevada debida principalmente a daño cerebro vascular, y como factor primordial se encuentra el aumento en la ingesta de sal (Sato N, *et al.* 2000).

En una población de origen Africano, se han encontrado diferencias en los rasgos relacionados con la hipertensión como son la PA y la media de los niveles de AGT (Gu CC, *et al.* 2005). En diferentes estudios se ha observado una baja frecuencia de los alelos 4072T/235M en población Africana (0.10) y Afroamericana (0.20) este ha sido un argumento para sustentar las asociaciones negativas en los estudios derivados de estas poblaciones (Corvol P, *et al.* 1997). Sin embargo, en nuestra población la distribución del alelo 4072T (235M) es de 0.30, por lo que este argumento no es valido para nuestra población. Nuestro dato coincide con un trabajo de población hipertensa y normotensa reportado previamente población mexicana (Balam-Ortiz E, *et al.* 2011), en este trabajo reportan en cuanto al sitio polimórfico rs4762/3389T (174M) una asociación con la disminución de los niveles plasmáticos de AGT. Esta distribución de frecuencias en la

posición polimórfica coincide con la encontrada por nosotros. La mayor frecuencia del alelo C3889 (T174) en la mayoría de las poblaciones estudiadas y su homocigosis en la mayoría de los homínidos sugiere que el alelo C3889 es el alelo ancestral y es el que se encuentra asociado con niveles elevados de AGT en plasma. En otros trabajos en población caucásica se ha observado que el alelo C4072 (T235) está asociado con los niveles de AGT, también este alelo es el ancestral. (Inoue I, *et al.* 1997; Jeunemaitre X, *et al.* 1997). La treonina en la posición 174 es altamente conservada en todos los homínidos, lo que sugiere una selección positiva en la evolución en los primeros antepasados humanos. La correlación de los alelos ancestrales con los niveles plasmáticos de AGT puede proporcionar ventajas selectivas en el mejoramiento de la retención de sal y regulación de la presión en el grupo de humanos con una dieta a base de vegetales. En estudios en poblaciones caucásicas, la variante C3889T (T174M) se ha asociado con los niveles de AGT en plasma y niveles de presión arterial sistólica y diastólica (Sethi AA, *et al.* 2001). En unas poblaciones de niños caucásicos y afroamericanos esta variante se ha correlacionado con PAD y el IMC (Bloem LJ, *et al.* 1997). En población mexicana no existe correlación alguna entre niveles de AGT y algún rasgo relacionado con hipertensión, solo se ha encontrado una correlación muy débil de los niveles de AGT con la frecuencia media. (Balam, *et al.* 2011)

En cuanto al análisis de haplotipos, en nuestro trabajo se identificó un haplotipo de protección H1: CCAAGT, este haplotipo contiene al alelo 3389C (T174) en la segunda posición, el cual se ha correlacionado con los niveles más altos de AGT en plasma. (Balam *et al.*, 2011), aunque la importancia biológica en cuanto los niveles de PA, en los individuos que tienen este haplotipo y los niveles superiores de AGT en plasma no se han establecido de forma clara, sin embargo, el AGT en plasma es el único sustrato conocido de la renina, esta es la enzima que limita la velocidad del SRA. Por lo que el equilibrio entre los niveles de AGT y renina pueden controlar la actividad del SRA, esto ya ha sido corroborado en modelos de animales, en donde se ha documentado la participación de AGT en la actividad del SRA y el desarrollo de HAS (Corvol P, Jeunemaitre X. 1997; Kobori H, *et al.* 2007; Lavoie JL, *et al.* 2004). Estudios de manipulación genética en donde se conduce a la sobre expresión de AGT, han demostrado que esto es causante de HAS (Chakravarti, 1999; Frayling, 2007; Frayling *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2005)(Smithies O, *et al.* 1994; Kim HS, *et al.* 1995). Por lo tanto, los niveles de AGT en plasma juegan un papel importante en el desarrollo de HAS y progresión de enfermedad renal, por efecto de una mayor producción de Ang II (Kobori *et al.*, 2007). En nuestro trabajo se encontró una

asociación consistente del haplotipo H1: CCAGT. Este es uno de los primeros informes que demuestran la asociación de un haplotipo, con los niveles de los péptidos con función biológica más importantes del SRA, ya que se analizaron los niveles de Ang II y Ang (1-7), para observar el efecto biológico en los individuos que tenían el haplotipo de protección (H1: CCAGT) el cual contenía la variación C3389T (T174M), que es uno de los polimorfismos con una asociación más consistente en rasgos relacionados con HAS y niveles de AGT en plasma. Encontramos que los individuos con el haplotipo H1, tienen niveles más bajos de Ang II, y un aumento de los niveles de Ang (1-7), lo que podría mediar el control de las cifras de PA.

Nuestro análisis de modelos *in silico* utilizando los software PolyPhen y SIFT sugiere que C3389T (T174M), el cambio de un aminoácido no polar (metionina) a un aminoácido polar (treonina), siendo probablemente dañino o no tolerado, lo que podría resultar en el funcionamiento anormal de AGT. Aunque esta podría ser una explicación del hallazgo encontrado, esta variante genética podría estar en DL con algún marcador que podría ser la causante del efecto encontrado.

Con esta información y con el análisis de algunos estudios previos se ha sugerido que el componente genético juega un papel importante en el desarrollo de la HAS, resaltando la participación de los polimorfismos de los genes que codifican para las proteínas involucradas en el SRA y la regulación de la presión sanguínea.

En la población mexicana no existen estudios suficientes sobre la relación de los polimorfismos de los genes del SRA en la susceptibilidad al desarrollo de HAS, y las observaciones realizadas en otras poblaciones no son aplicables a la nuestra, debido a que la estructura genética del mestizo mexicano es particular, la población mestiza mexicana esta compuesta por una población recientemente mezclada de alto porcentaje de genes amerindios principalmente, genes europeos y en menor grado de genes de ascendencia africana, para los años 90's se sabía que el genoma del mexicano se conformaba por 56% de genes amerindios, 40% de genes caucásicos y 4% de genes negroides (Lisker *et al.*, 1990). Recientemente en estudios realizados con marcadores de ancestría indicó que la estructura del genoma de los mexicanos se compone de 69% de genes amerindios, 26% de genes caucásicos y 5% de genes negroides (Juárez-Cedillo *et al.*, 2008), haciendo de este grupo un útil recurso para el análisis de las bases genéticas de enfermedades complejas como la HAS. Por la estructura del genoma del mexicano es necesario estudios específicos en nuestra población para establecer una posible

asociación entre dichos polimorfismos y como es el caso de estudio el desarrollo de la HAS. Ya que las asociaciones encontradas pueden ser debido a lo particular de la estructura genómica de esta población y sus distintas interacciones, especialmente con los factores ambientales. Un estudio reciente mostró una disminución en la diversidad de los patrones de DL, y la diversidad de los haplotipos a largo plazo es reducida en la población mestiza mexicana, una característica que puede atribuirse a la contribución de la mezcla amerindia (Silva-Zolezzi *et al.*, 2009).

Con lo que queda claro que los estudios de asociación deben ser interpretados en el contexto de cada estructura genética de la población de estudio y grupos étnicos y dentro de los patrones de variación de las regiones genómicas específicas, esto será muy útil para determinar la razón para las asociaciones que se han informado entre los genes del SRA y la presión arterial.

## 11. CONCLUSIONES

En los últimos años, la biología molecular se ha convertido en una herramienta básica en el desarrollo de métodos de detección, diagnóstico, pronóstico y tratamiento de las enfermedades multifactoriales, como es el caso de la Hipertensión Arterial Sistémica (HAS). Es indispensable conocer y reportar las variaciones genéticas específicas, así como su distribución en nuestra población. Debido precisamente a la variabilidad genética que existe entre los diversos grupos étnicos de nuestro país, esto se convierte en un factor a considerar en este tipo de estudios de asociación, es por ello, que no se deben de extrapolar los resultados obtenidos de otras poblaciones de diferente origen étnico. En países como el nuestro donde se tiene una población mayoritariamente mestiza, uno de los desafíos es contar con información adecuada de su composición genética. Los resultados arrojados por este estudio ofrecen en particular información adicional en cuanto a las investigaciones sobre la distribución, frecuencia y relación de los genes del Sistema Renina Angiotensina (SRA) y la HAS.

El presente trabajo de investigación, es uno de los primeros estudios de asociación realizado con un número considerable de polimorfismos bialélicos de genes del SRA en un grupo de individuos con HAS en población mestiza-mexicana.

El objetivo general para este estudio fue identificar si alguno de los alelos de los genes del angiotensinógeno (*AGT*), la renina (*REN*), la enzima convertidora de angiotensina (*ECA*) y el receptor tipo 1 de angiotensina II (*ATR1*), del SRA participan en la regulación de la presión sanguínea y puedan ser seleccionados como potenciales marcadores de susceptibilidad y/o resistencia para el desarrollo de la HAS en la población mestiza mexicana.

Esto se logró corroborar a través de la metodología planteada, la cual considero la selección de 21 polimorfismos distribuidos en los principales componentes del SRA; los cuales se estudiaron a través de una muestra representativa que consideró de forma individual la frecuencia de cada uno de los polimorfismos incluidos para este estudio. La muestra estaba compuesta por 610 personas adultas; de las cuales 239 son hipertensas ( $PA \geq 140/90$ ), y 371 normotensas ( $PA \leq 120/90$ ).

De las muestras de cada individuo se extrajo el ADN, a partir de esto, se determinaron los polimorfismos por la técnica de PCR en tiempo real, utilizando ensayos Taqman.

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos se obtuvieron por conteo directo y en cada grupo se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg usando la prueba estadística de chi-cuadrada. A través, de diferentes análisis estadísticos se obtuvo la asociación y estimación del riesgo de los polimorfismos e HAS, así como, la identificación de otras variables que ayudaron a explicar el desarrollo de HAS (edad, sexo, IMC, triglicéridos, consumo de alcohol, hábito de fumar y antecedentes familiares de HAS). Para detectar y seleccionar si alguno de estos polimorfismos podrían ser utilizados como marcadores de riesgo para este padecimiento se analizaron los haplotipos.

Para corroborar el efecto biológico de los polimorfismos detectados como de riesgo para HAS sobre el impacto en las moléculas del SRA, se realizó en el caso de la ECA, la cuantificación de su concentración en el suero de los individuos por medio de la técnica de ELISA.

Posteriormente, se decidió cuantificar dos de los péptidos bioactivos importantes en el SRA, la Ang II y la Ang 1-7, y correlacionarlos con los resultados genéticos del gen del agiotensinógeno. Las cuantificaciones se realizaron en el plasma de 169 Individuos, separadas en 2 grupos de acuerdo a los haplotipos detectados como de riesgo (H1/H2+H2/H2) y por otro lado, los de protección (H1/H1). Uno incluyó las muestras de 136 individuos con el haplotipo de riesgo, mientras que el segundo grupo incluyó las muestras de 33 individuos con el haplotipo de protección, las cuantificaciones se realizaron por la técnica de electroforesis capilar de zona, bajo detección UV por arreglo de diodos a 200 nm.

Producto de todo lo anterior, se generaron los siguientes resultados:

- a) En cuanto a los análisis de las variantes del gen *ECA*, los datos sugieren que los polimorfismos rs4291, rs4335, rs4344, rs4353, rs4362 y rs4363 podrían desempeñar un papel importante en el desarrollo de la HAS en la población mexicana. En este estudio fue posible identificar un haplotipo de riesgo (H2: GGATG) y un haplotipo de protección (H1: AAGCA) para la hipertensión. Los individuos con el haplotipo de riesgo mostraron un aumento de los niveles plasmáticos de la ECA en comparación con los individuos con el haplotipo protector.
- b) En el análisis de las variantes polimórficas del gen *ATR1*, se sugiere que el polimorfismo +573 C/T (rs5182) podría estar involucrado en el riesgo de desarrollar hipertensión en individuos mexicanos. A través del trabajo fue posible identificar un haplotipo de riesgo "CA" que contempla a las variantes polimórficas rs5182 y rs5183 en

el desarrollo de hipertensión. En ambos grupos de estudio la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de las posiciones A-777T, A-680T, A-119-G y A44221G del gen *ATR1* fueron similares.

c) En cuanto al gen del *AGT*, se genotipificaron cinco SNPs, sin que se observaran diferencias entre los grupos de estudio. Sin embargo, en el análisis de DL, se detectó un haplotipo relevante de protección (H1/H1:CCAGC), el cual está asociado a una mayor concentración de péptidos Ang (1-7) y disminución de Ang II, con esto se sugiere que dicho haplotipo puede ser considerado como protector para HAS en el caso de la población mexicana.

d) Las variantes polimórficas rs5705 y rs5707 del gen de la *REN*, presentaron una distribución de frecuencias similares en ambos grupos de estudio.

Algunos de los resultados como ya se ha discutido anteriormente, concuerdan con lo ya reportado en la literatura, sin embargo, cabe señalar que este trabajo presenta hallazgos específicos para nuestra población. En este sentido, es importante fomentar a futuro la investigación multidisciplinaria para mejorar el diagnóstico y detección de los diferentes estadios o grados de HAS, con el fin de tener menos heterogeneidad en la muestra y así poder localizar TagSNPs o marcadores genéticos específicos para HAS, de esta forma la réplica experimental de datos podrá ser homogénea. Con el propósito de contribuir a la construcción de un tamiz genético para detección de factores de riesgo involucrados en el desarrollo o susceptibilidad a padecer HAS, no sólo en la población de riesgo, sino también considerarlo a temprana edad para poder encaminar acciones de prevención.

Los resultados del presente trabajo son la base para estudios de investigación traslacional<sup>1</sup> donde se deberá evaluar el poder diagnóstico con las variantes polimórficas de los genes que codifican para las proteínas del SRA y para la detección de HAS. Por lo tanto, este estudio contribuye al entendimiento de los mecanismos genéticos involucrados en la HAS, así como, a resolver la problemática de establecer un diagnóstico oportuno para este padecimiento y a su vez procurar prevenir de algún modo complicaciones asociadas a la enfermedad vascular inducida por HAS.

Finalmente, se espera que este trabajo contribuya a dilucidar muchos de los cuestionamientos generados a partir de los artículos publicados, ya que los resultados de esta investigación eventualmente ayudarán a mejorar el cuidado de la salud de los

---

<sup>1</sup> Es la necesidad de estrechar lazos entre la investigación básica y la clínica con el propósito de desarrollar nuevos tratamientos.

mexicanos, conociendo cuáles son las variantes genéticas del SRA más frecuentes o comunes que pudieran estar asociadas a HAS.

A través de este planteamiento se pueden establecer nuevas estrategias para predecir y prevenir algunos de los problemas de salud prioritarios en el país. Sin embargo, se requieren estudios adicionales con un tamaño de muestra mayor para confirmar estos hallazgos.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Alderman MH, Madhavan S, Ooi WL, Cohen H, Sealey JE, Laragh JH. Association of the renin-sodium profile with the risk of myocardial infarction in patients with hypertension. *N Engl J Med.* 1991 Apr 18;324(16):1098-104.
- Baca V, Orozco L. (2008). La genética de las enfermedades complejas en: La frontera: Genética Molecular de la enfermedad. Ed. Instituto Politécnico Nacional. 2004;pp:77–91.
- Bader M and Ganten D. Update on tissue renin–angiotensin systems. *J Mol Med.*; 86:615–621.
- Barquera S, Campos-Nonato I, Hernández-Barrera L, Villalpando S, Rodríguez-Gilabert C, Durazo-Arvizu R, *et al.* (2006). Hypertension in Mexican adults: results from the National Health and Nutrition Survey. *Salud Publica Mex* 2010;52 suppl 1:S63-S71.
- Boomsma, D., Busjahn, A., and Peltonen, L. (2002). Classical twin studies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 3, 872–882.
- Bougnères, P. (2003). Genetics of common obesity and type 2 diabetes: please forget diseases and study pathogenic traits. *Diabetes Metab.* 29, 197–199.
- Brook RD, Julius S. (2000). Autonomic imbalance, hypertension, and cardiovascular risk. *Am J Hypertens*; 13: 112–122.
- Campbell, H., and Manolio, T. (2007). Commentary: rare alleles, modest genetic effects and the need for collaboration. *Int. J. Epidemiol.* 36, 445–448.
- Carey RM, Siragy HM: Newly recognized components of the renin–angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev* 2003; 24: 261–271.
- Causas de muerte 2008 [base de datos en línea]. Ginebra, Organización Mundial de la Salud  
([http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/cod\\_2008\\_sources\\_methods.pdf](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/cod_2008_sources_methods.pdf)).
- Chae CU, Lee RT, Rifai N, Ridker PM: Blood pressure and inflammation in apparently healthy men. *Hypertension* 2001; 38: 399–403.
- Chai SY, Fernando R, Peck G, *et al.* The angiotensin IV/AT4 receptor. *Cellular and Molecular Life Sciences.*2004;61(21):2728–2737.
- Chakravarti, A. (1999). Population genetics--making sense out of sequence. *Nat. Genet.* 21, 56–60.

