



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO DE LOS GENES
APLN, APLNR Y MTHFR CON LA PRESENCIA DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL
ESENCIAL EN MUJERES MESTIZAS YUCATECAS POSTMENOPÁUSICAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ALCÁNTARA BLANCARTE JENNIFER

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA, IPN

COMITÉ TUTOR: DRA. SANDRA DÍAZ-BARRIGA ARCEO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
DR. JUAN PABLO MÉNDEZ BLANCO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., ABRIL, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Lic. Ivonne Ramirez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 13 de febrero de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **ALCÁNTARA BLANCARTE JANNIFER** con número de cuenta **302000067**, con la tesis titulada **"ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO DE LOS GENES APLN, APLNR Y MTHFR CON LA PRESENCIA DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL ESENCIAL EN MUJERES MESTIZAS YUCATECAS POSTMENOPÁUSICAS"**, realizada bajo la dirección del **DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ**.

Presidente: DR. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS
Vocal: DRA. ILEANA PATRICIA CANTO CETINA
Secretario: DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO
Suplente: DR. GILBERTO VARGAS ALARCÓN
Suplente: DR. JUAN PABLO MÉNDEZ BLANCO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 16 de marzo de 2017

M del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Beca CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología)

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.
Número: 2011-C01-161909

Tutor Principal: Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez

Comité Tutorial: Dra. Sandra Díaz-Barriga Arceo
Dr. Juan Pablo Méndez Blanco

Agradecimientos a título personal

Dra. Thelma Elena Canto Cetina, Laboratorio de Biología de la Reproducción, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", Universidad Autónoma de Yucatán.

Sección Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina-IPN.

Unidad de Investigación en Obesidad, Facultad de Medicina-UNAM.

Clínica de Obesidad, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán.

Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE. División de Investigación Biomédica. Laboratorio de Biomedicina Traslacional.

A Dios a quien debo mi completa existencia y todo lo que tengo.

A mis padres por darme la vida, por su amor y por apoyarme siempre incondicionalmente.

A mis hermanas y hermanos por todo su apoyo, motivación, paciencia y comprensión, pero sobre todo por su amor.

A Carla Angulo Rojo porque me convenció de ser investigadora.

A mis todos mis amigos por estar a mi lado.

A Lázaro por explicarme la estadística que es tan difícil.

Al Dr. Juan Pablo Méndez Blanco por ser parte de mi comité tutorial.

A la Dra. Sandra Díaz por ser una maestra excelente, por aclararme el camino y ser parte de mi comité tutorial.

Y en especial a mi tutor, el Dr. Ramón Coral, por creer en mí, por aceptarme en su equipo de trabajo, por toda su paciencia, por enseñarme lo que es ser un buen investigador.

Y los personajes que me inspiraron:

Francis Bacon (1561-1626). “Poca ciencia aleja muchas veces de Dios y mucha ciencia siempre conduce a Él”.

Charles Darwin (1809-1882). “Jamás he negado la existencia de Dios. Pienso que la Teoría de la Evolución es totalmente compatible con la fe en Dios. El argumento máximo de la existencia de Dios me parece es la imposibilidad de demostrar y comprender que el Universo inmenso, sobre toda medida, y el hombre, hayan sido frutos del azar”.

Thomas Alva Edison (1847-1931). “Mi máximo respeto y mi máxima admiración por todos los ingenieros, especialmente al mayor de todos: Dios”.

Albert Einstein (1879-1955). “El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la Ciencia logra abrir”.

Francis Collins (1950-). “Soy científico y creyente. No encuentro conflicto alguno entre estas dos visiones del mundo. Estoy convencido de que al descubrir el Genoma Humano, vislumbré el trabajo de Dios”.

San Josemaría Escrivá de Balaguer (1902-1975). “Una hora de estudio, para un apóstol moderno, es una hora de oración”.

Dedicatoria

Dedico mi trabajo a Dios, a mis padres y a toda mi familia.

ÍNDICE

Contenido	Página
I. Índice de tablas	i
II. Índice de figuras	ii
III. Abreviaturas	iii
IV. Resumen	1
V. Abstract	3
1. Introducción	5
1.1 Definición, clasificación y diagnóstico	9
1.2 Relevancia	12
2. Antecedentes	13
2.1 Relación con la menopausia	14
2.2 Genes asociados	16
3. Justificación	23
4. Objetivos	24
5. Hipótesis	25
6. Metodología	25
6.1 Diseño de la investigación	25
6.2 Criterios de selección	26
6.3 Cálculo del tamaño de muestra	28
6.4 Consideraciones éticas	29
6.5 Asignación de hipertensión arterial	29
6.6 Extracción de DNA	31
6.7 Dilución de DNA	32
6.8 Integridad de DNA	33
6.9 Genotipificación	33
6.10 Equilibrio de Hardy-Weinberg	35
6.11 Tratamiento estadístico	36
7. Resultados	37

7.1	Características bioquímicas y demográficas de la población	38
7.2	Concentración e integridad del DNA	39
7.3	Genotipificación	40
7.4	Equilibrio de Hardy-Weinberg	40
7.5	Frecuencias genotípicas, frecuencias alélicas y razón de Momios	41
7.6	Desequilibrio de ligamiento y haplotipos	43
7.7	Nuevo cálculo del tamaño de muestra	44
7.8	Comparación con otras poblaciones	45
8.	Discusión	48
9.	Conclusiones	56
10.	Literatura citada	57

I. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Contenido	Página
Tabla 1.	Clasificación de la presión arterial para adultos acorde al JNC7	30
Tabla 2.	Mezcla de reacción para discriminación alélica por PCR en tiempo real con Sondas Taqman	34
Tabla 3.	Condiciones de reacción para la PCR en tiempo real en el equipo Light Cyclor 480	35
Tabla 4.	Parámetros bioquímicos y demográficos de las poblaciones estudiadas.	38
Tabla 5.	Equilibrio de Hardy-Weinberg de las poblaciones estudiadas	41
Tabla 6.	Asociación de los polimorfismos de estudio con hipertensión arterial esencial en mujeres mestizas yucatecas postmenopáusicas	42
Tabla 7.	Desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos de los genes APLN, APLN y MTHFR	44
Tabla 8.	Asociación de los haplotipos de los genes APLN, APLNR y MTHFR con la presencia de hipertensión arterial esencial en mujeres mestizas yucatecas postmenopáusicas	44
Tabla 9.	Cálculo del tamaño de muestra y poder estadístico	45
Tabla 10.	Asociación del polimorfismo rs1801133 del gen MTHFR con hipertensión arterial en diferentes poblaciones mundiales	46
Tabla 11.	Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos rs13306560 y rs1801133 del gen MTHFR en dos diferentes poblaciones mexicanas	46
Tabla 12.	Asociación de los polimorfismos rs7119375 y rs10501367 del gen APLNR con hipertensión arterial esencial en dos diferentes poblaciones mexicanas	48