- Chappell MC, Gregory Modralt J, Diz DI, Ferrario CM. Novel aspects of the renal renin-angiotensin system: angiotensin-(1-7), ACE2 and blood pressure regulation. *Contributions to Nephrology*. 2004;143:77–89.
- Charkoudian N, Joyner MJ, Johnson CP, Eisenach JH, Dietz NM, Wallin BG. Balance between cardiac output and sympathetic nerve activity in resting humans: role in arterial pressure regulation. *J Physiol*. 2005 Oct 1;568(Pt 1):315-21. Epub 2005 Jul 21.
- Collins, R., Peto, R., MacMahon, S., Hebert, P., Fiebach, N.H., Eberlein, K.A., Godwin, J., Qizilbash, N., Taylor, J.O., and Hennekens, C.H. (1990). Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2, Short-term reductions in blood pressure: overview of randomised drug trials in their epidemiological context. *Lancet Lond. Engl.* 335, 827–838.
- Corvol P1, Jeunemaitre X. *Endocr Rev*. 1997 Oct;18(5):662-77., Zee RY, Lou YK, Griffiths LR, *et al*. Association of a polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene with essential hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;184:9–15.
- Corvol, P., and Jeunemaitre, X. (1997). Molecular genetics of human hypertension: role of angiotensinogen. *Endocr. Rev.* 18, 662–677.
- Crackower MA1, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, Oliveira-dos-Santos AJ, da Costa J, Zhang L, Pei Y, Scholey J, Ferrario CM, Manoukian AS, Chappell MC, Backx PH, Yagil Y, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*. 2002 Jun 20;417(6891):822-8.
- Daly AK. Candidate gene case-control studies. *Pharmacogenomics* 2003;4:127–139.
- Danaei G *et al*. (2011). National, regional, and global trends in systolic blood pressures since 1980: Systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 786 country-years and 5,4 million participants, *Lancet*, 377:568–577.
- Danser AHJ. (Pro)renin receptors: are they biologically relevant *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2009;18(1):74–78.). (Nguyen G, Muller DN. The biology of the (pro)renin receptor. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2010;21(1):18–23.
- Danser AHJ. The increase in renin during renin inhibition: does it result in harmful effects by the (pro)renin receptor. *Hypertension Research*. 2010;33(1):4–10.
- De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger TH. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacological Reviews*. 2000;52(3):415–472.
- De Gasparo M, Rogg H, Brink M, Wang L, Whitebread S, Bullock G, Erne P. Angiotensin II receptor subtypes and cardiac function. *Eur Heart J*. 1994; 15(Supp ID):98 -103.

- De Gasparo M, Whitebread S, Mele M, Motani AS, Whitcombe PJ, Ramjouw HP, Kamber B. Biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; 16 (Suppl 4): S31
- De Gobbi M, Viprakasit V, Hughes JR, *et al.* A regulatory SNP causes a human genetic disease by creating a new transcriptional promoter. *Science* 2006;312:1215–1217.
- Duprez DA. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in vascular remodeling and inflammation: a clinical review. *J Hypertens.* 2006 Jun;24(6):983-91.
- Esler MD, Eikelis N, Lambert E, Straznicky N. Neural mechanisms and management of obesity-related hypertension. *Curr Cardiol Rep.* 2008 Nov;10(6):456-63. Review.
- Ettehad, D., Emdin, C.A., Kiran, A., Anderson, S.G., Callender, T., Emberson, J., Chalmers, J., Rodgers, A., and Rahimi, K. (2016). Blood pressure lowering for prevention of cardiovascular disease and death: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Lond. Engl.* 387, 957–967.
- Folkow B: Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol Rev* 1982; 62: 347–504.
- Ford ES, Li C, Sattar N. Metabolic syndrome and incident diabetes: Current state of the evidence. *Diabetes Care* 2008; 31:1898-904.
- Frayling, T.M. (2007). Genome-wide association studies provide new insights into type 2 diabetes aetiology. *Nat. Rev. Genet.* 8, 657–662.
- Frayling, T.M., Timpson, N.J., Weedon, M.N., Zeggini, E., Freathy, R.M., Lindgren, C.M., Perry, J.R.B., Elliott, K.S., Lango, H., Rayner, N.W., *et al.* (2007). A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 316, 889–894.
- Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin – angiotensin system revisited. *J Intern Med.* 2008; 264(3):224-36.
- Griffin S A, Brown WC, MacPherson F, McGrath JC, Wilson VG, Korsgaard N, *et al*: Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non pressor mechanism. *Hypertens* 1991; 17: 626–635.
- Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci.* 2006 May;7(5):335-46. Review.
- Guyton AC: Kidneys and fluids in pressure regulation. *Hypertension* 1992; 19 (Supl. I): 12-8.
- Harrison DG, Guzik TJ, Goronzy J, Weyand C. Is hypertension an immunologic disease? *Curr Cardiol Rep.* 2008 Nov;10(6):464-9. Review.

- Hunt R, Sauna ZE, Ambudkar SV, *et al.* Silent (Synonymous) SNPs: Should We Care About Them? *Methods Mol Biol* 2009;578:23–39.
- Hunyady L, Catt KJ. Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Molecular Endocrinology*. 2006;20(5):953–970.
- Instituto de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición; ENSANUT, 2012.
- Instituto Nacional de Salud Pública [INSP]. [2012]. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2012. Recuperado el 14 de febrero de 2013, de: <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>).
- Iwai M, Horiuchi M. Devil and angel in the renin-angiotensin system: ACE-angiotensin II-AT1 receptor axis vs. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis. *Hypertension Research*. 2009;32(7):533–536).
- Izawa H, Yamada Y, Okada T, *et al.* Prediction of genetic risk for hypertension. *Hypertension* 2003;41:1035–1040.
- Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, *et al.* Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 1992;71:169–180.
- Jeunemaitre, X., Soubrier, F., Kotelevtsev, Y.V., Lifton, R.P., Williams, C.S., Charru, A., Hunt, S.C., Hopkins, P.N., Williams, R.R., and Lalouel, J.M. (1992). Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 71, 169–180.
- Jones ES, Vinh A, McCarthy CA, Gaspari TA, Widdop RE. AT2 receptors: functional relevance in cardiovascular disease. *Pharmacology and Therapeutics*. 2008;120(3):292–316.
- Juárez-Cedillo, T., Zuñiga, J., Acuña-Alonzo, V., Pérez-Hernández, N., Rodríguez-Pérez, J.M., Barquera, R., Gallardo, G.J., Sánchez-Arenas, R., García-Peña, M.D.C., Granados, J., *et al.* (2008). Genetic admixture and diversity estimations in the Mexican Mestizo population from Mexico City using 15 STR polymorphic markers. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2, e37–e39.
- Kaplan NM. 1998 Treatment of hypertension: rationale, guidelines, and goals. In: Kaplan NM, ed. *Clinical Hypertension*, Ed 7. Baltimore: Williams and Wilkins; 133–158.
- Karet, F.E., and Lifton, R.P. (1997). Mutations contributing to human blood pressure variation. *Recent Prog. Horm. Res.* 52, 263–276; discussion 276–277.
- Khoury, M.J., Little, J., Gwinn, M., and Ioannidis, J.P.A. (2007). On the synthesis and interpretation of consistent but weak gene-disease associations in the era of genome-wide association studies. *Int. J. Epidemiol.* 36, 439–445.

- Knight JC. Functional implications of genetic variation in non-coding DNA for disease susceptibility and gene regulatory. *Clin Sci (Lond)* 2003;104:493–501.
- Knight JC. Regulatory polymorphisms underlying complex disease traits. *J Mol Med* 2005;83:97–109.
- Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev.* 2007; 59(3):251-87.
- Kobori, H., Ozawa, Y., Satou, R., Katsurada, A., Miyata, K., Ohashi, N., Hase, N., Suzaki, Y., Sigmund, C.D., and Navar, L.G. (2007). Kidney-specific enhancement of ANG II stimulates endogenous intrarenal angiotensinogen in gene-targeted mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 293, F938–F945.
- Krushkal J, Ferrell R, Mockrin SC. Genome-wide linkage analysis of systolic blood pressure using highly discordant sibling. *Circulation* 1999;99:1407–1410.
- Kunz R, Kreutz R, Beige J, *et al.* Association between the angiotensinogen 235T-variant and essential hypertension in whites: A systematic review and methodological appraisal. *Hypertension* 1997;30:1331–1337.
- Lalouel JM, Rodrwater A. Genetic susceptibility to essential hypertension: insight from angiotensinogen. *Hypertension* 2007;49:597–603.
- Lavoie JL, Sigmund CD. Minireview: overview of the Renin-Angiotensin System an endocrine and paracrine system. *Endocrinology.* 2003 Jun;144(6):2179-83.
- Ledy D, DeStefano AL, Larson MG, *et al.* Evidence for a gene influencing blood pressure on chromosome 17: genome scan linkage results for longitudinal blood pressure phenotypes in subjects from the Framingham Heart Study. *Hypertension* 2000;36:477–483.
- Levy BI, Schiffrin EL, Mourad JJ, Agostini D, Vicaut E, Safar ME, Struijker-Boudier HA. Impaired tissue perfusion: a pathology common to hypertension, obesity, and diabetes mellitus. *Circulation.* 2008 Aug 26;118(9):968-76.
- Lifton, R.P. (1995). Genetic determinants of human hypertension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 8545–8551.
- Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, *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.* 2012;380(9859):2224-60

- Lisker, R., Ramirez, E., Briceño, R.P., Granados, J., and Babinsky, V. (1990). Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican urban centers. *Hum. Biol.* 62, 791–801.
- Litt M, Luty JA. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 1989;44:397–401.
- Mark AL: The sympathetic nervous system in hypertension: a potential long-term regulator of arterial pressure. *J Hypertens Suppl* 1996; 14: S159–S165.
- Mathew C. Science, medicine, and the future: Postgenomic technologies; hunting the genes for common disorders. *BMJ* 2001;322:1031–1034.
- Mauer Díaz K, Exaire Murad JE, Escalante Acosta BA. Importancia de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en la circulación coronaria. *Archivos de Cardiología de México.* 2001; Volumen 71, núm. 4. 278-285.
- Mayeux R. Mapping the new frontier: complex genetic disorders. *J Clin Invest* 2005;115:1404–1407. Elahi E, Kumm J, Ronaghi M. Global genetic analysis. *J Biochem Mol Biol* 2004;37:11–27.
- McCarthy MI, Abecasis GA, Cardon LR, *et al.* Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet* 2008;9:356–69.
- McClellan, J.M., Susser, E., and King, M.-C. (2007). Schizophrenia: a common disease caused by multiple rare alleles. *Br. J. Psychiatry J. Ment. Sci.* 190, 194–199.
- McIlhenny ML, Shaffer JW, Hines EA Jr. The heritability of blood pressure. An investigation of 200 twin pairs using the cold pressure test. *J Hopkins Med J* 1975;136:57–74.
- MeHAS PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology.* 2007;292(1):C82–C97.
- Meyer-Lindenberg, A., and Weinberger, D.R. (2006). Intermediate phenotypes and genetic mechanisms of psychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 818–827.
- Mondry A, Loh M, Liu P, *et al.* Polymorphisms of the insertion/ deletion ACE and M235T AGT genes and hypertension: surprising new findings and meta-analysis of data. *BMC nephrol* 2005;6:1.
- Mongeau JG. Heredity and blood pressure. *Semin Nephrol* 1989;9:208–216.
- Morton, N.E. (2005). Linkage disequilibrium maps and association mapping. *J. Clin. Invest.* 115, 1425–1430.

- O'Shaughnessy KM. The genetics of essential hypertension. *Br J Clin Pharmacol* 2001;51:5–11.
- Observatorio Mundial de la Salud. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2011 (<http://www.who.int/gho>).
- Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, *et al*. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA* 2006; 295:1549-55.
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2002). Cuantificación de algunos riesgos importantes para la salud. En Informe Sobre la Salud en el Mundo 2002. Reducir los riesgos y promover una vida sana. Recuperado el 14 de febrero de 2013, de: <http://www.who.int/whr/2002/es/>
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2013b). Global Health Observatory. Raised blood pressure. Situation and trends. Recuperado el 15 de febrero de 2013, de: [http://www.who.int/gho/ncd/risk\\_factors/blood\\_pressure\\_prevalence\\_text/en/index.html](http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/blood_pressure_prevalence_text/en/index.html)
- Oro C, Qian H, Thomas WG. Type 1 angiotensin receptor pharmacology: signaling beyond G proteins. *Pharmacology and Therapeutics*. 2007;113(1):210–226.
- Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*. 2008 Feb;31 Suppl 2:S170-80.
- Paul M, Poyanmehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev*. 2006 Jul;86(3):747-803.
- Pauletto P, Rattazzi M. Inflammation and hypertension: the search for a link. *Nephrol Dial Transplant*. 2006. 21:850-853.
- Petrie MC, Padmanabhan N, McDonald JE, Hillier C, Connell JMC, McMurray JJV. Angiotensin converting enzyme (ACE) and non-ACE dependent angiotensin II generation in resistance arteries from patients with heart failure and coronary heart disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2001;37(4):1056–1061.
- Pickering TG. Could hypertension be a consequence of the 24/7 society? The effects of sleep deprivation and shift work. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2006 Nov;8(11):819-22.
- Porrello ER, Delbridge LM, Thomas WG. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor: an enigmatic seven transmembrane receptor. *Frontiers in Bioscience*. 2009;14:958–972.
- Rafiq S, Anand S, Roberts R. Genome-wide association studies of hypertension: Have they been fruitful? *J Cardiovasc Transl Res* 2010;3:189–196.
- Raizada MK, Ferreira AJ. ACE2: a new target for cardiovascular disease therapeutics. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2007;50(2):112–119.

- Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM Jr, Kastelein JJ, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Glynn RJ; JUPITER Study Group. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med*. 2008 Nov 20;359(21):2195-207.
- Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 2000;405:847–856.
- Ronaghi M, Langae T. Single nucleotide polymorphism: discovery, detection and analysis. *Personalized Medicine* 2005;2:111–125.
- Ruppert V, Maisch B. Genetic of human hypertension. *Herz* 2003;28:655–662.
- Schork, N.J. (1997). Genetically complex cardiovascular traits. Origins, problems, and potential solutions. *Hypertension* 29, 145–149.
- Sethi AA, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Angiotensinogen gene polymorphism, plasma angiotensinogen, and risk of hypertension and ischemic heart disease: a meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1269–1275.
- Shi J, Wang Y, Huang W. Development and application of genotyping technologies. *Sci China C Life Sci* 2009;52:17–23.
- Silva-Zolezzi, I., Hidalgo-Miranda, A., Estrada-Gil, J., Fernandez-Lopez, J.C., Uribe-Figueroa, L., Contreras, A., Balam-Ortiz, E., del Bosque-Plata, L., Velazquez-Fernandez, D., Lara, C., *et al.* (2009). Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 8611–8616.
- Thammem F, Voruganti VS, He X, *et al.* Genetic variants in the renin–angiotensin system genes are associated with cardiovascular–renal–related risk factors in Mexican Americans. *Hum Genet* 2008;124:557–559.
- The sixth report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Arch Intern Med*. 1997 Nov 24;157(21):2413-46.
- Thiel B, Weder AB. Genes for essential hypertension: hype, help, or hope? *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2000;2:187–193.
- Thomas GD, Zhang W, Victor RG. (2001). Nitric oxide deficiency as a cause of clinical hypertension: promising new drug targets for refractory hypertension. *JAMA*. Apr 25;285(16):2055-7. Review.
- Thomas WG, Mendelsohn FAO. Angiotensin receptors: form and function and distribution. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2003;35(6):774–779.
- Vanderheyden PML. From angiotensin IV binding site to AT4 receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2009;302(2):159–166.

- Vanhotte PM, Eber B: Endothelium–derived relaxing and contracting factors. *Wiener Klin. Wochenschrift* 1991; 14: 405–411.
- Vargas–Alarcón G. Physiopathogenesis of hypertension. *Arch Cardiol Mex* 2006;76:157–160.
- Vasan RS, Evans JC, Larson MG, Wilson PW, Meigs JB, Rifai N, Benjamin EJ, Levy D. Serum aldosterone and the incidence of hypertension in nonhypertensive persons. *N Engl J Med.* 2004 Jul 1;351(1):33-41.
- Velazquez–Monroy O, Rosas–Peralta M, Lara–Esqueda A, Pastelin–Hernández G, Attie F, Tapia–Conver R; Grupo Encuesta Nacional de Salud 2000: Arterial hypertension in Mexico: results of the National Health Survey 2000. *Arch Cardiol Mex* 2002; 72: 71–84.
- Victor RG, Shafiq MM. Sympathetic neural mechanisms in human hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2008 Jun;10(3):241-7. Review.
- Whitworth, J.A., World Health Organization, International Society of Hypertension Writing Group (2003). 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J. Hypertens.* 21, 1983–1992.
- Wilson DM, Luetscher JA. Plasma prorenin activity and complications in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1990 Oct 18;323(16):1101-6.
- Yang, Q., Khoury, M.J., Friedman, J., Little, J., and Flanders, W.D. (2005). How many genes underlie the occurrence of common complex diseases in the population? *Int. J. Epidemiol.* 34, 1129–1137.



## **13. ANEXOS**

### **13.1. Artículos publicados**

# Single Nucleotide Polymorphisms of the Angiotensin-Converting Enzyme (*ACE*) Gene Are Associated with Essential Hypertension and Increased ACE Enzyme Levels in Mexican Individuals

Nancy Martínez-Rodríguez<sup>1,8</sup>, Carlos Posadas-Romero<sup>2</sup>, Teresa Villarreal-Molina<sup>3</sup>, Maite Vallejo<sup>4</sup>, Leonardo Del-Valle-Mondragón<sup>5</sup>, Julian Ramírez-Bello<sup>6</sup>, Adan Valladares<sup>7</sup>, Miguel Cruz-López<sup>7</sup>, Gilberto Vargas-Alarcón<sup>1\*</sup>

**1** Molecular Biology Department, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (INCICh), Mexico City, Mexico, **2** Endocrinology Department, INCICh, Mexico City, Mexico, **3** Genomic Laboratory of Cardiovascular Diseases, Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), Mexico City, Mexico, **4** Sociomedical Department, INCICh, Mexico City, Mexico, **5** Pharmacology Department, INCICh, Mexico City, Mexico, **6** Immunogenetics Laboratory, INMEGEN, Mexico City, Mexico, **7** Biochemistry Unit, Centro Médico Siglo XXI, Mexico City, Mexico, **8** Graduate Studies in Biomedical Sciences, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

## Abstract

**Aim:** To explore the role of the *ACE* gene polymorphisms in the risk of essential hypertension in Mexican Mestizo individuals and evaluate the correlation between these polymorphisms and the serum ACE levels.

**Methods:** Nine *ACE* gene polymorphisms were genotyped by 5' exonuclease TaqMan genotyping assays and polymerase chain reaction (PCR) in 239 hypertensive and 371 non-hypertensive Mexican individuals. Haplotypes were constructed after linkage disequilibrium analysis. *ACE* serum levels were determined in selected individuals according to different haplotypes.

**Results:** Under a dominant model, rs4291 rs4335, rs4344, rs4353, rs4362, and rs4363 polymorphisms were associated with an increased risk of hypertension after adjusting for age, gender, BMI, triglycerides, alcohol consumption, and smoking. Five polymorphisms (rs4335, rs4344, rs4353, rs4362 and rs4363) were in strong linkage disequilibrium and were included in four haplotypes: H1 (AAGCA), H2 (GGATG), H3 (AGATG), and H4 (AGACA). Haplotype H1 was associated with decreased risk of hypertension, while haplotype H2 was associated with an increased risk of hypertension (OR = 0.77,  $P = 0.023$  and OR = 1.41,  $P = 0.004$  respectively). According to the codominant model, the H2/H2 and H1/H2 haplotype combinations were significantly associated with risk of hypertension after adjusted by age, gender, BMI, triglycerides, alcohol consumption, and smoking (OR = 2.0;  $P = 0.002$  and OR = 2.09;  $P = 0.011$ , respectively). Significant elevations in serum ACE concentrations were found in individuals with the H2 haplotype (H2/H2 and H2/H1) as compared to H1/H1 individuals ( $P = 0.0048$ ).

**Conclusion:** The results suggest that single nucleotide polymorphisms and the "GGATG" haplotype of the *ACE* gene are associated with the development of hypertension and with increased ACE enzyme levels.

**Citation:** Martínez-Rodríguez N, Posadas-Romero C, Villarreal-Molina T, Vallejo M, Del-Valle-Mondragón L, et al. (2013) Single Nucleotide Polymorphisms of the Angiotensin-Converting Enzyme (*ACE*) Gene Are Associated with Essential Hypertension and Increased ACE Enzyme Levels in Mexican Individuals. PLoS ONE 8(5): e65700. doi:10.1371/journal.pone.0065700

**Editor:** Michael Bader, Max-Delbrück Center for Molecular Medicine (MDC), Germany

**Received:** March 8, 2013; **Accepted:** April 26, 2013; **Published:** May 31, 2013

**Copyright:** © 2013 Martínez-Rodríguez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** Nancy L. Martínez-Rodríguez was supported by a fellowship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). This work was supported in part by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Project number 87356). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: gvargas63@yahoo.com

## Introduction

Hypertension plays a major etiologic role in the development of cerebrovascular disease, ischemic heart disease, cardiac and renal failure. [1]. Essential hypertension is a complex disease where environmental, demographic, and genetic factors are involved [2,3]; It has been estimated that approximately 30% of the interindividual variability in blood pressure is genetically determined [4]. Special attention has been given to the role of genetic variation in genes implicated in the renin-angiotensin system (RAS), particularly the angiotensin-converting enzyme (*ACE*) gene

[5,6]. *ACE* is a key enzyme in the renin-angiotensin-aldosterone (RAAS) and kallikrein-kinin systems [7,8] playing a crucial role in blood pressure (BP) regulation and electrolyte balance [9]. The most studied polymorphism in the RAAS system is an insertion or deletion (I/D) of a 287 bp sequence of DNA in intron 16 of the *ACE* gene. It has been suggested that this polymorphism could explain up to 47% of total phenotypic variation in *ACE* serum levels and determines *ACE* enzyme activity [10]. *ACE* serum levels of D/D homozygous individuals are reported to be twice as high as those of I/I homozygous individuals, while I/D

heterozygous individuals have intermediate ACE levels [11]. It is currently believed that the *I/D* polymorphism is not directly responsible for inherited ACE serum level variation in humans [10,12,13]. Tiret et al. demonstrated that this polymorphism is in close linkage disequilibrium to at least one, and perhaps more functional polymorphisms determining the phenotypic variations of enzyme levels [11]. Still, other studies have shown loci with variants of this sequence in complete linkage disequilibrium with the *I/D* polymorphism [14]. The role of *ACE* gene polymorphisms in hypertension has not been studied in the Mexican population. We selected 9 polymorphisms considering a previous study in which *ACE* haplotypes were described in African-American and European-American populations [15]. Population LD block differences were observed, as haplotypes were shorter and more diverse in Africans, while Europeans had longer and fewer haplotypes. This suggests that different linkage disequilibrium of the polymorphisms located in the *ACE* gene can be observed in other populations. On the other hand, the length of the genomic segment covered by the polymorphisms included in our study is 21 kb, increasing the possibility to detect some association with the disease. Thus, the objective of the present study was to analyze whether these polymorphisms or given haplotypes are associated with essential hypertension and ACE serum levels in Mexican Mestizo individuals.

## Materials and Methods

### Subjects

All participants provided written informed consent, and the study complies with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of the Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Cháavez” (INCICH). This study included a group of 239 hypertensive individuals (120 men and 119 women) referred to the National Institute of Cardiology (INCICH) in Mexico City. Hypertension was defined as systolic blood pressure (BP)  $\geq 140$  mmHg, diastolic BP  $\geq 90$  mmHg, or the use of at least one class of antihypertensive drugs. One hundred hypertensive subjects (41.8%) taking antihypertensive drugs (64 patients one drug, 26 patients two drugs and 10 patients three drugs). The drugs used were ACE inhibitors in 37 patients, beta-blockers in 38, angiotensin II type-1 receptor antagonist in 33, diuretics in 28 and calcium channel antagonists in 18. Secondary hypertension was minimized using detailed health questionnaire and clinical evaluation, and none patient had evidence of cardiac or renal failure. A group of 371 non-hypertensive individuals (168 men and 203 women) were recruited among blood donors at the INCICH with systolic and diastolic blood pressures below 140 and 90 mmHg respectively. All participants were ethnically matched, defining Mexican Mestizos as individuals born in Mexico for three generations, including their own. All participants provided informed consent.

### Genetic analysis

Genomic DNA from whole blood containing EDTA was isolated by standard techniques [16]. The *A-239T* (rs4291), *A7941G* (rs4318), *A10539G* (rs4335), *A11599G* (rs4343), *A12292G* (rs4344), *A15990G* (rs4353), *C19329T* (rs4362), and *A20069G* (rs4363) single nucleotide polymorphisms (SNPs) were genotyped using 5' exonuclease TaqMan genotyping assays on an ABI Prism 7900HT Fast Real-Time PCR system, according to manufacturer's instructions (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Table S1). The *ACE* polymorphism on intron 16 (*I/D*) was determined by PCR using the following primers: sense 5'-CTGCAGACCACTCCCATCCTTTCT-3' and antisense

5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3' previously described [10]. Each sample found to have the *D/D* genotype was subjected to a second PCR amplification with insertion-specific primers (5a: 5'-TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC-3' and 5c: 5'-TCGCCAGCCCTCCCATGCCCATAA-3') in order to avoid *D/D* mistyping [17].

Pairwise linkage disequilibrium (LD, *D*) estimations between polymorphisms and haplotype reconstruction were performed with Haploview version 4:1 (Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology and Harvard University, Cambridge, MA, USA).

### Serum ACE levels

Serum ACE levels were measured in 169 hypertensive individuals selected according to haplotype (33 H1/H1, 94 H1/H2 heterozygous and 42 H2/H2 homozygous). ACE concentrations were determined with Boster's human ACE ELISA Kit that was based on standard sandwich enzyme-linked immune-sorbent assay technology; measurements were in picograms per milliliter (pg/ml).

### Statistical analysis

Demographic and clinical variables between hypertensive and non-hypertensive groups were analyzed with Stata 8.0 for Windows software. Numerical variables not normally distributed are presented as median and percentiles 25 and 75, and were compared using Mann-Whitney U test. Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and comparisons between categorical variables were analyzed using  $\chi^2$ . Logistic regression analyses were used to test for associations of polymorphisms or haplotypes with hypertension under four inheritance models: co-dominant, dominant, recessive, and heterozygous advantage. The most appropriate inheritance model was selected based on Akaike information criteria (AIC) and was adjusted by age, gender, BMI, triglycerides, alcohol consumption, and smoking. Statistical power to detect association of polymorphisms with hypertension exceeded 0.80 as estimated with QUANTO software (<http://hydra.usc.edu/GxE/>).

Correlation between serum ACE concentration and haplotypes was tested using the Mann-Whitney U test. Statistical significance was set at  $P \leq 0.05$ .

### Functional prediction analysis

We predicted the potential effect of the *ACE* polymorphisms associated with hypertension in our population using bioinformatics Tools, including FastSNP [18], SNP Function Prediction (<http://snpinf.niehs.nih.gov/snpfunc.htm>), Human-transcriptome DataBase for Alternative Splicing (<http://www.h-invitational.jp/h-dbas/>), SplicePort (<http://www.spliceport.cs.umd.edu/SplicingAnalyser2.html>), ESE finder ([http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/ese\\_finder.cgi](http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/ese_finder.cgi)), HSF (<http://www.umd.be/HSF/>) and SNPs3D (<http://www.snps3d.org/>).

## Results

### Characteristic of the study sample

Demographic and clinical characteristics of patients and controls are shown in Table 1. Body mass index, triglyceride levels, glucose levels and alcohol consumption were significantly higher in hypertensive than in non-hypertensive individuals; while mean age, sex ratio and cholesterol levels were similar in both groups.

**Table 1.** Comparison of cardiovascular risk factors in hypertensive and non-hypertensive individuals.

	Hypertensive (n = 239)			Non-hypertensive (n = 371)			P value	
	P25	median	P75	P25	median	P75		
Age (years)	51	58	63	52	56	62	0.066	
Body-mass Index (kg/m <sup>2</sup> )	26.8	29.3	32.1	24.5	27.1	29.8	<10 <sup>-3</sup>	
Triglycerides (mg/dl)	117	160	215	105	142	191	<b>0.003</b>	
Glucose (mg/dl)	88	95	108	83	90	115	<10 <sup>-3</sup>	
Cholesterol (mg/dl)	175.3	196	215	166	193	211	0.083	
HDL(mg/dl)	36	44	54	37	45	56	0.161	
LDL(mg/dl)	99.6	121.4	138	98	118.8	137	0.319	
Blood Pressure (mmHg)	Systolic	127	137.5	151	103	111.5	<10 <sup>-3</sup>	
	Diastolic	74.3	81.5	87.5	65	69.5	<10 <sup>-3</sup>	
Gender (n(%))	Male	120(50.2)			168(45.3)			0.134
	Female	119(49.8)			203(54.7)			
Tobacco smoking (n(%))	Yes	43(18.0)			104(28.0)			<b>0.003</b>
Use of alcohol (n(%))	Never used	94 (39)			177 (48)			<b>0.025</b>
	> = 6 g/day use	145 (61)			194 (52)			
Type 2 diabetes mellitus (n(%))	Yes	33 (14)			71 (19)			0.054
Family history of hypertension (n(%))	Yes	121 (51.0)			231 (62.0)			<b>0.005</b>

Data are expressed as median and percentiles 25 and 75.

\*P values were estimated using Mann-Whitney U-test continuous variables and Chi-square or Fisher test for categorical values.

doi:10.1371/journal.pone.0065700.t001

### Allele and genotype frequencies

No deviation from HWE was observed for rs4291, rs4318, rs4335, rs4344, rs4353, rs4362, and rs4363 polymorphisms; however, the rs4343 was not in HWE in the non-hypertensive individuals. Allele frequencies of rs4291, rs4335, rs4344, rs4353, rs4362 and rs4363 differed significantly between hypertensive and non-hypertensive individuals. According to the dominant model, rs4291 (OR = 1.5, 95%CI: 1.07–2.15,  $P=0.02$ ), rs4335 (OR = 2.05, 95%CI: 1.39–2.99,  $P<10^{-3}$ ), rs4344 (OR = 1.82, 95%CI: 1.24–2.68,  $P=0.002$ ), rs4353 (OR = 1.80, 95%CI: 1.22–2.64,  $P=0.003$ ), rs4362 (OR = 1.71, 95%CI: 1.17–2.51,  $P=0.006$ ), and rs4363 (OR = 1.87, 95%CI: 1.27–2.74,  $P=0.001$ ), were significantly associated with hypertension adjusting for age, gender, BMI, triglycerides, alcohol consumption, and smoking (Table 2).