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Contenido	Página
Figura 1.	Prevalencia de hipertensión arterial en México en mayores de 20 años por sexo, en los años 2000, 2006 y 2012	6
Figura 2.	Distribución de los casos de hipertensión arterial en México por sexo en diferentes grupos de edad	7
Figura 3.	Prevalencia de hipertensión arterial en mayores de 20 años por entidad federativa, 2000 y 2012	9
Figura 4.	Sistema apelinérgico	17
Figura 5.	Localización de los genes APLN, APLNR y polimorfismos asociados a la presencia de hipertensión arterial esencial	19
Figura 6.	Localización del gen MTHFR y polimorfismos asociados a la presencia de hipertensión arterial esencial	20
Figura 7.	Vía metabólica de la degradación de metionina	22
Figura 8.	Gel de integridad de DNA	39
Figura 9.	Genotipificación de diversas muestras para el polimorfismo rs10501367 por PCR en tiempo real	40
Figura 10.	Frecuencias alélicas del polimorfismo rs1801133 en todo el mundo	47

III. ABREVIATURAS

AHA	Asociación Americana del Corazón (siglas en inglés)
APLN	Apelina
APLNR	Receptor de apelina
APP	Antecedentes personales patológicos
DL	Desequilibrio de ligamiento
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
HDL	Lipoproteínas de alta densidad (siglas en inglés)
HT	Hipertensión arterial
IC	Intervalo de confianza
IMC	Índice de masa corporal
ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado
LDL	Lipoproteínas de baja densidad (siglas en inglés)
µL	Microlitros
mM	Milimolar
MTHFR	Metilentetrahidrofolato reductasa
NaCl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramo
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	Razón de Momios (Odds ratio en inglés)
rpm	Revoluciones por minuto
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SDS	Duodecilsulfato sódico
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
TBE	Tris-Borato-EDTA
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad (siglas en inglés)

IV. RESUMEN

En el mundo, las enfermedades cardiovasculares son responsables de cerca de 17 millones de muertes al año. La hipertensión arterial (HT) se define como una presión sistólica igual o superior a 140 mmHg y una presión arterial diastólica igual o mayor de 90 mmHg. La HT es el principal factor de riesgo de morbilidad y mortalidad por enfermedad cardiovascular en las mujeres postmenopáusicas, afectando aproximadamente al 60% de las mujeres mayores de 65 años de edad.

La deficiencia de estrógenos está asociada con una alteración del endotelio, ya que producen sustancias que regulan la expansión y contracción de los vasos. Recientemente, los genes de APLN y su receptor APLNR se han relacionado con enfermedades cardiovasculares como la insuficiencia cardíaca crónica y trastornos metabólicos relacionados con HT. Del mismo modo, hay varios SNPs y estudios de asociación en el gen MTHFR y la presencia de HT.

El objetivo del presente trabajo es analizar si algunos SNPs y/o haplotipos en los genes de APLN, APLNR y MTHFR se asocian con la presencia de HT esencial en mujeres mestizas yucatecas postmenopáusicas. El análisis de los polimorfismos se realizó mediante la técnica de discriminación alélica por RT-PCR con sondas de hidrólisis de acuerdo con el sistema PCR allelic discrimination TaqMan assays. Se utilizó un modelo estadístico de regresión logística multinomial para determinar la asociación de los SNPs con la HT esencial.

En ninguno de los SNPs bajo varios modelos de herencia (dominante, recesivo y aditivo) encontramos asociación de éstos con la presencia de HT esencial

(p-valor > 0,05). Del mismo modo, el poder estadístico alcanzado fue insuficiente (<0,8). Sin embargo, en el caso del SNP rs1801133 SNP del gen MTHFR, el valor de p está muy cerca de ser significativo ($p = 0,051$) en un modelo de herencia dominante, por lo que se podría especular una asociación de este SNP como factor de riesgo para padecer hipertensión arterial esencial (OR = 1,76); o en contraste con el modelo recesivo, como factor protector (OR = 0,569). Es de destacar que este mismo polimorfismo se ha asociado como factor de protección en la población mestiza-mexicana.

En conclusión, se necesita un tamaño de muestra mucho mayor para encontrar una asociación verdadera y confiable entre el SNP con la presencia de hipertensión arterial esencial en mujeres mestizas yucatecas postmenopáusicas.

V. ABSTRACT

In the world, cardiovascular diseases are responsible for about 17 million deaths per year. Hypertension (HT) is defined as a systolic pressure equal or higher than 140 mmHg and a diastolic blood pressure equal or higher than 90 mmHg. HT is the main risk factor for morbidity and mortality from cardiovascular disease in postmenopausal women, affecting approximately 60% of those over 65 years old.

Estrogen deficiency is associated with impaired endothelium, because they produce substances that regulate the expansion and contraction of the vessels. Recently, genes as APLN and its APLNR receptor have been linked with cardiovascular diseases such as chronic heart failure and metabolic disorders related to HT. Likewise, there are several SNPs and association studies in the MTHFR gene and the presence of HT.

Our objective is to analyze whether some SNPs and/or haplotypes in APLN, APLNR and MTHFR genes are associated with the presence of essential HT in postmenopausal Yucatecan Mestizo women. The methodology that we did: the polymorphism analysis was performed using the technique PCR TaqMan Allelic Discrimination Assays. A statistical model of multivariate logistic regression was used to identify predictors of essential HT.

As results, in none of the SNPs and under several inheritance model (dominant, recessive and additive) we found association of these with the presence of essential HT (p -value > 0.05). Likewise, reached statistical power was insufficient

(< 0.8). In spite of, in the case of SNP rs1801133 of the MTHFR gene, the p-value is very close to being significant ($p = 0.051$) in a dominant inheritance model, so we could speculate an association of this SNP as a risk factor for have essential hypertension (OR = 1.76); in contrast to the recessive model, which seems to be protective factor (OR = 0.569). It is noteworthy that this same polymorphism has been associated as a protective factor in Mexican Mestizo population.

Finally, we can conclude that it needs to increase the sample size to certainly find an association of SNPs with the presence of essential hypertension in postmenopausal Yucatecan Mestizo women.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades no transmisibles, como las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, la diabetes, las enfermedades pulmonares crónicas y la hipertensión arterial (HT), han superado a las enfermedades infecciosas como principales causas de mortalidad en el mundo (OMS, Información general sobre la hipertensión en el mundo. 2013). Fomentar la sensibilización pública es clave, como lo es el acceso a la detección temprana.