### SNP function prediction

Based on SNP functional prediction software's, only the rs4335 (FastSNP software), rs4353 (FastSNP software), and rs4363 (ESE finder and HSF software's) polymorphisms seem to be functional. The variation in these polymorphisms affects the DNA binding of the transcription factors AML-1, GATA-1, and Srp40, respectively.

### Haplotype frequencies

The linkage disequilibrium analysis was made considering the nine studied polymorphisms (Fig S1). Five polymorphism (rs4335, rs4344, rs4353, rs4362, rs4363) with high linkage disequilibrium ( $D'$  values >0.9 and  $r^2$  values >0.8) were reanalyzed (Fig 1) and used to construct four haplotypes, H1 (AAGCA), H2 (GGATG), H3 (AGATG), and H4 (AGACA). The H1 haplotype was associated with decreased risk (OR = 0.77, 95%CI: 0.66–0.97,  $P=0.023$ ), while the H2 haplotype was associated with increased risk of hypertension (OR = 1.41, 95%CI: 1.11–1.80,  $P=0.004$ ) (Table 3). After-

wards, the most common haplotypes were tested for association with hypertension under different inheritance models. Under the codominant model H2/H2 and H1/H2 haplotype combinations were significantly associated with risk of hypertension after adjusted by age, gender, BMI, triglycerides, alcohol consumption, and smoking (Table 4).

### Correlation between haplotypes and serum ACE levels

Serum ACE levels were analyzed in 33 hypertensive individuals homozygous for the H1 protective haplotype (H1/H1) and in 136 hypertensive individuals with at least one H2 risk haplotype (H1/H2 and H2/H2) (Fig. 2). Significant elevations in serum ACE concentrations were found in individuals with risk haplotypes (H2/H2 and H1/H2) (median 3802.37 pg/ml) as compared with H1/H1 individuals (median 2692.73 pg/ml;  $P=0.0048$ ).

### Discussion

Essential hypertension involves interactions among genetic, environmental, demographic, vascular, and neuroendocrine factors. The etiologic role of genes implicated in the renin-angiotensin system (RAS) has been widely studied. Several clinical studies have reported an association between *ACE* polymorphisms and pathological phenotypes [19–28]. In the present study, we genotyped nine *ACE* gene polymorphisms in a group of Mexican individuals with and without essential hypertension. Six out of nine polymorphisms (rs4291, rs4335, rs4344, rs4353, rs4362 and rs4363) were associated with hypertension in our group of patients. These associations were independent from other hypertension-associated risk factors. The rs4343 polymorphism was not associated with hypertension perhaps because this polymorphism was not in HWE in the non-hypertensive individuals. Of the studied polymorphisms, only the rs4291 has been previously studied in patients with hypertension. Zhu et al. [29] reported that individuals with the rs4291 T allele showed increased blood

**Table 2.** Associations of ACE polymorphisms with hypertension.

Polymorphism	Alleles*	MAF <sup>a</sup>	MAF <sup>a</sup>	Genotypes		OR(95%CI); P <sub>dom</sub> value
		HT	NHT	HT	NHT	
A-239T (rs4291)	<u>T</u> /A	0.35	0.29	25/118/96	34/149/188	1.51 (1.07–2.15); 0.020
				0.11/0.49/0.40	0.09/0.40/0.51	
A7941G (rs4318)	<u>G</u> /A	0.01	0.02	0/7/232	0/12/359	NS
				0.0/0.03/0.97	0.0/0.03/0.97	
A10539G (rs4335)	<u>G</u> /A	0.47	0.38	47/130/62	55/169/147	2.05 (1.39–2.99); <10 <sup>-3</sup>
				0.20/0.54/0.26	0.15/0.45/0.40	
I/D (rs4646994)	<u>I</u> /D	0.22	0.25	6/95/138	18/147/206	NS
				0.02/0.40/0.58	0.05/0.40/0.55	
A11599G (rs4343)	<u>G</u> /A	0.42	0.37	41/117/81	39/196/136	NS
				0.17/0.49/0.34	0.10/0.53/0.37	
A12292G (rs4344)	<u>G</u> /A	0.49	0.42	55/124/60	69/171/131	1.82 (1.24–2.68); 0.002
				0.23/0.52/0.25	0.19/0.46/0.35	
A159990G (rs4353)	<u>A</u> /G	0.48	0.41	49/129/61	67/171/133	1.80 (1.22–2.64); 0.003
				0.20/0.54/0.26	0.18/0.46/0.36	
C19329T (rs4362)	<u>T</u> /C	0.46	0.40	44/133/62	65/170/136	1.71 (1.17–2.51); 0.006
				0.18/0.56/0.26	0.17/0.46/0.37	
A20060G (rs4363)	<u>G</u> /A	0.47	0.40	47/129/63	62/170/139	1.87 (1.27–2.74); 0.001
				0.20/0.54/0.26	0.17/0.46/0.37	

Adjusted for age, gender, BMI, triglycerides, alcohol consumption and smoking.

<sup>a</sup>: MAF, minor allele frequency.

HT: Hypertensive individuals.

NHT: Non-hypertensive individuals.

NS: Not significant.

\*Underlined letter denotes the minor allele in the control samples.

doi:10.1371/journal.pone.0065700.t002

pressure, in agreement with our observation in the Mexican population. On the other hand, the bioinformatics tools we used predicted that only the rs4335, rs4353 and rs4363 polymorphisms have a potential functional effect, and this variant is predicted to be in a binding site for the AML-1, GATA-1, and Srp40 transcription factors. The presence of specific alleles in these polymorphisms could result in loss (or reduction) of DNA binding of these transcriptional factors with important consequences in the expression of the enzyme. According to linkage disequilibrium analysis, five out of nine polymorphisms studied (rs4335, rs4344, rs4353, rs4362, rs4363) were in high linkage disequilibrium and four haplotypes were constructed, one of them associated with risk (H2: *GGATG*) and another with protection (H1: *AAGCA*) for

**Table 3.** ACE haplotype frequencies in hypertensive and non-hypertensive individuals.

Haplotypes	Block 1	HT	NHT	OR (95% CI)	P value
H1	A-A-G-C-A	0.489	0.556	0.77 (0.66–0.97)	0.023
H2	G-G-A-T-G	0.426	0.346	1.41 (1.11–1.80)	0.004
H3	A-G-A-T-G	0.011	0.022	NS	—
H4	A-G-A-C-A	0.013	0.014	NS	—

HT, hypertensive; NHT, non-hypertensive; OR, odds ratio; CI, confidence interval; NS, not significant. The order of the polymorphisms in the haplotypes is according to the positions in the chromosome (rs4335, rs4344, rs4353, rs4362, rs4363).

doi:10.1371/journal.pone.0065700.t003

hypertension. Zhu et al. [29] studied 10 polymorphisms in hypertensive patients from African-American and European-American populations. Our study included 8 of these 10 polymorphisms. In the study by Zhu et al. [29], a haplotype with three polymorphisms was associated with hypertension; however, the haplotype associated was different in African-American and European-American patients. In the African-Americans, the haplotype associated included the rs4343, rs4353, and rs4363 polymorphisms (*AAA* haplotype), whereas in European-Americans the haplotype included the rs4335, rs4343, and rs4344 polymorphisms (*GGG* haplotype). The risk haplotype in the Mexican Mestizo population includes the rs4335 *G* and rs4344 *G* alleles detected in European-American population and the rs4353 *A* allele detected in African-American individuals.

We also measured ACE serum levels to seek whether any

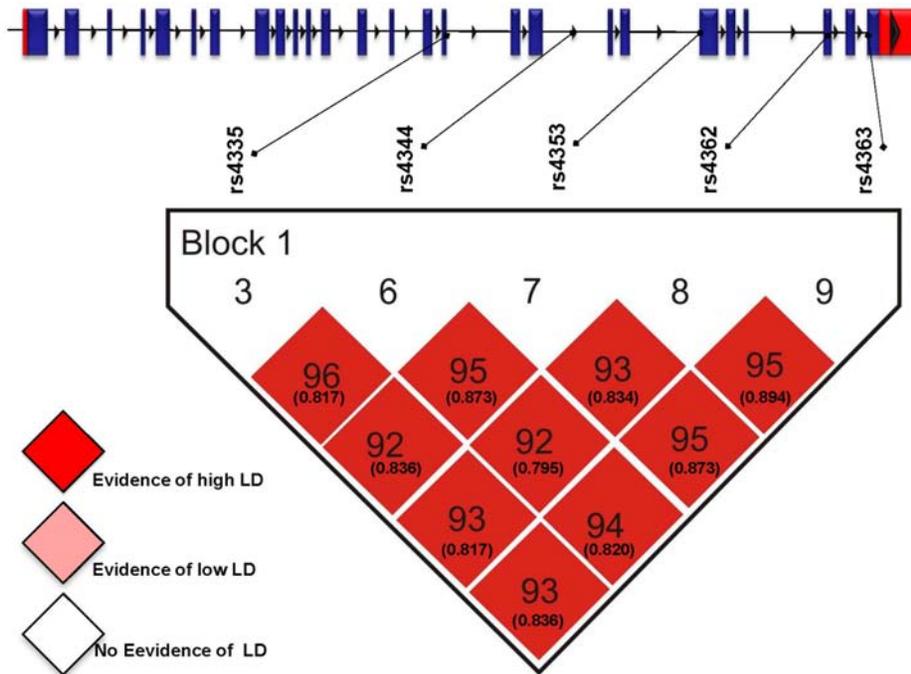
**Table 4.** Risk assessment according to haplotypes using the codominant inheritance model.

Model	Haplotypes	OR	95% CI	P value
	H1/H1	1		
Co-dominant	H1/H2	2.00	1.294–3.118	0.002
	H2/H2	2.09	1.180–3.704	0.011

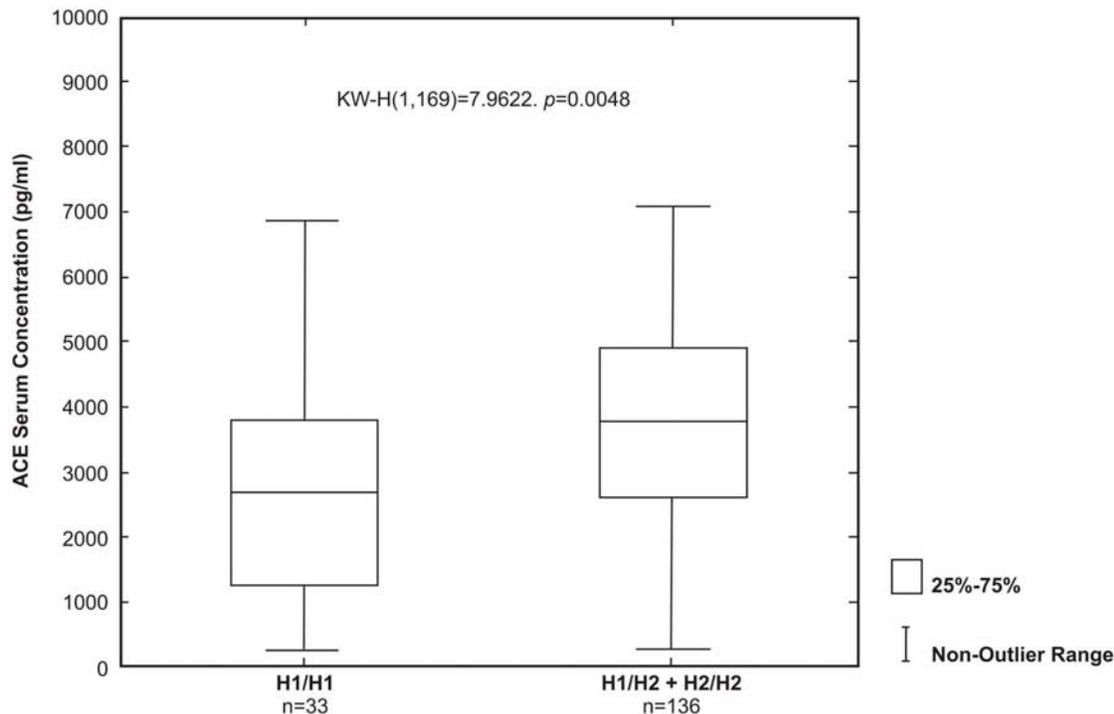
OR; odds ratio, CI; confidence interval.

Adjusted by age, gender, BMI, triglycerides, alcohol consumption, and smoking.

doi:10.1371/journal.pone.0065700.t004



**Figure 1. Haploview linkage disequilibrium graph of five ACE gene polymorphisms (rs4335, rs4344, rs4353, rs4362, rs4363).** Pairwise linkage disequilibrium coefficients  $D \times 100$  are shown in each cell ( $D$  values of 1.0 are not shown). Standard color scheme of Haploview was applied for linkage disequilibrium color display (logarithm of odds [LOD] score  $\geq 2$  and  $D = 1$ , shown in bright red; LOD score  $\geq 2$  and  $D < 1$  shown in shades of pink/red; LOD score  $\leq 2$  and  $D < 1$  shown in white).  $D$  values of 1.0 are not shown. Numbers in boxes and parentheses represent  $D$  values and  $r^2$  values after the decimal point, respectively.  
doi:10.1371/journal.pone.0065700.g001



**Figure 2. Graphic representation of serum ACE concentrations according to haplotypes.** The limits of the boxes represent the middle 50% of the data values; the extent of the lines encompass the interquartile range with extreme outlying data points shown as such. The central line within each box represents the median. H1/H1 = homozygous for protection, H1/H2 = heterozygous protection/risk and H2/H2 = homozygous for risk. Serum ACE concentrations were measured in patients without ACE inhibitors treatment.  
doi:10.1371/journal.pone.0065700.g002

haplotype was associated with this trait in hypertensive individuals. A limitation of our study is the fact that ACE levels were not measured in non-hypertensive individuals. Significant elevations in serum ACE concentrations were found in hypertensive individuals with the risk haplotypes when compared to individuals with the protective haplotype. This result supports the role of these haplotypes in the genetic susceptibility to developing essential hypertension. In a previous study, the relationship between the ACE levels and seven polymorphisms of the *ACE* gene was analyzed [30]. None of the polymorphisms studied by Zhu et al. [30] was included in our study. Zhu et al. [30] detected a haplotype associated with ACE levels. We suggest that these studies be extended to other ethnic groups to establish other regulatory regions in the *ACE* gene.

The most studied *ACE* gene polymorphism in this case is the insertion/deletion. In the study by Zhu et al. [12], two polymorphisms accounted for the variation of ACE concentration, *A2350G* had the most significant effect, accounting for 19% of the total variation in ACE, while rs4291 located in the 5' section of the gene accounted for 6% of the variation. The effects of both these polymorphisms fitted best an additive model. After adjustment for the effect of *A2350G*, the *I/D* polymorphism was no longer associated with ACE, indicating that it is in LD with *A2350G* and unlikely to be a functional polymorphism. In this study, was established that the rs4291 *A* allele is associated with increased levels of ACE. This polymorphism was not associated with either hypertension or ACE levels in the Mexican Mestizo population. The association of other *ACE* polymorphisms with ACE levels is contradictory with positive and negative associations [31–34].

## Conclusions

In summary, our results suggest that the rs4291, rs4335, rs4344, rs4353, rs4362, and rs4363 *ACE* gene polymorphisms might play an important role in the development of hypertension in the

Mexican population. In our study, it was possible to identify a risk haplotype (H2: *GGATG*) and a protective haplotype (H1: *AAGCA*) for hypertension. Individuals with the risk haplotype showed increased ACE plasma levels as compared to individuals with the protective haplotype.