La HT rara vez produce síntomas en las primeras etapas y en muchos casos no se diagnostica. La detección temprana, el tratamiento apropiado y el control de la hipertensión arterial producen importantes beneficios sanitarios y de índole económica (OMS, Información general sobre la hipertensión en el mundo. 2013).

En el mundo, las enfermedades cardiovasculares son responsables de aproximadamente 17 millones de muertes por año, casi un tercio del total (OMS, Información general sobre la hipertensión en el mundo. 2013). Entre ellas, las complicaciones de la HT causan anualmente 9.4 millones de muertes (Lim et al., 2012).

En los países de ingresos bajos y medios la HT es más prevalente, esto se debe probablemente a que el número de habitantes de esos países es mayor que el de los países de ingresos elevados. Además, a causa de la debilidad de los sistemas de salud, el número de personas hipertensas sin diagnóstico, tratamiento ni control de la enfermedad también es más elevado (OMS, Información general sobre la hipertensión en el mundo. 2013).

Sin embargo, hay otros factores de riesgo relacionados con la creciente prevalencia de la HT, como son el envejecimiento de la población, una dieta inadecuada, el exceso en el consumo del alcohol, la inactividad física, el sobrepeso o la exposición prolongada al estrés (OMS, Información general sobre la hipertensión en el mundo. 2013).

En México, esta enfermedad ha sido caracterizada epidemiológicamente gracias a las encuestas nacionales de salud. La prevalencia actual muestra una ligera tendencia a la baja en ambos sexos durante el periodo 2000-2006. Sin embargo, entre 2006 y 2012 la prevalencia de HT parece que se ha mantenido constante al registrar 31.3% en 2006 y 30.2% en 2012 (Figura 1); y esta condición es más frecuente en hombres que en mujeres (Figura 2) (Secretaría de Salud, Gobierno de México. Informe la salud de los mexicanos 2015).

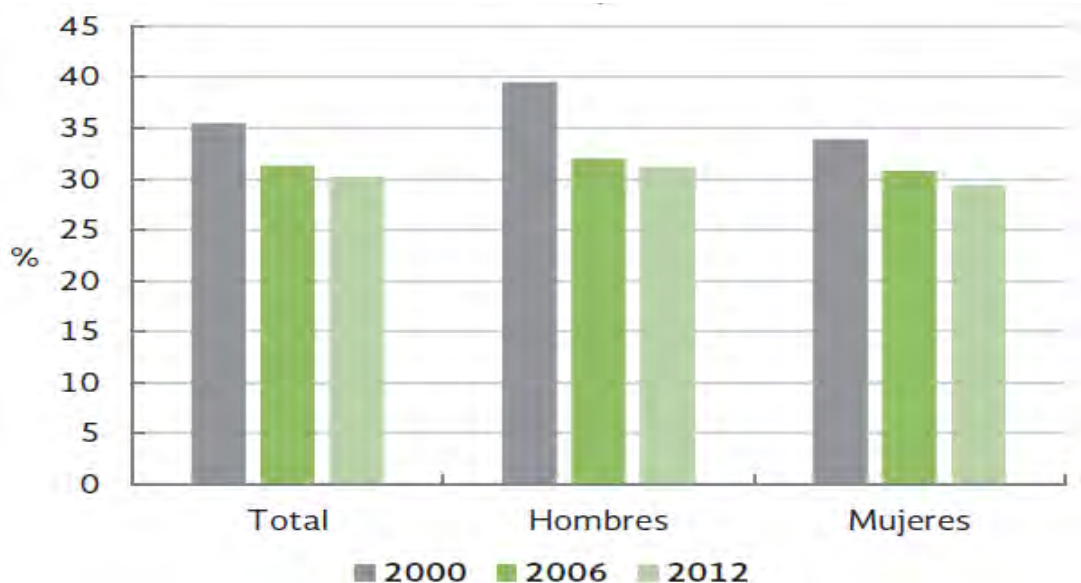


Figura 1. Se observa la prevalencia de hipertensión arterial en México en mayores de 20 años por sexo, en los años 2000, 2006 y 2012. Referencia: Secretaría de Salud, Gobierno de México. Informe la salud de los mexicanos 2015. http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/64176/INFORME_LA_SALUD_DE_LOS_MEXICANOS_2015_S.pdf

En el 2012, la prevalencia de HT en México era más alta en adultos con obesidad (42.3%) que en adultos con IMC normal (18.5%), en adultos con diabetes (65.6%) que sin esta enfermedad (27.6%); y del 100% de adultos hipertensos 47.3% desconocía que padecía HT (ENSANUT 2012).

Al igual que la diabetes, la prevalencia de la HT aumenta con la edad. En el grupo de 20 a 29 años en 2012, la prevalencia fue de 12.7% y ascendió hasta 58.3% en el grupo de 60 años o más (Figura 2).

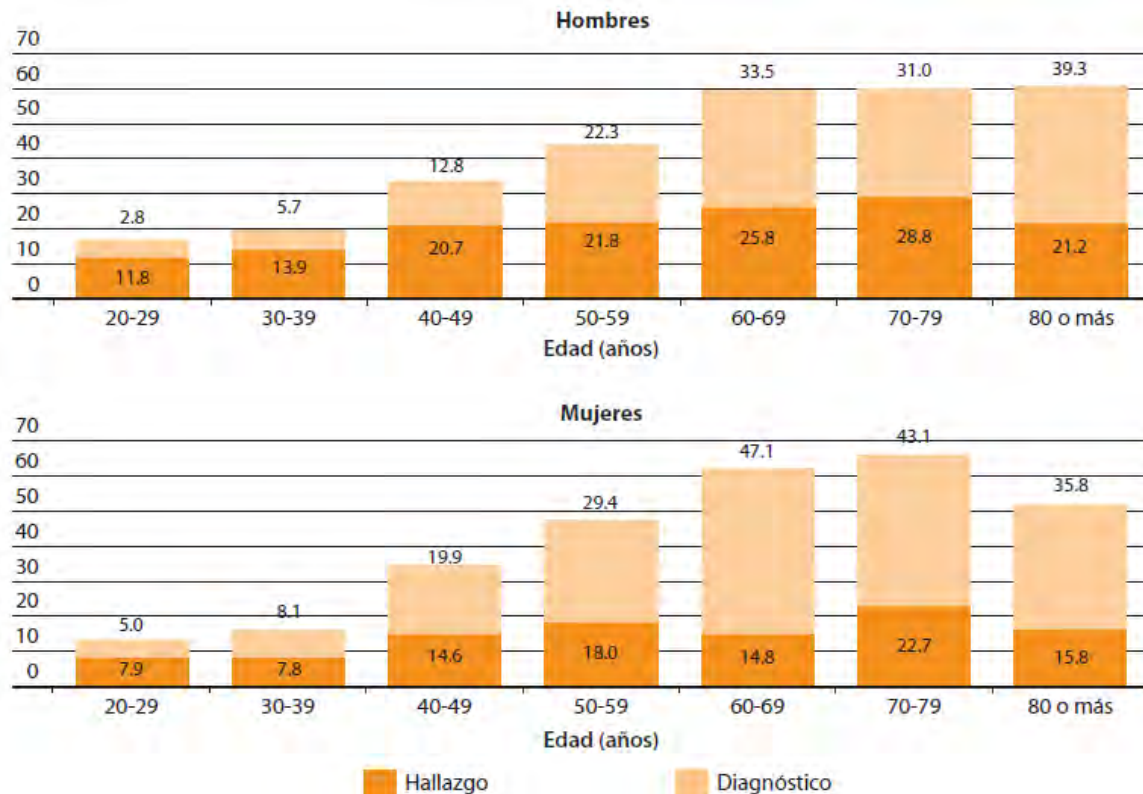


Figura 2. Distribución de los casos de hipertensión arterial en México por sexo en diferentes grupos de edad. El diagnóstico de hipertensión arterial es acorde con la clasificación del JNC-7. El número dentro de la barra se refiere al diagnóstico realizado durante la encuesta. Referencia: ENSANUT 2012. <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>

La prevalencia de HT varía de acuerdo con regiones, localidades y nivel socioeconómico, y esto pudo ser observado en la ENSANUT 2012 donde se registró una prevalencia significativamente más alta ($p < 0.05$) en la región norte del país (36.4%) que en el sur (28.5%).

Los adultos con mayor vulnerabilidad y pobreza presentan prevalencias más bajas de HT en el ámbito nacional y son los grupos que tienen un mayor porcentaje HT controlada ($< 140/90$ mmHg). Esta menor prevalencia y mayor porcentaje de control puede ser atribuido a que estos mismos grupos tienen menor prevalencia de obesidad, tabaquismo y consumo de sodio, factores causales de la HT y que complican su control, mientras que presentan menos tiempo de actividad sedentaria (ENSANUT 2012). A pesar de las diferencias entre entidades, no existe diferencia entre zonas urbanas y rurales.

Por lo que se refiere a la evolución de la prevalencia de HT al interior de las entidades, cabe destacar que el Distrito Federal, Guerrero, Guanajuato y Puebla fueron las únicas entidades en donde la prevalencia de HT se incrementó entre 2000 y 2012. En contraste, en Zacatecas, Coahuila, Colima, Quintana Roo y Yucatán se documentó un notable descenso en ese mismo periodo. En dichos estados, la disminución de la prevalencia de HT fue mayor a 10 puntos porcentuales (Secretaría de Salud, Gobierno de México. Informe sobre la salud de los mexicanos 2015) (Figura 3).

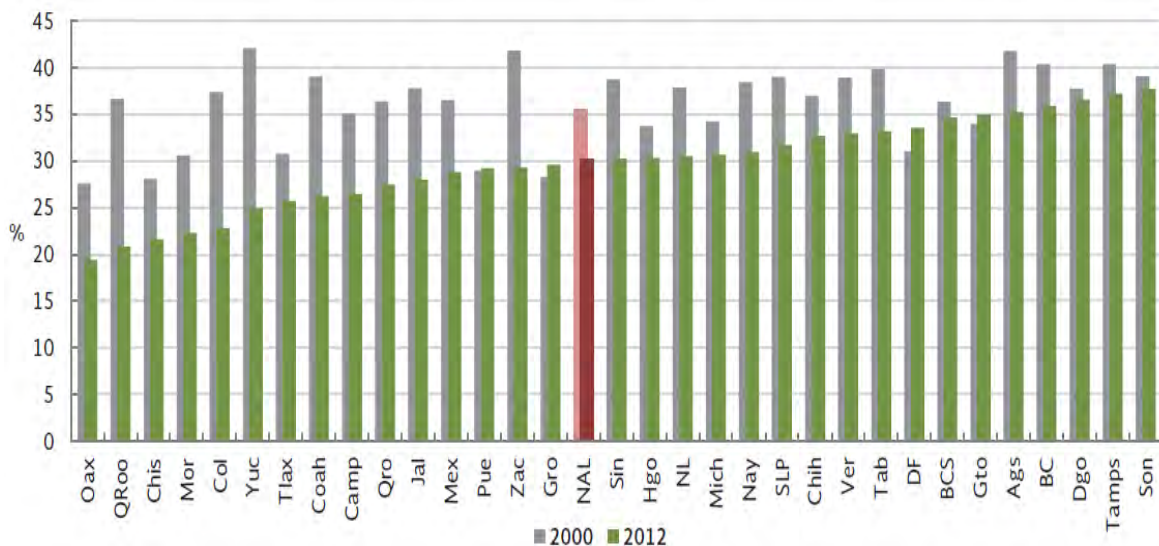


Figura 3. Prevalencia de hipertensión arterial en mayores de 20 años por entidad federativa, 2000 y 2012. Referencia: Secretaría de Salud, Gobierno de México. Informe la salud de los mexicanos 2015.

http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/64176/INFORME_LA_SALUD_DE_LOS_MEXICANOS_2015_S.pdf

1.1 Definición, clasificación y diagnóstico

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud-Sociedad Internacional de Hipertensión (OMS-ISH), el límite para definir a un paciente como hipertenso, es una cifra ≥ 140 mm Hg en la presión sistólica y/o una elevación \geq de 90 mm Hg en la presión diastólica (Whitworth et al., 2003). Los niveles normales de ambas son importantes para el funcionamiento eficiente de órganos vitales como el corazón, el cerebro o los riñones, y para la salud y el bienestar en general (OMS, Información general sobre la hipertensión en el mundo. 2013).