## Supporting Information

**Figure S1 Haploview linkage disequilibrium graph of nine *ACE* gene polymorphisms.** Pairwise linkage disequilibrium coefficients  $D \times 100$  are shown in each cell ( $D$  values of 1.0 are not shown). Standard color scheme of Haploview was applied for linkage disequilibrium color display (logarithm of odds [LOD] score  $\geq 2$  and  $D = 1$ , shown in bright red; LOD score  $\geq 2$  and  $D < 1$  shown in shades of pink/red; LOD score  $\leq 2$  and  $D < 1$  shown in white).  $D$  values of 1.0 are not shown. Numbers in boxes and parentheses represent  $D$  values and  $r^2$  values after the decimal point, respectively.

(TIFF)

**Table S1 Genetic Polymorphisms studied in the *ACE* gene.**

(DOC)

## Acknowledgments

This work was submitted in partial fulfillment of the requirements for the Ph.D degree by Nancy L. Martínez-Rodríguez at the Graduate Studies in Biomedical Sciences of the *Universidad Nacional Autónoma de México*. The authors are grateful to the study participants.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GVA NMR. Performed the experiments: NMR LDVM AV. Analyzed the data: MV GVA JRB. Contributed reagents/materials/analysis tools: MCL AV CPR. Wrote the paper: GVA TVM.

## References

- Collins R, Peto R, MacMahon S, Hebert P, Fiebach NH, et al. (1990) Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2, short-term reductions in blood pressure: overview of randomized drug trials in their epidemiological context. *Lancet* 335: 827–838.
- World Health Organization/International Society of Hypertension Guidelines for the management of hypertension (2003) *J Hypertension* 17: 151–183.
- Schork NJ (1997) Genetically complex cardiovascular traits. Origins, problems, and potential solutions. *Hypertension* 29: 145–149.
- Ward R (1995) Familial aggregation and genetic epidemiology of blood pressure. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*. New York: Raven Press. pp. 67–68.
- Hubert C, Houot MA, Corvol P, Soubrier F (1991) Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicate gene. *J Biol Chem* 266: 15377–15383.
- Mattei MG, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Roeckel N, Corvol P, et al. (1989) Soubrier F. Angiotensin I converting enzyme gene is on chromosome 17. *Cytogenet Cell Genet* 51: 1041–1045.
- Erdos EG, Skidgel RA (1987) The angiotensin I-converting enzyme. *Lab Invest* 56: 345–348.
- Crisan D, Carr J (2000) Angiotensin I-converting enzyme, genotype and disease associations. *J Mol Diagn* 2: 105–115.
- Esther CR, Marino EM, Howard TE, Machaud A, Corvol P, et al. (1997) The critical role of tissue angiotensin-converting enzyme as revealed by gene targeting in mice. *J Clin Invest* 99: 2375–2385.
- Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, et al. (1990) An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 86: 1343–1346.
- Tiret L, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, et al. (1992) Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet* 51: 197–205.
- Zhu X, Bouzekri N, Southam L, Cooper RS, Adeyemo A, et al. (2001) Linkage and association analysis of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-gene polymorphisms with ACE concentration and blood pressure. *Am J Hum Genet* 68: 1139–1148.
- Davis GK, Roberts DH (1997) Molecular genetics of the renin-angiotensin system: implications for angiotensin II receptor blockade. *Pharmacol Ther* 75: 43–50.
- Rieder MJ, Taylor SL, Clark AG, Nikerson DA (1999) Sequence variation in the human angiotensin converting enzyme. *Nature Genet* 22: 59–62.
- Zhu X, Yan D, Cooper RS, Luke A, Ikeda MA, et al. (2003) Linkage disequilibrium and haplotype diversity in the genes of the rennin-angiotensin system. Findings from the family blood pressure program. *Genome Res* 13: 173–181.
- Miller A (1993) A Single salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell. *Nucleic Acid Res* 16: 1215–1217.
- Shanmugam V, Sell KW, Saha BK (1993) Mistyping ACE heterozygotes. *PCR Methods Appl* 3: 120–121.
- Yuan HY, Chiou JJ, Tseng WH, Liu CH, Liu CK, et al. (2006) FASTSNP: an always up-to-date and extendable service for SNP function analysis and prioritization. *Nucleic Acids Res* 34 (Web Server issue): W635–41. Accessed 2012.
- Kabadou IA, Soualmia H, Jemaa R, Feki M, Kallel A, et al. (2013) G protein beta3 subunit gene C825T and angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphisms in hypertensive Tunisian population. *Clin Lab* 59: 85–92.
- Yadav S, Hasan N, Marjot T, Khan MS, Prasad K, et al. (2013) Detailed analysis of gene polymorphisms associated with ischemic stroke in South asians. *PLoS One* 8:e57305.
- Sakai T, Shikishima K, Matsushima M, Tsuneoka H (2013) Genetic polymorphisms associated with endothelial function in nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy. *Mol Vis* 19: 213–219.
- Yang SJ, Kim S, Park H, Kim SM, Choi KM, et al. (2013) Sex-dependent association between angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and obesity in relation to sodium intake in children. *Nutrition* 29: 525–530.

23. Jing Q, Wang X, Ma Y, Yang M, Huang G, et al. (2013) Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism and the risk of thoracic aortic dissection in Chinese Han population. *Mol Biol Rep* 40: 1249–1254.
24. Rasyid H, Bakri S, Yusuf I (2012) Angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms, blood pressure and pulse pressure in subjects with essential hypertension in a South Sulawesi Indonesian population. *Acta Med Indones* 44: 280–283.
25. Dhar S, Ray S, Dutta A, Sengupta B, Chakrabarti S (2012) Polymorphism of ACE gene as the genetic predisposition of coronary artery disease in Eastern India. *Indian Heart J* 64: 576–581.
26. Yang W, Dong X, Li B, Zhang XQ, Zeng Y, et al. (2012) Correlation of angiotensin converting enzyme gene polymorphism with perioperative myocardial protection under extracorporeal circulation. *Asian Pac J Trop Med* 5: 995–999.
27. Zhang XL, Wu LQ, Liu X, Yang YQ, Tan HW, et al. (2012) Association of angiotensin-converting enzyme gene I/D and CYP11B2 gene -344T/C polymorphisms with lone atrial fibrillation and its recurrence after catheter ablation. *Exp Ther Med* 4: 741–747.
28. Zhang Z, Xu G, Liu D, Fan X, Zhu W, et al. (2012) Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism contributes to ischemic stroke risk: a meta-analysis of 50 case-control studies. *PLoS One* 7: e46495.
29. Zhu X, Chang YP, Yan D, Weder A, Cooper R, et al. (2003) Association between hypertension and genes in the rennin-angiotensin system. *Hypertension* 41: 1027–1034.
30. Zhu X, McKenzie CA, Forrester T, Nickerson DA, Broeckel U, et al. (2000) Localization of a small genomic region associated with elevated ACE. *Am J Hum Genet* 67: 1144–1153.
31. Villard E, Tiret L, Visvikis S, Rakotovao R, Cambien F, et al. (1996) Identification of new polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene, and study of their relationship to plasma ACE levels by two QTL segregation linkage analysis. *Am J Hum Genet* 58: 1268–1278.
32. Keavney B, McKenzie CA, Connell JM, Julier C, Ratcliffe PJ, et al. (1998) Measured haplotype analysis of the angiotensin-I converting enzyme (ACE) gene. *Hum Mol Genet* 7: 1745–1751.
33. Baghai TC, Binder EB, Schule C, Salyakina D, Eser D, et al. (2006) Polymorphisms in the angiotensin-converting enzyme gene are associated with unipolar depression, ACE activity and hypercortisolism. *Mol Psychiatry* 11: 1003–1015.
34. Chung CM, Wang RY, Chen JW, Fann CS, Leu HB, et al. (2010) A genome-wide association study identifies new loci for ACE activity: potential implications for response to ACE inhibitor. *Pharmacogenomics J* 10: 537–544.

# Association of angiotensin II type I-receptor gene polymorphisms with the risk of developing hypertension in Mexican individuals

Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System  
13(1) 133–140  
© The Author(s) 2011  
Reprints and permission:  
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav  
DOI: 10.1177/1470320311419175  
jra.sagepub.com



Nancy Martínez-Rodríguez<sup>1,2</sup>, Carlos Posadas-Romero<sup>3</sup>,  
Guillermo Cardoso<sup>3</sup>, José Manuel Rodríguez-Pérez<sup>1</sup>,  
Nonanzit Pérez-Hernández<sup>1</sup>, Maite Vallejo<sup>4</sup>  
and Gilberto Vargas-Alarcón<sup>1</sup>

## Abstract

**Introduction:** Hypertension is a complex disease in which a significant interaction between genetic and environmental factors takes place. The renin–angiotensin system plays an important role regulating blood pressure to maintain homeostasis and vascular tone. In the present work, the role of angiotensin II type I-receptor (AGTR1) gene polymorphisms as susceptibility markers for hypertension was evaluated.

**Materials and methods:** Five polymorphisms in the *AGTR1* gene were genotyped by 5' exonuclease TaqMan genotyping assays in 239 hypertensive and 371 non-hypertensive individuals.

**Results:** A similar distribution of rs275651, rs275652, rs275653, and rs5183 polymorphisms was observed in both studied groups. Different distribution of rs5182 genotypes was observed between the studied groups ( $p = 0.016$ ). According to the co-dominant model, individuals with rs5182 CC genotype have a 1.83-fold increased risk of developing hypertension ( $p = 0.009$ ). Polymorphisms were distributed in two blocks: block 1 included the rs275651, rs275652, and rs275653 polymorphisms, whereas block 2 included the rs5183 and rs5182 polymorphisms. Individuals with hypertension showed increased frequency of 'CA' haplotype of block 2 when compared to non-hypertensive individuals ( $p = 0.015$ , odds ratio = 1.33).

**Conclusion:** The results suggest that the rs5182 gene polymorphism could be involved in the risk of developing hypertension in Mexican individuals.

## Keywords

Angiotensin II type I receptor, genetic susceptibility, hypertension, polymorphisms, renin–angiotensin system

## Introduction

Hypertension plays a major etiologic role in the development of cerebrovascular disease, ischemic heart disease, cardiac, and renal failure. Treating hypertension has been associated with about a 40% reduction in the risk of stroke and about a 15% reduction in the risk of myocardial infarction.<sup>1</sup> Although treatment of hypertension has been shown to prevent cardiovascular disease and to extend and enhance life, hypertension remains inadequately managed. In addition, hypertension often coexists with other cardiovascular risk factors, such as smoking, diabetes, hyperlipidemia, and obesity. Hypertension is a complex disease with important participation of environmental, demographic, and genetic factors;<sup>2,3</sup> approximately 30% of the interindividual variability in blood pressure is genetically determined.<sup>4</sup>

Special attention has been given to the study of genes implicated in the renin–angiotensin system. Molecules of

this system contribute importantly to the regulation of vascular tone, blood pressure, cardiovascular remodeling, and electrolyte and volume homeostasis.<sup>5</sup> The major

<sup>1</sup> Department of Molecular Biology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico

<sup>2</sup> Graduate Studies in Biomedical Sciences, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

<sup>3</sup> Department of Endocrinology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico

<sup>4</sup> Sociomedical Department, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico

### Corresponding author:

Gilberto Vargas-Alarcón, Department of Molecular Biology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Juan Badiano 1, Sección XVI, Tlalpan, Mexico City, Mexico.  
Email: gvargas63@yahoo.com

biologically active product of this system is angiotensin II, which is a peptide with multiple functions, including vasoconstriction, aldosterone production, and noradrenaline release from sympathetic nerve endings. It has hypertropic and hyperplastic effects on vascular smooth muscle and cardiomyocytes, synthesis of the extracellular collagen matrix, and is tightly intertwined with the cascade of inflammatory, thrombotic, and fibrotic factors.<sup>6</sup> These effects are mediated directly and indirectly via two distinct receptors, namely angiotensin II receptor type 1 (AGTR1) and type 2 (AGTR2).<sup>7</sup> The AGTR1 receptor is present predominantly in vascular smooth muscle cells, and AGTR2 receptor is present in the uterus, brain, and adrenal medulla. Both subtypes are also expressed in the adrenal cortex and kidney.<sup>8</sup> Because of the physiological role of the AGTR1 in the cardiovascular system, the gene that encodes this molecule is an excellent candidate in the etiology of hypertension and other cardiovascular diseases.

The *AGTR1* gene is located on chromosome 3q21-25 and has a length of more than 55 kb.<sup>9</sup> This gene presents several polymorphisms with important participation in the susceptibility to diseases.<sup>10-13</sup> The present study was based on the assumption that the *AGTR1* gene polymorphisms have a measurable influence on the hypertension mechanism and contribute to, or reduce, this disease. Thus, the aim of the present study was to establish the role of the *AGTR1* gene polymorphism in the risk of developing hypertension in Mexican Mestizo individuals.

## Materials and methods

### Individuals studied

This study included a group of 239 hypertensive individuals (120 men and 119 women) referred to our institution. Hypertension was defined as a systolic blood pressure  $\geq 140$  mmHg, a diastolic blood pressure  $\geq 90$  mmHg, or the use of at least one class of antihypertensive agents. A group of 371 non-hypertensive individuals (168 men and 203 women) were recruited from the blood bank of our Institute; these individuals had a systolic and diastolic of less than 140/90 mmHg and had neither a personal history

of elevated blood pressure nor a familial history of hypertension. All subjects included in the study were ethnically matched, and we considered as Mexican Mestizos only those individuals who had been born in Mexico for three generations, including their own. A Mexican Mestizo is defined as someone born in Mexico, who is a descendant of the original autochthonous inhabitants of the region and of individuals, mainly Spaniards, of Caucasian and/or African origin, who came to America during the sixteenth century. The study complies with the Declaration of Helsinki. The Institutional Bioethics and Research Committee approved the present study and all study subjects signed an informed consent letter.

### DNA extraction

Genomic DNA from whole blood containing EDTA was isolated by standard techniques.<sup>14</sup>

### Determination of the *AGTR1* genotypes

The *AGTR1*-777 A>T (rs275651), *AGTR1*-680 G>T (rs275652), *AGTR1*-119 A>G (rs275653) *AGTR1*+49227 C>G (rs5183), and *AGTR1*+573T C>T (rs5182) single nucleotide polymorphisms were genotyped using 5' exonuclease TaqMan genotyping assays on an ABI Prism 7900HT Fast Real-Time PCR system, according to manufacturer's instructions (Applied Biosystems, Foster City, USA) (Table 1).

### Statistical analysis

Allele and genotype frequencies of the studied polymorphisms were obtained by direct counting. Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was calculated using the Chi-squared test. The significance of the difference between groups was determined using Mantel-Haenszel chi-square analysis. Fisher's exact test was used when needed. Demographic and clinical variables between hypertensive and non-hypertensive groups were analyzed with Stata 8.0 for Windows software. In the exploratory analysis, numerical data had a different distribution from normal standard

**Table 1.** Studied polymorphisms

No.	SNP name	Ch position (pb)	Gene region	Alleles
1	rs275651	149897577	5' near region	T/A
2	rs275652	149897674	5' near region	T/G
3	rs275653	149898235	5' near region	A/G
4	rs5182	149942085	Exon 4	T/C
5	rs5183	149942574	3' near region	A/G

SNP: single nucleotide polymorphism.

(Gaussian distribution) (Test of normality Shapiro Wilk's  $p > 0.05$ ). Comparison of numerical variables between hypertensive and non-hypertensive individuals was done with Mann Whitney U-test and data are presented as median and percentiles 25 and 75. Categorical variables were analyzed with Chi-squared or Fisher tests as required and presented as absolute frequencies and proportions. Statistical significance was set at  $p \leq 0.05$ . Inheritance hypothesis was tested according to four models: co-dominant, dominant, recessive, and heterozygous advantage. Logistic regression analysis was used in a bivariate way to estimate the risk of having hypertension between hypertensive and non-hypertensive individuals against the rs5182 polymorphism. Multiple logistic models were constructed in order to identify the variables that explain better the risk of developing hypertension between the studied groups. Models were constructed including one variable at a time, and final models included variables with biological relevance or with statistical significance, or both. Confounding bias was accepted when changes in estimated odds ratios (ORs) were equal or larger than 10%. When a principal effect model was reached, effect modification was also tested and interaction terms were constructed between the polymorphism and age, body mass index, triglycerides, alcohol consumption, and smoking habit; the terms were included in the model when the significance of the  $p$ -value was larger or equal to 0.20. Hosmer–Lemeshow Goodness of Fit test was performed for each multiple logistic model. Pairwise linkage disequilibrium (LD,  $D'$ ) estimations between polymorphisms and haplotype reconstruction were performed with Haploview version 4:1 (Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology and Harvard University, Cambridge, Massachusetts, USA).

## Results

### Characteristics of the study sample

The demographic and clinical characteristics are shown in Table 2. Similar age and gender distribution was observed between hypertensive and non-hypertensive individuals. However, body mass index, triglyceride, glucose, alcohol consumption, and type 2 diabetes mellitus were higher in hypertensive than in non-hypertensive individuals. There were no significant differences between the hypertensive and non-hypertensive individuals for smoking status and cholesterol levels.

### Allele and genotype frequencies

Allele and genotype frequencies of gene polymorphisms in hypertensive and non-hypertensive individuals are shown in Table 3. Observed and expected frequencies in all polymorphic sites were in Hardy–Weinberg equilibrium. Similar distribution of the rs275651, rs275652, rs275653, and rs5183 polymorphisms was observed in hypertensive and non-hypertensive individuals. However, different distribution of rs5182 genotypes was observed in hypertensive and non-hypertensive individuals ( $p = 0.016$ ). The inheritance hypothesis for this polymorphism was tested according to four models: co-dominant, dominant, recessive, and heterozygous advantage (Table 4). According to the co-dominant model, individuals with *CC* genotype had a 1.83-fold increased risk of developing hypertension ( $p = 0.009$ ). The co-dominant model in this study was selected on the basis of Akaike Information Criteria; this model allows every genotype to give a different and non-additive risk. With respect to the analysis of the interactions between co-dominant model and covariates, after adjusting for known

**Table 2.** Cardiovascular risk factors distribution between normal and high blood pressure subjects<sup>a</sup>

Variable	Blood Pressure						$p$ -value
	Normal (< 140/90 mmHg) ( $n = 371$ )			High ( $\geq 140/90$ mmHg) ( $n = 239$ )			
Alcohol consumption							
Never	177 (48)			94 (39)			0.025
$\geq 6$ g/day	194 (52)			145 (61)			
Type 2 diabetes mellitus							
Yes	71 (19)			33 (14)			0.054
No	300 (81)			206 (86)			
	P25	median	P75	P25	median	P75	
Age (years)	52	56	62	51	58	63	0.0451
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	24.5	27.1	29.8	26.8	29.3	32.1	<0.0001
Triglycerides (mg/dl)	105	142	191	117	160	215	0.0029
Glucose (mg/dl)	83	90	115	88	95	108	<0.0001

<sup>a</sup>Only the variables with a significant  $p$ -value are shown; gender distribution, values of total cholesterol, LDL, and HDL were similar in hypertensive and non-hypertensive individuals.

**Table 3.** Allele and genotype distribution of AGTR1 polymorphisms in non-hypertensive and hypertensive individuals

SNP		Non hypertensive (n = 371) (n%)	Hypertensive (n = 239) (n%)	p-value	
rs275651 (-777 A/T)	Alleles	A	79 (10.6)	49 (10.3)	NS
		T	663 (89.4)	429 (89.7)	
	Genotypes	AA	8 (2.2)	5 (2.1)	
		AT	63 (16.9)	39 (16.3)	
		TT	300 (80.9)	195 (81.6)	
rs275652 (-680 G/T)	Alleles	G	80 (10.7)	51 (10.7)	NS
		T	662 (89.3)	427 (89.3)	
	Genotypes	GG	3 (0.9)	5 (2.1)	
		GT	74 (19.9)	41 (17.2)	
		TT	294 (79.2)	193 (80.7)	
rs275653 (-119 A/G)	Alleles	A	664 (89.5)	433 (90.6)	NS
		G	78 (10.5)	45 (9.4)	
	Genotypes	AA	296 (79.8)	198 (82.8)	
		AG	72 (19.4)	37 (15.5)	
		GG	3 (0.8)	4 (1.7)	
rs5183 (49227 A/G)	Alleles	A	708 (95.4)	457 (95.6)	NS
		G	34 (4.6)	21 (4.4)	
	Genotypes	AA	339 (91.4)	219 (91.6)	
		AG	30 (8.1)	19 (8)	
		GG	2 (0.5)	1 (0.4)	
rs5182 (+573 C/T)	Alleles	C	325 (44)	245 (51)	<b>0.016</b>
		T	417 (56)	233 (49)	
	Genotypes	<b>CC</b>	<b>69 (18.6)</b>	<b>68 (28.5)</b>	
		CT	187 (50.4)	109 (45.6)	
		TT	115 (31)	62 (25.9)	

NS: not significant; SNP: single nucleotide polymorphism.

risk factors, we found that there was a significant contribution of age, BMI, triglycerides, alcohol consumption to the inheritance model. We identified the smoking habit as a significant protective factor in this model, perhaps because patients stopped smoking or reduced the number of cigarettes that they usually smoke (Table 5). The analysis of linkage disequilibrium of the AGTR1 polymorphisms (rs275651, rs275652, rs275653, rs5183, and rs5182) is shown in Table 6. The polymorphisms were distributed in

two blocks; block 1 included the rs275651, rs275652, and rs275653 polymorphisms, whereas block 2 included the rs5183 and rs5182 polymorphisms (Figure 1). Distribution of block 1 was similar in hypertensive and non-hypertensive individuals. However, distribution of block 2 was different, with increased frequency of the CA haplotype and decreased frequency of the TA haplotype in the hypertensive individuals when compared to non-hypertensive individuals ( $p = 0.015$ , OR = 1.33, 95% confidence interval

**Table 4.** Risk analysis (rs5182 polymorphism) as function of the inheritance model in hypertensive and non-hypertensive individuals<sup>a</sup>

Inheritance model	Genotype	OR	95% CI	p-value
Co-dominant	TT	1.0		
	CT	1.08	0.733–1.595	NS
	<b>CC</b>	<b>1.83</b>	<b>1.159–2.883</b>	<b>0.009</b>
Recessive	CC vs.	1.0		
	CT+TT	1.282	0.892–1.844	NS
Dominant	TT vs.	1.0		
	CT+CC	0.780	0.542–1.121	NS
Heterozygous advantage	CT vs.	1.0		
	CC+TT	1.212	0.875–1.680	NS

OR, odds ratio; CI, confidence interval. <sup>a</sup>Sample output of association models for binary response. Four inheritance models are fitted, which correspond to different parameterizations or groupings of the genotypes. Akaike's Information Criterion (AIC) was used to select the best model for a specific polymorphism. The inheritance model with less AICs is the co-dominant.

**Table 5.** Risk assessment in the rs5183 polymorphism using the co-dominant inheritance model between hypertensive and non-hypertensive individuals<sup>a</sup>

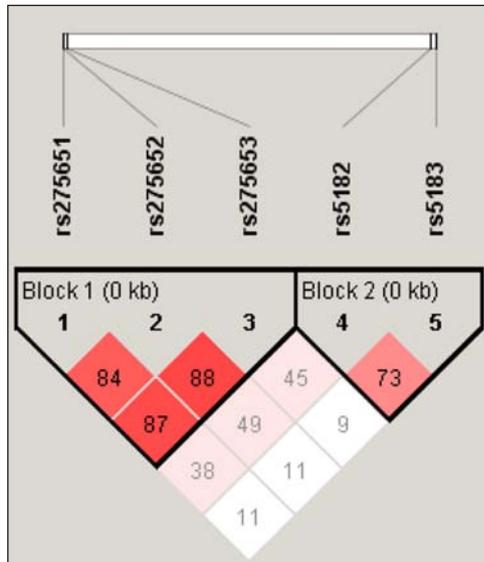
Variable	OR	95% CI	p-value
rs5183 (co-dominant)			
Genotypes:			
TT	1		
CT	1.082	0.713–1.643	NS
<b>CC</b>	<b>1.854</b>	<b>1.139–3.016</b>	<b>0.013</b>
Age (years)	1.025	1.260–2.600	0.020
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	1.136	1.088–1.186	< 0.001
Triglycerides	1.003	1.001–1.005	0.003
Alcohol consumption (Yes/No)	1.807	1.260–2.600	0.001
Smoking (Yes/No)	0.463	0.321–0.668	< 0.001

OR, odds ratio; CI, confidence interval; NS, Not significant. <sup>a</sup>The data were adjusted for age, body mass index (BMI), triglycerides, alcohol consumption and smoking habit.

**Table 6.** AGTR1 haplotype frequencies in hypertensive and non-hypertensive individuals<sup>a</sup>

Haplotypes	Frequencies		OR (95% CI)	p-value
	HT	NH		
Block 1 (rs275651, rs275652, rs275653)				
T-T-A	0.869	0.875		
A-G-G	0.076	0.091		
Block 2 (rs5182, rs5183)				
<b>T-A</b>	<b>0.483</b>	<b>0.554</b>	<b>0.75 (0.59–0.94)</b>	<b>0.019</b>
<b>C-A</b>	<b>0.472</b>	<b>0.401</b>	<b>1.33 (1.06–1.68)</b>	<b>0.015</b>
C-G	0.038	0.039		

HT, hypertensive; NH, non-hypertensive; OR, odds ratio; CI, confidence interval; p-value < 0.005. <sup>a</sup>The order of the polymorphisms in the haplotypes is according to the positions in the chromosome.



**Figure 1.** Haploview linkage disequilibrium graph of *AGTR1* gene. Pairwise linkage disequilibrium coefficients  $D' \times 100$  are shown in each cell ( $D'$  values of 1.0 are not shown). Standard color scheme of Haploview was applied for linkage disequilibrium color display (logarithm of odds [LOD] score  $\geq 2$  and  $D' = 1$ , shown in bright red; LOD score  $\geq 2$  and  $D' < 1$  shown in shades of pink/red; LOD score  $< 2$  and  $D' < 1$  shown in white).

[CI] = 1.06–1.68 and  $p = 0.019$ , OR = 0.75, 95% CI = 0.59–0.94, respectively) (Table 6).

## Discussion

Hypertension involves interactions among genetic, environmental, demographic, vascular, and neuroendocrine factors. Essential hypertension is the most frequent diagnosis in this syndrome; the etiology has not been identified. However, a number of risk factors underlying essential hypertension have been identified, including age, gender, and genetics. In some cases, the control of environmental risk factors associated with an appropriate drug/dose can normalize the blood pressure. From the genetic point of view, special attention has been given to the study of genes implicated in the renin–angiotensin system. Several clinical studies have reported an association between *AGTR1* genotype and pathological phenotypes, including essential hypertension, cardiovascular disease, and diabetic nephropathy. In the present study, we determined five polymorphisms of the *AGTR1* gene in a group of Mexican individuals with and without hypertension. Three polymorphisms are located in the 5' region (rs275651, rs275652, and rs275653) and the other two in the 3' region (rs5182 and rs5183). An increased frequency of the rs5182 C allele and CC genotype was observed in hypertensive individuals, suggesting a

role of this polymorphism in the genetic susceptibility of such individuals to hypertension. This polymorphism has been studied in several diseases with contradictory results. Bonnardeaux et al.<sup>15</sup> screened the exon 5 and the 3'-untranslated region, and identified five frequent polymorphisms: +573 (rs5182), +1062, +1166, +1517, and +1878; in this study, the authors used case–control and linkage studies to examine the association between *AGTR1* gene polymorphisms and essential hypertension.<sup>15</sup> Of the five polymorphisms that they described, only the +1166 in the 3'-untranslated region was significantly associated with hypertension. This association was most pronounced in those with an earlier onset of hypertension or more severe hypertension. On the other hand, Chaves et al.<sup>16</sup> found that the rs5182 TT genotype might be a genetic protective factor for urinary albumin excretion in patients with essential hypertension. Zhu et al.<sup>17</sup> reported a haplotype containing the rs5182 C and rs5183 G alleles, possibly associated with hypertension in African-Americans ( $p < 0.05$ ). In a haplotype transmission disequilibrium test, this 'CG' haplotype was transmitted over to hypertensive offspring ( $p = 0.0002$ ). No association was found in Caucasian Americans in this study.<sup>17</sup> In our study, the haplotype analysis showed that the *AGTR1* polymorphisms were distributed in two blocks; one of them included the rs5182 and rs5183 polymorphisms (block 2). In this block, the haplotype associated with hypertension was 'CA'; this haplotype includes the same rs5182 allele as the haplotype reported by Zhu; however, it includes a different allele in the rs5183 polymorphism. This suggests an important participation of the rs5182 polymorphism in the genetic susceptibility to hypertension. Contrary to the participation of the rs5182 polymorphism in hypertension, in which the C allele has been associated with susceptibility, Israni et al.<sup>18</sup> reported that the rs5182 T allele was associated with a 50% decline in the estimated glomerular filtration rate after kidney transplant. The authors suggest that this polymorphism may impact renal allograft function through several potential mechanisms. In spite that the rs5182 polymorphism is not in the coding region of the gene, this polymorphism could be in linkage disequilibrium with a nearby functional polymorphism or may result in a splice site variation that alters the function of this AGT receptor. The different participation of the rs5182 polymorphism in hypertension and in the renal function decline supports the complexity of interactions and mechanisms through which the *AGTR1* gene could participate in renal and vascular function.

In addition, intervention studies have suggested that *AGTR1* gene polymorphisms may predict the physiological response to pharmacological maneuvers. Brugts et al.<sup>19</sup> developed a genetic profile to predict the treatment benefit of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors in patients with coronary artery disease. This study included the analysis of 52 polymorphisms located in the renin–angiotensin aldosterone system (RAAS) and the kallikrein–bradykinin

pathway. Two polymorphisms located in the *AGTR1* gene were significantly associated with the treatment benefit. One of these polymorphisms was the rs5182, associated with hypertension in our study. Similar studies reported association of RAAS polymorphisms with response to ACE-inhibitor therapy.<sup>20,21</sup>

To our knowledge this is the first paper that describes the association between *AGTR1* gene polymorphisms and hypertension in the Mexican population. The *AGTR1* +573 C/T (rs5182) polymorphism was associated with the risk of developing hypertension in this population. However, our study had some limitations. First, we only studied five *AGTR1* gene polymorphisms that have been associated with hypertension in previous studies. We did not examine other polymorphisms that might be associated with this disease. Second, the findings of the study need to be validated in an independent cohort of patients. Efforts are underway to test these *AGTR1* polymorphisms in another cohort of Mexican individuals with and without hypertension.

In summary, our results suggest that the *AGTR1* +573 C/T (rs5182) gene polymorphism could be involved in the risk of developing hypertension in Mexican individuals. In our study, it was possible to identify one risk haplotype for developing hypertension. Additional studies in other populations and in other genes of the renin-angiotensin system could help to define the susceptibility markers for hypertension.

### Acknowledgments

This work was submitted in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree by Nancy L Martínez-Rodríguez at the Graduate Studies in Biomedical Sciences of the Universidad Nacional Autónoma de México. Nancy L Martínez-Rodríguez was supported by a fellowship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

The authors are grateful to the study participants. Institutional Review Board approval was obtained for all sample collections.

### Funding

This work was supported in part by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Project number 87356).

### Conflict of interest

None declared.