Sin embargo, se ha descrito que al momento de estratificar el riesgo de un paciente con HT, no sólo debe de tomarse en cuenta el nivel numérico en mm Hg – lo que establece el riesgo–, sino que también se deben considerar factores (Rosas

et al., 2004) externos que pudieran ocasionar la elevación transitoria de la presión arterial en un momento dado (e.g. ejercicio previo reciente, ingesta de café, té, o cualquier otra sustancia estimulante en por lo menos una hora previa a la toma de la presión arterial; el tipo de personalidad del paciente también debe ser considerado); y otros factores de riesgo (e.g. diabetes, obesidad, dislipidemia, intolerancia a la glucosa, hiperuricemia, micro o macro albuminuria) ya que el “impacto clínico” de las cifras de presión arterial limítrofes o normales altas, no será el mismo en un sujeto joven (< 35 años) sin factores de riesgo, que en otro –del mismo grupo de edad–, en quien se detecta la existencia de otros factores de riesgo. Por lo que los procedimientos diagnósticos implican:

- * Determinaciones repetidas de la presión arterial; ya que la presión arterial se caracteriza por grandes variaciones en un mismo día o entre días (Chobanian & Hill, 2000);
- * Historia clínica;
- * Exploración física;
- * Exámenes de laboratorio y gabinete, algunos de los cuales deben ser considerados como de rutina en todo paciente con presión arterial elevada.

Cualquiera de las dos cifras, ya sea la sistólica o la diastólica, que alcancen o superen las cifras mencionadas como límites (140/90 mm Hg), es suficiente para establecer el diagnóstico, es decir, no se requiere que forzosamente las dos estén elevadas. Así, se puede hablar de pacientes con hipertensión arterial de predominio diastólico, o incluso hipertensos diastólicos puros (≥ 90 mm Hg con sistólica normal);

también, se puede hablar de hipertensión arterial de predominio sistólico o incluso hipertensión sistólica aislada pura (≥ 140 mm Hg con diastólica normal). El término hipertensión sístolo-diastólica debe reservarse a los casos en que ambas cifras se encuentran elevadas. La importancia de esta clasificación está en relación con los mecanismos fisiopatológicos subyacentes que son diferentes y podrían en un momento dado, determinar el tipo de tratamiento antihipertensivo (Rosas et al., 2004). El procedimiento de diagnóstico incluye lo siguiente (Rosas et al., 2004):

1. El paciente debe estar sentado de manera confortable y con un buen soporte para la espalda, su brazo descubierto, semiflexionado y apoyado en una mesa que permita al brazo mantenerse a la altura del corazón.
2. Se utiliza un brazalete estándar (12-13 cm de ancho y 35 cm de largo). En el caso de obesos (> 35 cm de circunferencia del brazo), utilizar brazalete de 20 cm de ancho. La cámara de aire debe cubrir al menos 80% de la circunferencia del brazo.
3. Se identifican las presiones sistólica y diastólica mediante las fases I y V de los ruidos de Korotkoff respectivamente.
4. En toda evaluación inicial, se toma también la presión en posición supina, y de pie.
5. Se toman al menos dos mediciones separadas 1-2 min, en ambos brazos y una adicional si hubo una diferencia significativa entre las dos primeras. Si se encuentran valores elevados se recomienda medir también en ambas extremidades inferiores. Se toma el valor más alto como referencia.

6. En individuos ancianos, diabéticos y en otras condiciones en las cuales la hipotensión ortostática se sospeche, se mide la presión 1 y 5 min después de asumir la posición de pie.
7. Posteriormente, se determina la frecuencia cardíaca, 30 seg después de la segunda medición en la posición de sentado.
8. En condiciones ideales la persona debe abstenerse de fumar, tomar café o hacer ejercicio, al menos 30 minutos antes de la medición; asimismo, deben considerarse las variaciones debidas al dolor y/o ansiedad.

1.2 Relevancia

Como se mencionó anteriormente, la HT es uno de los principales factores de riesgo en la morbilidad y mortalidad de las enfermedades cardiovasculares, siendo estas últimas, las principales causas de muerte en la población adulta de nuestro país (Rosas et al., 2004).

La HT esencial o HT de causa desconocida, representa más del 90% de los casos con esta patología y se ha postulado que la prevalencia de ésta, guarda estrecha relación con la edad, medio ambiente-estilo de vida, género y factores co-mórbidos, tales como diabetes, obesidad, dislipidemias, tabaquismo y predisposición genética (Johnson et al., 2002).

Hoy se reconoce que la HT esencial es mayormente un síndrome con compromiso multifactorial y generalmente poligénico y familiar. Menos del 5% de los hipertensos tiene una causa monogénica de mecanismo mendeliano (Luft,

2000). Datos obtenidos a partir de estudios en modelos animales, gemelos idénticos y en familias, han indicado que los factores genéticos contribuyen aproximadamente del 30% al 60% de las variaciones en la presión arterial (Mein et al., 2004; Harrap et al., 1996; Luft, 2001; Timberlake et al., 2001; Weder, 2007; Harrison et al., 2008; Wang & Snieder, 2010a).

2. ANTECEDENTES

Son muchos los factores fisiopatológicos que han sido considerados en la génesis de la HT esencial: el incremento en la actividad del sistema nervioso simpático (SNS), la alta ingesta de sodio, la inadecuada ingesta de potasio y calcio, el incremento en la secreción o la inapropiada actividad de la renina, con el resultante incremento en la producción de angiotensina II y aldosterona (SRAA); la deficiencia de vasodilatadores, tales como la prostaciclina, el óxido nítrico (ON) y los péptidos natriuréticos; las anormalidades en los vasos de resistencia, incluyendo lesiones en la microvasculatura renal; la diabetes mellitus, la resistencia a la insulina; la obesidad, etc. (Calhoun et al., 2003; Oparil et al., 2003; Nicolson et al., 2004).

La edad es un factor que se asocia al predominio sistólico y/o diastólico de hipertensión arterial. Así, es mayor la prevalencia de predominio diastólico en los individuos de < 50 años. En México, por sus características de distribución poblacional, donde aún la mayor parte de la población entre 20 y 69 años la conforman individuos con < 50 años, la mayor prevalencia de hipertensión arterial

es de predominio diastólico (Rosas et al., 2004). Así, a diferencia de los países desarrollados, donde su distribución por grupos de edad muestra un predominio de individuos con edad > 50 años, la prevalencia de tipo sistólico aislado es más común (> del 30% de todos sus hipertensos) (Wolf-Maier et al., 2003).

También, existen diferencias en el comportamiento de las cifras de tensión arterial tanto raciales como de sexo a lo largo de la vida. En todos los grupos étnicos hasta este momento las cifras tensionales tienden a ser más altas en el grupo de hombres que en el de mujeres (Burt et al., 1995).

Recientemente se ha propuesto que la HT esencial es una enfermedad multifactorial compleja, en la que factores ambientales genéticos y epigenéticos interactúan para su desarrollo (Irmak & Sizlan, 2006), esto es evidenciado, por la discrepancia de la presentación de la enfermedad en gemelos homocigotos, el inicio tardío de la enfermedad y su patrón progresivo que no pueden solo ser explicados tomando como base las estrategias de secuenciación del DNA (Wang & Snieder, 2010a,b).