### References

- Collins R, Peto R, MacMahon S, et al. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2, Short-term reductions in blood pressure: overview of randomised drug trials in their epidemiological context. *Lancet* 1990; 335: 827–838.
- World Health Organization/International Society of Hypertension Guidelines for the management of hypertension. *J Hypertension* 2003; 17: 151–183.
- Schork NJ. Genetically complex cardiovascular traits. Origins, problems, and potential solutions. *Hypertension* 1997; 29: 145–149.
- Ward R. Familial aggregation and genetic epidemiology of blood pressure. In: Laragh JH, Brenner BM (eds). *Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management*. New York: Raven Press; 1995, pp. 67–68.
- Sealy JE and Laragh JH. The rennin-angiotensin-aldosterone system for normal regulation of blood pressure and sodium and potassium homeostasis. In: Laragh JH, Brenner BM (eds). *Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management*. New York: Raven Press; 1995, pp. 1763–96.
- Kim S and Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 11–34.
- Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, et al. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165: 196–203.
- Gasparo M and Bullock G. The AT1 and AT2 angiotensin receptors. In: Oparil S, Webber M (eds). *Hypertension: a companion to Brenner & Rector's The Kidney*. Philadelphia: WB Saunders Company, 2000, pp. 101–110.
- Guo D, Furuta H, Mizukoshi M and Inagami T. The genomic organization of human angiotensin II type 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 200: 313–319.
- Namazi S, Monabati A, Ardeshir-Rouhani-Fard S and Azarpira N. Association of angiotensin I converting enzyme (insertion/deletion) and angiotensin II type 1 receptor (A1166C) polymorphisms with breast cancer prognostic factors in Iranian population. *Mol Carcinog* 2010; 49: 1022–1030.
- Anbazzhagan K, Sampathkumar K, Ramakrishnan M, Gomathi P, Gomathi S and Selvam GS. Analysis of polymorphism in renin angiotensin system and other related genes in South Indian chronic kidney disease patients. *Clin Chim Acta* 2009; 406: 108–112.
- Mohamed S, Schaa K, Cooper ME, et al. Genetic contributions to the development of retinopathy of prematurity. *Pediatr Res* 2009; 65: 193–197.
- Pop D, Zdrenghea D, Procociuc LM and Popal A. Gene polymorphism of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor in patients with congestive heart failure. *Rom J Intern Med* 2007; 45: 349–354.
- Miller SA, Dykes DD and Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
- Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, et al. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension* 1994; 24: 63–69.
- Chaves FJ, Pascual JM, Rovira E, Argmengo ME and Redon J. Angiotensin II AT1 receptor gene polymorphism and microalbuminuria in essential hypertension. *Am J Hypertens* 2001; 14: 364–379.
- Zhu X, Chang YPC, Yan D, et al. Associations between hypertension and genes in the renin-angiotensin system. *Hypertension* 2003; 41: 1027–1034.

18. Israni AK, Li N, Sidhwani S, et al. Association of hypertension genotypes and decline in renal function after kidney transplantation. *Transplantation* 2007; 84: 1240–1247.
19. Brugts JJ, Isaacs A, Boersma E, et al. Genetic determinants of treatment benefit of the angiotensin-converting enzyme-inhibitor perindopril in patients with stable coronary artery disease. *Eur Heart J* 2010; 31: 1854–1864.
20. Brugts JJ, de Maat MP, Boersma E, et al. The rationale and design of the PERindopril GENETic association study (PERGENE): a pharmacogenetic analysis of angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy in patients with stable coronary artery disease. *Cardiovasc Drugs Ther* 2009; 23: 171–181.
21. Brugts JJ, Isaacs A, de Maat MP, et al. A pharmacogenetic analysis of determinants of hypertension and blood pressure response to angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy in patients with vascular disease and healthy individuals. *J Hypertens* 2011; 29: 509–519.



## Haplotypes of the angiotensin-converting enzyme (*ACE*) gene are associated with coronary artery disease but not with restenosis after coronary stenting



Marco Antonio Martínez-Ríos<sup>a</sup>, Edith Alvarez-León<sup>b</sup>, Armando Totomoch<sup>b</sup>, Javier Angeles<sup>b</sup>, Marco Antonio Peña-Duque<sup>a</sup>, Hilda Delgadillo-Rodríguez<sup>a</sup>, Nancy Martínez-Rodríguez<sup>b</sup>, Silvestre Ramírez-Fuentes<sup>b</sup>, José Manuel Fragoso<sup>b</sup>, Gilberto Vargas-Alarcón<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> *Interventional Cardiology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico*

<sup>b</sup> *Department of Molecular Biology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico*

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 June 2014

Accepted 27 June 2014

Available online 1 July 2014

#### Keywords:

Angiotensin converting enzyme

Coronary artery disease

Genetic susceptibility

Polymorphisms

Restenosis

### ABSTRACT

The aim of the present study was to establish the role of *ACE* gene polymorphisms in the risk of developing in-stent restenosis and/or coronary artery disease (CAD). Eight *ACE* gene polymorphisms were genotyped by 5' exonuclease TaqMan genotyping assays in 236 patients with CAD who underwent coronary artery stenting. Basal and procedure coronary angiographies were analyzed searching for angiographic predictors of restenosis and follow-up angiography was analyzed looking for binary restenosis. A group of 455 individuals without clinical and familial antecedents of cardiovascular diseases were included as controls. Haplotypes were constructed after linkage disequilibrium analysis. Distribution of *ACE* polymorphisms was similar in patients with and without restenosis. Similar results were observed when the analysis was made comparing the whole group of patients (with and without restenosis) and healthy controls. Six out of eight polymorphisms were in high linkage disequilibrium and were included in five haplotypes (AAAGCA, GGGATG, GAGATG, AGAGCA and AAGACA). The distribution of these haplotypes was similar in patients with and without restenosis. However, CAD patients showed an increased frequency of the AAAGCA haplotype (OR = 1.31, 95% CI: 1.04–1.66,  $P = 0.018$ ) and decreased frequencies of GAGATG (OR = 0.47, 95% CI: 0.25–0.88,  $P = 0.011$ ) and AGAGCA (OR = 0.15, 95% CI: 0.02–0.65,  $P = 0.002$ ) haplotypes when compared to healthy controls. Haplotypes of the *ACE* gene could be a genetic factor related to coronary artery disease in the Mexican individuals, but do not support its role as a risk factor for developing restenosis after coronary stenting.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Our understanding of the pathophysiology of coronary artery disease (CAD) has undergone a remarkable evolution (Libby and Theoux, 2005). The treatment strategies are the coronary artery bypass grafting, percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA) and intracoronary stenting. An important problem of these strategies is the presence of restenosis. It is well known that after PTCA, restenosis occurs in about 30% to 32% of patients, and after intracoronary stent placement in 12% to 32% of patients (Rapold et al., 1987; Serruys et al., 1994, 1998; Sigwart et al., 1987; Weiczorek and Tsongalis, 2001). Some differences exist in the mechanisms of restenosis between

conventional PTCA and stenting. Arterial remodeling is the main contributor to lumen re-narrowing after PTCA (Kooemider, 1997; Mintz et al., 1996). Neointimal hyperplasia (smooth muscle cell proliferation and extracellular matrix synthesis), rather than lumen narrowing by arterial remodeling, prevails in the restenotic process after placement of stents in coronary arteries (Hoffmann et al., 1996).

Polymorphisms in several genes have been associated with the development of restenosis after coronary stent placement. One of them is the insertion/deletion (*I/D*) polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme (*ACE*) gene. *ACE* is a key enzyme in the renin–angiotensin–aldosterone (RAAS) and kallikrein–kinin systems (Kooemider, 1997; Mintz et al., 1996). The RAAS has been implicated in the pathogenesis of neointimal hyperplasia, and a role for angiotensin II in the migration and proliferation of vascular smooth muscle cells in restenotic lesions has been proposed (Pratt and Dzau, 1996). It has been suggested that the *I/D* polymorphism could explain up to 47% of total phenotypic variation in *ACE* serum levels and determines *ACE*

\* Corresponding author at: Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", Juan Badiano No. 1, Tlalpan 14080, México D.F., México.  
E-mail address: [gvargas63@yahoo.com](mailto:gvargas63@yahoo.com) (G. Vargas-Alarcón).

**Table 1**  
ACE gene polymorphisms tested.

No. <sup>a</sup>	Polymorphism <sup>b</sup> (minor allele)	dbSNP <sup>c</sup>	Chr position (bp)	Location in gene
1.	A-239T (T)	rs4291	61,554,194	5' near region
2.	A7941G (G)	rs4318	61,562,373	Exon 13
3.	A10539G (A)	rs4335	61,565,025	Intron 16
4.	A11599G (A)	rs4343	61,566,031	Exon 17
5.	A12292G (A)	rs4344	61,566,724	Intron 18
6.	A15990G (G)	rs4353	61,570,422	Intron 20
7.	C19329T (C)	rs4362	61,573,761	Exon 25
8.	A20060G (A)	rs4363	61,574,492	Intron 24

<sup>a</sup> Order of the polymorphisms is according to the chromosomal positions.

<sup>b</sup> Given name according to NCBI.

<sup>c</sup> SNP ID in database dbSNP.

enzyme activity (Rigat et al., 1990). ACE serum levels of *D/D* homozygous individuals are reported to be twice as high as those of *I/I* homozygous individuals, while *I/D* heterozygous individuals have intermediate ACE levels (Tiret et al., 1992). It is currently believed that the *I/D* polymorphism is not directly responsible for inherited ACE serum level variation in humans (Davis and Roberts, 1997; Rigat et al., 1990; Zhu et al., 2001). Tiret et al. demonstrated that this polymorphism is in close linkage disequilibrium to at least one, and perhaps more functional polymorphisms determining the phenotypic variations of enzyme levels (Tiret et al., 1992). Still, other studies have shown loci with variants of this sequence in complete linkage disequilibrium with the *I/D* polymorphism (Rieder et al., 1999). Thus, the study of other polymorphisms in the ACE gene is mandatory in order to establish the true role of this gene in the genetic susceptibility to restenosis after coronary stenting. The objective of this study was to test for an association between ACE gene polymorphism and risk of CAD and/or restenosis after coronary stent placement in a group of Mexican patients.

## 2. Material and methods

### 2.1. Subjects

The study included 236 Mexican Mestizo patients with symptomatic CAD who underwent coronary stent implantation at our institution during the period between October 2008 and October 2013 and went to follow-up coronary angiography because of symptoms or ischemia documented in a myocardial perfusion imaging. Basal and procedure coronary angiographies were analyzed looking for angiographic predictors of restenosis and follow-up angiography looking for binary restenosis. Using a >50% stenosis at follow-up (a greater than 50% reduction in the luminal diameter of the stenosis compared with the coronary angiography findings immediately following angioplasty) as the criterion to define restenosis, there were 92 patients with restenosis and 144 without restenosis. Also, a group of 455 healthy unrelated individuals with

**Table 2**  
Baseline clinical characteristics (236 patients).

Characteristic	Patients with in-stent restenosis (n = 92)	Patients without in-stent restenosis (n = 144)	P value
Age, years, mean ± standard deviation	60.0 ± 10.6	58.8 ± 10.3	NS
Male, n (%)	74 (80.4)	111 (77.0)	NS
Arterial hypertension, n (%)	56 (60.8)	78 (54.1)	NS
Diabetes, n (%)	38 (41.3)	53 (36.8)	NS
Elevated total cholesterol, n (%)	51 (55.4)	87 (60.4)	NS
Smokers, n (%)	55 (59.7)	91 (61.4)	NS
Antecedent myocardial infarction, n (%)	37 (40.2)	74 (51.3)	NS
Acute myocardial infarction, n (%)	32 (34.7)	47 (32.6)	NS
Chronic renal failure, n (%)	6 (6.5)	7 (4.8)	NS
Unstable angina, n (%)	30 (32.6)	41 (28.4)	NS
Stable angina, n (%)	13 (14.1)	31 (21.5)	NS
Silent ischemia, n (%)	9 (9.7)	12 (8.3)	NS

NS: not significant.

**Table 3**

Angiographic characteristics of 391 treated coronary lesions in 92 patients with in-stent restenosis.

Lesion characteristic	Lesions with in-stent restenosis (n = 114)	Lesions without in-stent restenosis (n = 277)	P value
DES, n (%)	33 (28.9)	158 (57.0)	<0.001
BMS, n (%)	81 (71.0)	119 (42.9)	<0.001
Diameter of stent (<2.5 mm), n (%)	35 (30.7)	60 (21.6)	0.032
Longitude of stent (<22 mm), n (%)	63 (55.2)	166 (59.9)	NS
In ostium, n (%)	11 (9.6)	29 (10.4)	NS
Total chronic occlusion, n (%)	7 (6.1)	10 (3.6)	0.070
Bifurcation, n (%)	30 (26.3)	44 (15.8)	0.009

NS: not significant.

DES: drug-eluting stent.

BMS: bare-metal stent.

neither symptoms nor previous diagnosis of cardiovascular or systemic disease was studied as the control group. All included subjects (patients and controls) were ethnically matched, and we considered as Mexican Mestizos only those individuals who had been born in Mexico for three generations, including their own. The Institutional Ethics and Research Committee approved the study, and all subjects signed informed consent.

### 2.2. Genetic analysis

Genomic DNA from whole blood containing EDTA was isolated by standard techniques (Miller, 1998). The A-239T (rs4291), A7941G (rs4318), A10539G (rs4335), A11599G (rs4343), A12292G (rs4344), A15990G (rs4353), C19329T (rs4362), and A20060G (rs4363) single nucleotide polymorphisms (SNPs) were genotyped using 5' exonuclease TaqMan genotyping assays on an ABI Prism 7900HT Fast Real-Time PCR system, according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Table 1).

### 2.3. Statistical analysis

Gene frequencies of ACE polymorphisms were obtained by direct counting. Hardy–Weinberg equilibrium was evaluated by  $\chi^2$  test. All calculations were performed using SPSS version 18.0 (SPSS, Chicago, IL) statistical package. Means ± SD and frequencies of baseline characteristics were calculated. Chi-square tests were used to compare frequencies and ANOVA and Students t-test were used to compare means. Logistic regression analysis was used to test for associations of polymorphisms with CAD and restenosis under six inheritance models: codominant 1, codominant 2, dominant, recessive, heterozygous advantage and additive. Pairwise linkage disequilibrium (LD,  $D'$ ) estimations between polymorphisms

and haplotype reconstruction were performed with Haploview version 4:1 (Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology and Harvard University, Cambridge, MA, USA).

#### 2.4. Functional prediction analysis

We predicted the potential effect of the *ACE* polymorphisms using bioinformatics tools, including FastSNP (Yuan et al., 2006), SNP Function Prediction (<http://snpinfo.nih.gov/snpfunc.htm>), Human-transcriptome DataBase for Alternative Splicing (<http://www.h-invitational.jp/h-dbas/>), SplicePort: An Interactive Splice Site Analysis

Tool (<http://www.spliceport.cs.umd.edu/SplicingAnalyser2.html>), and SNPs3D (<http://www.snps3d.org/>).