2.1 Relación con la menopausia

Por otro lado, la menopausia es un fenómeno natural relacionado con la edad y que consiste en la transición gradual de la fase de vida reproductiva a no reproductiva. Su aparición coincide con la edad media de vida alrededor de los 50 años (Martell et al., 2002). La HT es el principal factor de riesgo de morbilidad y mortalidad por enfermedad cardiovascular en la mujer postmenopáusica, afectando

aproximadamente al 60% de las mujeres mayores de 65 años de edad (Aranda-Lara P et al. 2003; Rosas M et al. 2004; ENSANUT 2012).

La característica distintiva de la menopausia es la disminución del funcionamiento de los ovarios que dejan de producir estrógenos. Los estudios demuestran que, a partir de la menopausia natural o quirúrgica, la HT comienza ganar terreno en el sexo femenino (Martell et al. 2002; ENSANUT 2012). Varios estudios han observado que a partir de los 50 años la HT es tanto o más frecuente en las mujeres que en los varones (Lima et al. 2012; Martell et al. 2002; Aranda-Lara et al. 2003); esto también lo podemos observar en los resultados de la ENSANUT 2012 (Figura 2).

Esta situación sugiere que la falta de estrógenos desempeña un papel importante en el desarrollo de la HT. La deficiencia estrogénica se asocia con alteraciones del endotelio, cuya función es producir sustancias que regulan la dilatación y contracción de los vasos. La falta de estrógenos también provoca cambios en la estructura de la pared arterial tornándolas rígidas (Lima et al. 2012; Martell et al. 2002; Aranda-Lara et al. 2003). Asimismo, como consecuencia de la falta de esta hormona aumenta la actividad del sistema nervioso simpático que estimula la vasoconstricción. Otro factor que contribuye al aumento de la presión arterial en la menopausia es la mayor sensibilidad a la sal. Esto significa que, a diferencia de la mujer en edad fértil, la ingesta de sal ahora condiciona aumento de la presión arterial. La carencia de estrógenos se asocia también a ganancia de peso, favoreciendo la distribución de la grasa en el abdomen (Martell et al. 2002).

2.2 Genes asociados

Por otro lado, diversos trabajos se han enfocado a estudiar la posible asociación entre HT esencial y polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en genes relacionados con el sistema renina-angiotensina-aldosterona, canales epiteliales de sodio, función catecolaminérgica-adrenérgica, del sistema renal de calicreína, metabolismo de lipoproteínas, receptores de hormonas, factores de crecimiento, entre otros (Timberlake et al., 2001). Sin embargo, los resultados han sido diversos.

Recientemente se han vinculado a los genes de apelina APLN y su receptor APLNR (localizados en los cromosomas Xq25-q26.3 y en 11q12.1 respectivamente, Figura 5) con enfermedades cardiovasculares, como es la falla cardíaca crónica (Chandrasekaran et al., 2008; Quazi et al., 2009) y los desórdenes metabólicos relacionados con la HT (Charles et al., 2006).

De igual forma, los estudios realizados en modelos de animales, sugirieron que el sistema APLN-APLNR se encontraba implicado en la homeostasis cardiovascular (Charles et al., 2006; Charles, 2007; Kleinz et al., 2005); así como en la regulación de la presión sanguínea (Seyedabadi et al., 2002; Kagiya et al., 2005). (Figura 4).

Los estudios de inmunoensayo e inmunohistoquímica, demostraron que APLN se encuentra en altas concentraciones en el tejido cardíaco y se localiza principalmente en el endotelio de las arterias coronarias (Chen et al., 2003). Otros estudios realizados en ratas normotensas, indicaron que la sobre-expresión del gen

APLN en la médula ventrolateral rostral resulta en una elevación crónica de la presión sanguínea e hipertrofia cardíaca (Zhang et al., 2009).

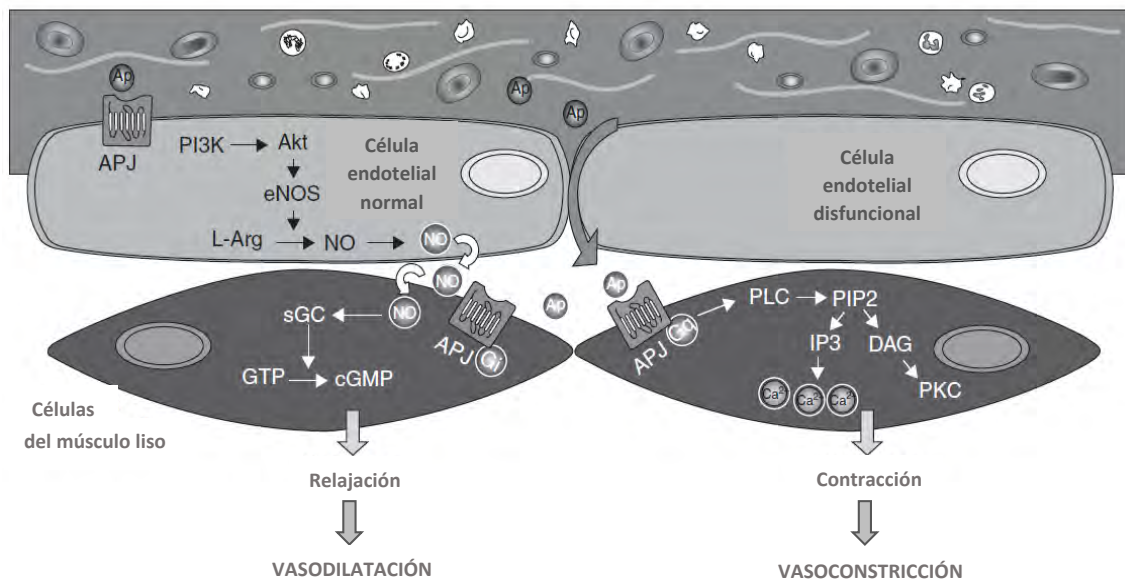


Figura 4. Sistema apelinérgico. Vías intracelulares responsables de los efectos vasomotores en la interacción apelinina/APJ en ausencia y presencia de disfunción endotelial. Normalmente apelinina es sintetizada localmente en células endoteliales, después es transportada a las membranas celulares luminales y basolaterales. Las moléculas de apelinina liberadas localmente y en circulación activan el APJ endotelial generando NO libre; el NO difunde dentro de las células del músculo liso produciendo vasodilatación. En presencia de un endotelio intacto el efecto neto es vasodilatación. Cuando las células endoteliales están disfuncionales los péptidos de apelinina activan directamente el APJ en las células del músculo liso vascular conduciendo a la vasoconstricción, posiblemente a través del acoplamiento a una proteína Gq.

Akt: proteína Akt; Ap: apelinina; APJ: receptor de apelinina; cGMP: guanósino monofosfato cíclico; DAG: diacilglicerol; eNOS: sintasa de óxido nítrico endotelial; Gi: proteína G inhibidora; Gq: proteína Gq; GTP: guanósino trifosfato; IP3: inositol-3,4,5-trifosfato; L-Arg: L-arginina; NO: óxido nítrico; PIP2: fosfatidilinositol; PI3K: fosfoinositide 3-cinasa; PLC: fosfolipasa C; sGC: guanilato ciclase soluble; PKC: proteína quinasa C. Referencia: Falcão-Pires I, Ladeiras-Lopes R, Leite-Moreira AF. 2010.

Asimismo, los ratones nulos para este gen, no mostraron disminución ni de la osmolaridad o del volumen urinario durante la privación de agua, sugiriendo un efecto anti-diurético in vivo de la apelina (Roberts et al., 2009).

APLNR pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas-G (O'Dowd et al., 1993). Este receptor está relacionado con el receptor de angiotensina, pero en realidad es un receptor apelina que inhibe la actividad de la adenilato ciclasa y desempeña un rol contra-regulador de la acción que realiza la angiotensina II sobre la presión sanguínea, ejerciendo un efecto hipertensivo (Chandrasekaran et al., 2008). Se han descrito altas concentraciones de este receptor en el corazón, así como su expresión en numerosos tipos celulares incluyendo el endotelio, músculo liso y miocitos (Kleinz et al., 2005). El ligando endógeno de este receptor es la APLN (Tatemoto et al., 1998).

Hasta el momento los SNPs del sistema APLN-APLNR asociados a la presencia de HT esencial son: dos localizados en *APLN* (rs3761581 y la variante T-1860C) y dos en *APLNR* (rs7119375 y el rs10501367), esto en población Han China; dicha asociación se mantuvo aún después de haber ajustado por factores confusores (Li et al., 2009; Niu et al., 2010; Zhao et al., 2010) (Figura 5).

Estudios llevados a cabo en ratas Wistar, detectaron inmunoreactividad de APLN en el endotelio de las arterias pequeñas, también observaron que este péptido, disminuía significativamente la presión arterial sanguínea y elevaba en forma transitoria los niveles plasmáticos de nitritos/nitratos, cuyo efecto era bloqueado por la presencia de inhibidores de la sintasa de óxido nítrico (Tatemoto et al., 2001). Con base en lo anterior, los autores sugirieron que APLN podría

disminuir la presión sanguínea a través de un mecanismo dependiente del óxido nítrico.

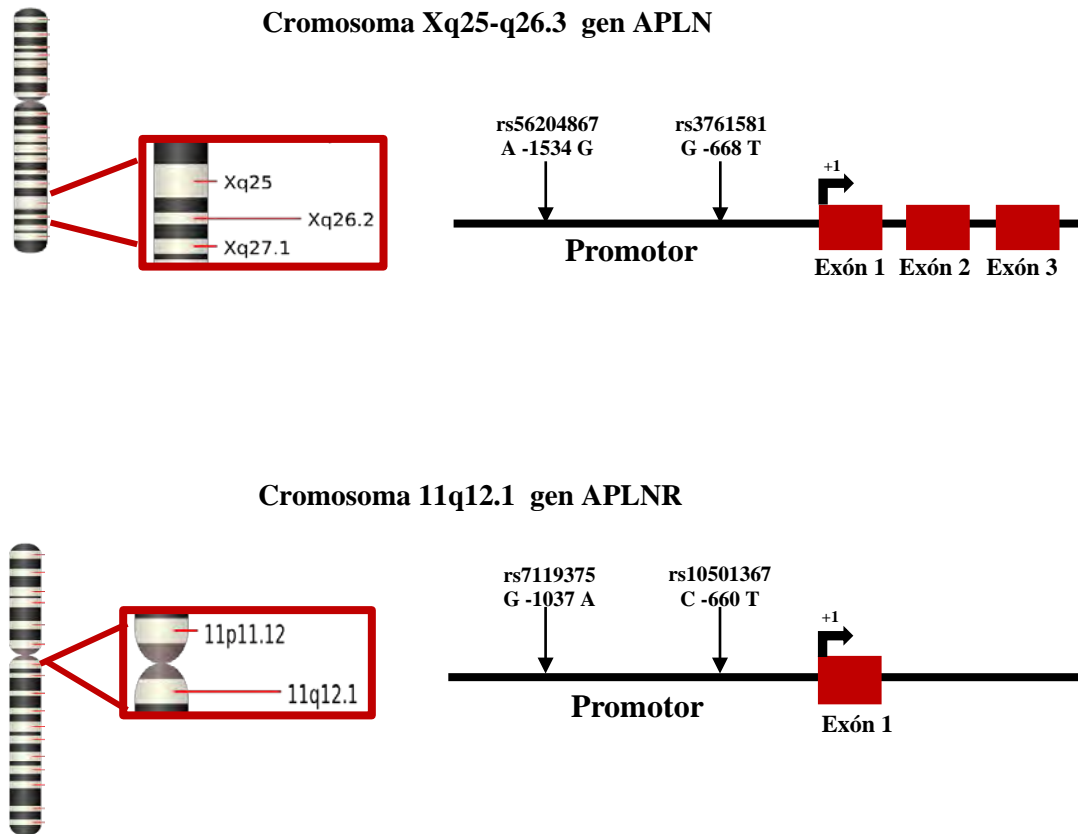


Figura 5. Se observa la localización de los genes APLN y APLNR en los cromosomas Xq25-q26.3 y 11q12.1 respectivamente, así como la localización de los polimorfismos asociados a la presencia de hipertensión arterial esencial en cada uno; todos ellos en la secuencia del promotor del gen.

Por otra parte, existen diversos polimorfismos del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa MTHFR (localizado en el cromosoma 1p36.3, Figura 6) así como estudios de asociación descritos en este gen y presencia de HT

(Kahleová et al., 2002; Tylicki et al., 2005; Markan et al., 2007; Conen et al., 2009; Jiang et al., 2011). Recientemente, Tomaszewski et al. (2010) llevaron a cabo un estudio de escrutinio del genoma completo (GWAS) a gran escala de individuos de origen étnico caucásico con variaciones de la presión sanguínea ambulatoria en 24 hrs, en el que describieron una fuerte asociación del polimorfismo rs13306560 de este gen y la media de la presión sanguínea diastólica en 24 hrs. Posteriormente replicaron estos resultados en relación a la presión diastólica sanguínea media en dos cohortes adicionales (N > 6000).