### 3. Results

#### 3.1. Characteristics of the study sample

Baseline characteristics of the CAD patients included in the study are shown in Table 2. There were no significant differences between patients with and without restenosis with regard to age, gender, diabetes, hypertension, elevated total cholesterol, smoking habit, antecedent of myocardial infarction, chronic renal failure, and type of angina. Table 3

**Table 4**  
Association of *ACE* polymorphisms in patients with and without restenosis.

Genotype frequency	Genotype frequency			MAF	Model	OR (95% CI)	P value
	A/A	A/T	T/T				
<i>ACE</i> rs4291							
Without ISR (n = 144)	69 (0.48)	67 (0.47)	8 (0.06)	0.29	Codominant 1	0.73 (0.42–1.27)	0.35
With ISR (n = 92)	49 (0.53)	35 (0.38)	8 (0.09)	0.28	Codominant 2	1.41 (0.49–4.02)	0.35
					Dominant	0.80 (0.48–1.36)	0.42
					Recessive	1.62 (0.59–4.50)	0.35
					Heterozygous adv	0.70 (0.41–1.20)	0.19
					Additive	0.94 (0.62–1.44)	0.78
<i>ACE</i> rs4335							
Without ISR (n = 144)	50 (0.35)	74 (0.51)	20 (0.14)	0.4	Codominant 1	0.89 (0.50–1.57)	0.92
With ISR (n = 92)	34 (0.37)	45 (0.49)	13 (0.14)	0.39	Codominant 2	0.96 (0.42–2.18)	0.92
					Dominant	0.90 (0.52–1.56)	0.71
					Recessive	1.03 (0.48–2.18)	0.95
					Heterozygous adv	0.90 (0.53–1.52)	0.69
					Additive	0.95 (0.64–1.41)	0.82
<i>ACE</i> rs4343							
Without ISR (n = 144)	55 (0.38)	71 (0.49)	18 (0.12)	0.37	Codominant 1	0.81 (0.46–1.42)	0.76
With ISR (n = 92)	39 (0.42)	41 (0.45)	12 (0.13)	0.35	Codominant 2	0.94 (0.41–2.19)	0.76
					Dominant	0.84 (0.49–1.43)	0.51
					Recessive	1.06 (0.48–2.32)	0.89
					Heterozygous adv	0.82 (0.48–1.39)	0.46
					Additive	0.92 (0.62–1.36)	0.68
<i>ACE</i> rs4344							
Without ISR (n = 144)	47 (0.33)	77 (0.53)	20 (0.14)	0.41	Codominant 1	0.85 (0.47–1.52)	0.65
With ISR (n = 92)	32 (0.35)	44 (0.48)	16 (0.17)	0.41	Codominant 2	1.19 (0.53–2.64)	0.65
					Dominant	0.92 (0.53–1.60)	0.76
					Recessive	1.31 (0.64–2.70)	0.46
					Heterozygous adv	0.80 (0.47–1.36)	0.41
					Additive	1.04 (0.70–1.53)	0.86
<i>ACE</i> rs4353							
Without ISR (n = 144)	20 (0.14)	78 (0.54)	46 (0.32)	0.41	Codominant 1	0.86 (0.48–1.55)	0.67
With ISR (n = 92)	16 (0.17)	45 (0.49)	31 (0.34)	0.42	Codominant 2	1.20 (0.54–2.67)	0.67
					Dominant	0.93 (0.53–1.62)	0.79
					Recessive	1.31 (0.64–2.70)	0.46
					Heterozygous adv	0.81 (0.48–1.37)	0.44
					Additive	1.04 (0.71–1.55)	0.83
<i>ACE</i> rs4362							
Without ISR (n = 144)	49 (0.34)	75 (0.52)	20 (0.14)	0.4	Codominant 1	0.79 (0.45–1.41)	0.71
With ISR (n = 92)	35 (0.38)	43 (0.47)	14 (0.15)	0.39	Codominant 2	0.97 (0.43–2.18)	0.71
					Dominant	0.83 (0.48–1.43)	0.5
					Recessive	1.11 (0.53–2.32)	0.79
					Heterozygous adv	0.80 (0.47–1.35)	0.41
					Additive	0.93 (0.63–1.38)	0.73
<i>ACE</i> rs4363							
Without ISR (n = 144)	48 (0.33)	78 (0.54)	18 (0.12)	0.4	Codominant 1	0.77 (0.43–1.37)	0.49
With ISR (n = 92)	34 (0.37)	43 (0.47)	15 (0.16)	0.4	Codominant 2	1.16 (0.51–2.64)	0.49
					Dominant	0.84 (0.49–1.46)	0.54
					Recessive	1.36 (0.65–2.87)	0.42
					Heterozygous adv	0.74 (0.43–1.25)	0.25
					Additive	1.00 (0.67–1.48)	0.99

The rs4318 was not included in the analysis because one genotype (GG) was not observed.

ISR: intra stent restenosis.

OR: odds ratio.

CI: confidence intervals.

MAF: minor allele frequency.

shows the angiographic characteristics of the treated coronary lesions ( $n = 391$  lesions). As expected, the lesions of patients who underwent coronary bare-metal stent (BMS) implantation develop more restenosis (71.0%) than those of the patients who underwent drug-eluting stent (DES) implantation (28.9%) ( $P < 0.001$ ). Also, those lesions treated with stents with a diameter  $< 2.5$  mm ( $P = 0.032$ ) and located in a bifurcation presented more restenosis ( $P = 0.009$ ).

### 3.2. Allele and genotype frequencies

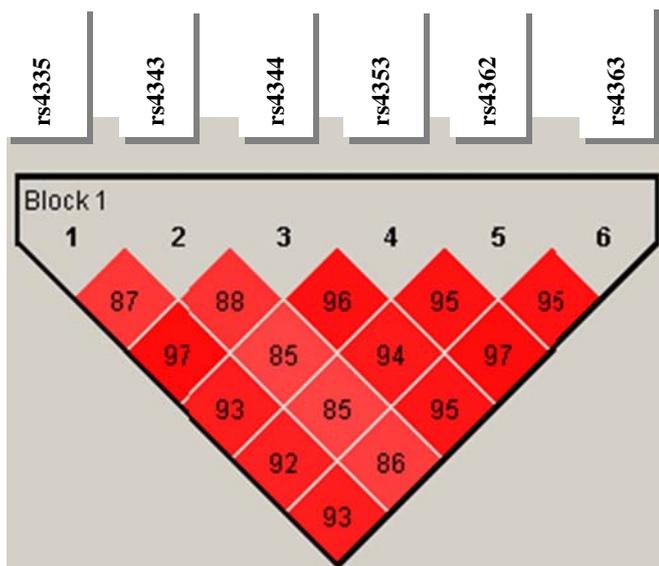
Observed and expected frequencies in the *ACE* polymorphisms were in Hardy–Weinberg equilibrium. Distribution of *ACE* polymorphisms was similar in patients with and without restenosis (Table 4). The same was observed when the distribution of *ACE* polymorphisms was analyzed comparing the whole group of patients (with and without restenosis) with the healthy controls (data not shown). Six *ACE* polymorphisms were in strong linkage disequilibrium with  $D'$  values  $> 0.9$  (Fig. 1) forming 5 different haplotypes, H1 (AAAGCA), H2 (GGGATG), H3 (GAGATG), H4 (AGAGCA), and H5 (AAGACA). The distribution of these haplotypes was similar in patients with and without restenosis, however, was different in patients with CAD and healthy controls. The H1 (AAAGCA) haplotype was associated with increased risk (OR = 1.31, 95% CI: 1.04–1.66,  $P = 0.018$ ), while the H3 (GAGATG) and H4 (AGAGCA) haplotypes were associated with decreased risk of CAD (OR = 0.47, 95% CI: 0.25–0.88,  $P = 0.011$  and OR = 0.15, 95% CI: 0.02–0.65,  $P = 0.002$ ) (Table 5).

### 3.3. SNP function prediction

Based on SNP functional prediction software programs, only the rs4335, rs4353, and rs4363 polymorphisms seem to be functional. The variation in these polymorphisms affects the DNA binding of the transcription factors AML-1, GATA-1, and Srp40, respectively.

## 4. Discussion

It has been suggested that angiotensin-converting enzyme (ACE) may play an important role in restenosis after coronary angioplasty



**Fig. 1.** Haploview linkage disequilibrium graph of six *ACE* gene polymorphisms (rs4335, rs4343, rs4344, rs4353, rs4362, rs4363). Pairwise linkage disequilibrium coefficients  $D' \times 100$  are shown in each cell. Standard color scheme of haploview was applied for linkage disequilibrium color display [logarithm of odds (LOD) score  $\geq 2$  and  $D' = 1$ , shown in bright red; LOD score  $\geq 2$  and  $D' < 1$  shown in light red; LOD score  $\leq 2$  and  $D' < 1$  shown in white]. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

**Table 5**

*ACE* haplotype frequencies in CAD patients and healthy controls.

Frequencies				
Haplotype	Patients	Controls	OR (95% CI)	P value
<i>Block (rs4335, rs4343, rs4344, rs4353, rs4362, rs4363)</i>				
H1 (AAAGCA)	0.578	0.511	1.31 (1.04–1.66)	0.018
H2 (GGGATG)	0.349	0.320	1.14 (0.89–1.45)	NS
H3 (GAGATG)	0.029	0.062	0.47 (0.25–0.88)	0.011
H4 (AGAGCA)	0.003	0.028	0.15 (0.02–0.65)	0.002
H5 (AAGACA)	0.003	0.028	0.87 (0.26–2.72)	NS

NS: not significant.

OR: odds ratio.

CI: confidence intervals.

through the proliferation of vascular smooth muscle cells by production of angiotensin II and inhibition of bradykinin (Itoh et al., 1993). For this mechanism, the ACE has also been associated with the development of CAD. The *I/D* polymorphism located in the gene that encodes this enzyme has been associated with the risk of developing restenosis, myocardial infarct, coronary heart disease or other cardiovascular pathology in several populations. The results of these studies have been contradictory with positive and negative associations. However, it is important to consider that all studies have focused only on the study of the *I/D* polymorphism. In a previous study by our group, we reported the association of the *I/D* polymorphism with CAD but not with restenosis (Martínez-Ríos et al., 2008). As was commented, the study by Tiret et al. (1992) demonstrated that the *I/D* polymorphism is in close linkage disequilibrium to at least one, and perhaps more functional polymorphisms. On the other hand, at the present time other polymorphisms in the *ACE* gene have been reported. With this information, we considered it important to analyze the effect of these other polymorphisms in the risk of developing restenosis and/or CAD. We selected 8 polymorphisms considering a previous study in which *ACE* haplotypes were described in African-American and European-American populations (Zhu et al., 2003). Population linkage disequilibrium block differences were observed, as haplotypes were shorter and more diverse in Africans, while Europeans had longer and fewer haplotypes. This suggests that different linkage disequilibrium of the polymorphisms located in the *ACE* gene can be observed in other populations. On the other hand, the length of the genomic segment covered by the polymorphisms included in our study is 21 kb, increasing the possibility to detect some association with restenosis or CAD. None of the 8 polymorphisms analyzed independently was associated with restenosis or CAD in our group of patients. According to linkage disequilibrium analysis, six out of eight polymorphisms studied (rs4335, rs4343, rs4344, rs4353, rs4362 and rs4363) were in high linkage disequilibrium and five haplotypes were constructed, one of them associated with risk (H1: AAAGCA) and two associated with protection (H3: GAGATG and H4: AGAGCA) for CAD. No association of these haplotypes was observed when CAD patients with and without restenosis were compared. According to the bioinformatics tools, three (rs4335, rs4353 and rs4363) polymorphisms included in these haplotypes have a potential functional effect, generating DNA binding sites for the AML-1, GATA-1, and Srp40 transcription factors. The presence of specific alleles in these polymorphisms could result in loss (or reduction) of DNA binding of these transcriptional factors with important consequences in the expression of the enzyme. However, the predicted functional consequences of these polymorphisms using informatics tools need to be corroborated by experimental evidence.

In summary, our data suggest that haplotypes of the *ACE* gene could be a genetic factor related with the susceptibility to CAD, but do not support its role as a risk factor for developing restenosis after coronary stenting. In our study, it was possible to identify one risk and two protective haplotypes for CAD. Mexicans is a population with characteristic genetic background and important differences with other populations (Juárez-Cedillo et al., 2008; Lisker et al., 1986, 1988, 1990). Due to

these genetic characteristics of the Mexican population, we considered that the association of the *ACE* haplotypes with CAD detected in our study should be explored in other populations.

#### Author disclosure statement

No competing financial interests exist.

#### Acknowledgments

This work was supported in part by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (project number 182962), Mexico City, Mexico. The authors are grateful to the study participants. Institutional Review Board approval was obtained for all sample collections.

#### References

- Davis, G.K., Roberts, D.H., 1997. Molecular genetics of the renin-angiotensin system: implications for angiotensin II receptor blockade. *Pharmacol. Ther.* 75, 43–50.
- Hoffmann, R., Mintz, G.S., Dussailant, G.R., et al., 1996. Patterns and mechanisms of in-stent restenosis. A serial intra-vascular ultrasound study. *Circulation* 94, 1247–1254.
- Itoh, H., Mukoyama, M., Pratt, R.E., Gibbons, G.H., Dzau, V.J., 1993. Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *J. Clin. Invest.* 91, 2268–2274.
- Juárez-Cedillo, T., Zuñiga, J., Acuña-Alonzo, V., et al., 2008. Genetic admixture and diversity estimations in the Mexican Mestizo population from Mexico City using 15 STR polymorphic markers. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2, e37–e39.
- Kooemider, M., 1997. Coronary stent implantation results in patients treated with ticlopidine and aspirin. *Med. Sci. Monit.* 3, 821–825.
- Libby, P., Theorix, P., 2005. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 111, 3481–3488.
- Lisker, R., Perez-Briceño, R., Granados, J., et al., 1986. Gene frequencies and admixture estimates in a Mexico City population. *Am. J. Phys. Anthropol.* 71, 203–207.
- Lisker, R., Pérez-Briceno, R., Granados, J., Babinsky, V., 1988. Gene frequencies and admixture estimates in the state of Puebla, Mexico. *Am. J. Phys. Anthropol.* 76, 331–335.
- Lisker, R., Ramirez, E., Briceño, R.P., Granados, J., Babinsky, V., 1990. Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican urban centers. *Hum. Biol.* 62, 791–801.
- Martínez-Ríos, M.A., Peña-Duque, M.A., Fragoso, J.M., et al., 2008. No association found between the insertion/deletion of a 287-bp alu repeat sequence within intron 16 of the angiotensin-I-converting enzyme (*ACE*) gene in Mexican patients and binary restenosis after coronary stenting. *Clin. Chim. Acta* 397, 65–67.
- Miller, A., 1998. A single salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cell. *Nucleic Acids Res.* 16, 1215–1217.
- Mintz, G.S., Popma, J.J., Phicard, A.D., et al., 1996. Arterial remodeling after coronary angioplasty: a serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 94, 35–43.
- Pratt, R.E., Dzau, V.J., 1996. Pharmacological strategies to prevent restenosis: lessons learned from blockade of the renin-angiotensin system. *Circulation* 93, 848–852.
- Rapold, H.J., David, P.R., Guiteras Val, P., Mata, A.L., Crean, P.A., Bourassa, M.G., 1987. Restenosis and its determinants in first and repeat coronary angioplasty. *Eur. Heart J.* 8, 575–586.
- Rieder, M.J., Taylor, S.L., Clark, A.G., Nikerson, D.A., 1999. Sequence variation in the human angiotensin converting enzyme. *Nat. Genet.* 22, 59–62.
- Rigat, B., Hubert, C., Alhenc-Gelas, F., et al., 1990. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme level. *J. Clin. Invest.* 359, 641–647.
- Serruys, P.W., de Jaegere, P., Kiemeneij, F., et al., 1994. A comparison of balloon-expandable stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *N. Engl. J. Med.* 331, 489–495.
- Serruys, P.W., van Hout, B., Bonnier, H., et al., 1998. Randomised comparison of implantation of heparin-coated stents with balloon angioplasty in selected patients with coronary artery disease (Benestent II). *Lancet* 352, 673–681.
- Sigwart, U., Peul, J., Mirkovitch, V., et al., 1987. Intravascular stent to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty. *N. Engl. J. Med.* 316, 701–706.
- Tiret, L., Rigat, B., Visvikis, S., et al., 1992. Evidence from combined segregation and linkage analysis, that a variance of the angiotensin I-converting enzyme (*ACE*) gene controls plasma *ACE* levels. *Am. J. Hum. Genet.* 51, 197–205.
- Weiczorek, S.J., Tsongalis, G.J., 2001. Pharmacogenomics: will it change the field of medicine? *Clin. Chim. Acta* 308, 1–8.
- Yuan, H.Y., Chiou, J.J., Tseng, W.H., et al., 2006. FASTSNP: an always up-to-date and extendable service for SNP function analysis and prioritization. *Nucleic Acids Res.* 34 ((Web Server issue): W635–41. Accessed 2012).
- Zhu, X., Bouzekri, N., Southam, L., et al., 2001. Linkage and association analysis of angiotensin I-converting enzyme (*ACE*)-gene polymorphisms with *ACE* concentration and blood pressure. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 1139–1148.
- Zhu, X., Yan, D., Cooper, R.S., et al., 2003. Linkage disequilibrium and haplotype diversity in the genes of the renin-angiotensin system: findings from the family blood pressure program. *Genome Res.* 13, 173–181.