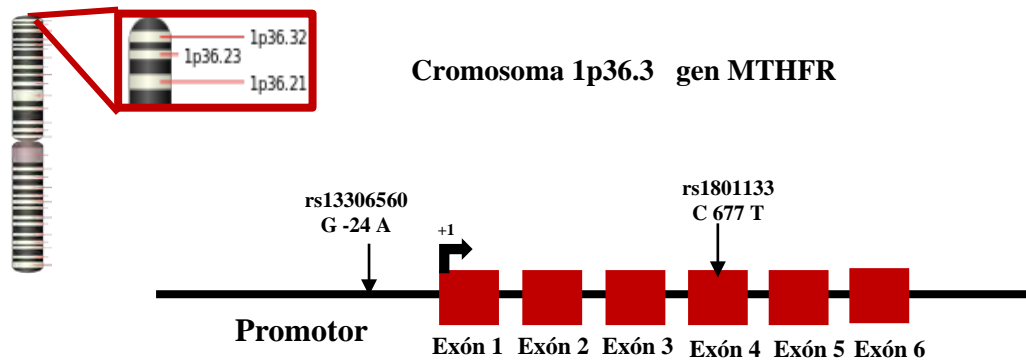


Figura 6. Se observa la localización del gen MTHFR en el cromosoma 1p36.3, así como la localización de los polimorfismos asociados a la presencia de hipertensión arterial esencial de este. Uno de ellos se localiza en la región del promotor del gen, mientras que el otro se localiza en el exón 4.

El alelo ancestral de este polimorfismo se encuentra en el centro de la parte más conservada del promotor tanto en primates y otros mamíferos como en vertebrados superiores (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks>).

Tomaszewski et al. (2010), realizaron un estudio de microarreglos de SNPs comunes (>30000) y variantes poco comunes (>2000), en el que se mostró una fuerte asociación de la presión sanguínea diastólica de 24 hrs con el SNP rs13306560 que se sitúa en la región promotora para los genes MTHFR/CLCN6. Posteriormente, el estudio se replicó para presión sanguínea diastólica en dos cohortes adicionales. Debido a que la variante génica rs13306560 se sitúa en la región promotora de los genes MTHFR/CLCN6, y que esta región contiene islas CpG se ha propuesto que cambios en la metilación de dicha región, alelo específica, podrían estar asociados a cambios en la presión sanguínea.

Por otro lado, el SNP rs1801133, se ha asociado a la presencia de HT mediante la acumulación de homocisteína en sangre (Pérez-Razo et al., 2015; Frosst et al., 1995), ya que esta acumulación está asociada a daño endotelial. El homocigoto TT del SNP rs1801133, vuelve termolábil a la enzima MTHFR provocando elevación en plasma de los niveles de homocisteína (Figura 7).

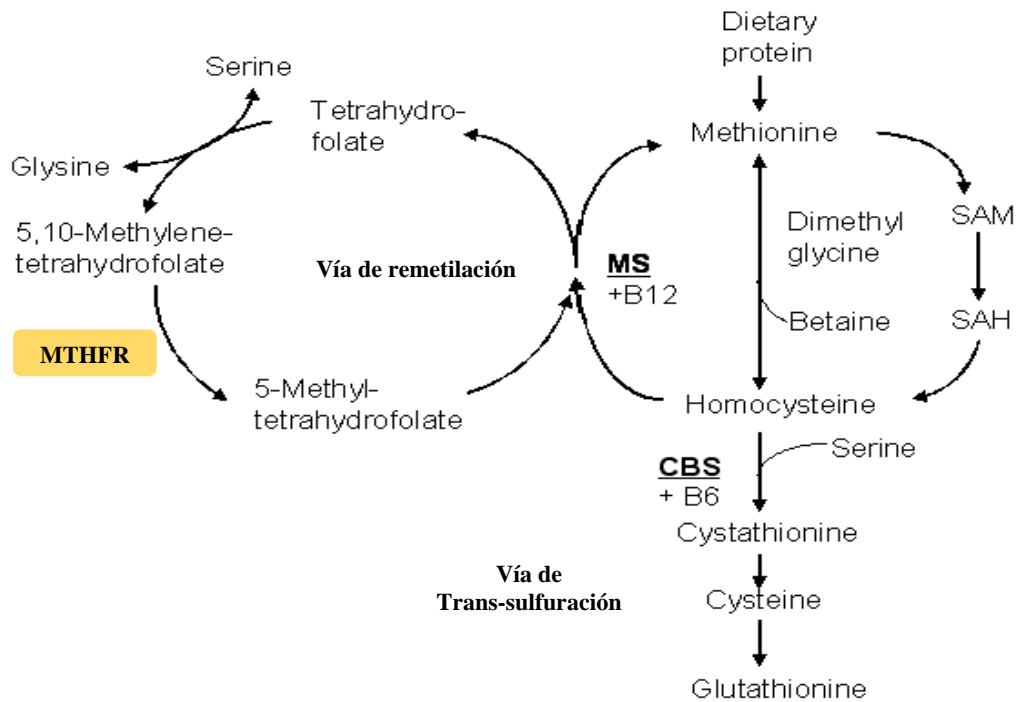


Figura 7. Vía metabólica de la degradación de metionina. La mayor parte de la homocisteína, un compuesto intermedio de degradación de la metionina, es normalmente remetilado a metionina. Esta reacción de ahorro de metionina es catalizada por la enzima metionina sintasa, que requiere un metabolito de ácido fólico (5-metil-tetrahidrofolato) como donador de metilo y un metabolito de la vitamina B12 (metilcobalamina) como un cofactor. Solamente 20-30% de la homocisteína total (y su dímero homocistina) está en forma libre en el plasma de individuos normales. El resto está unido a proteína. La acumulación de homocisteína y sus metabolitos es causada por la interrupción de cualquiera de las 3 vías interrelacionadas del metabolismo de la metionina: 1) deficiencia en la enzima cistatiónina β-sintasa (CBS) (Tipo I/Homocistinuria clásica), 2) síntesis defectuosa de metil cobalamina (tipo II), 3) anomalía en metil-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) (Tipo III). Tres diferentes cofactores/vitaminas –piridoxal 5-fosfato, metilcobalamina y folato- son necesarios para los 3 caminos metabólicos diferentes. La vía, a partir de la metionina, progresando a través de la homocisteína, y hacia adelante a la cisteína, se denomina la ruta de trans-sulfuración. La conversión de homocisteína de nuevo a metionina, catalizada por MTHFR y metilcobalamina, se denomina vía de remetilación. Referencia: Metabolic pathway of methionine degradation. <http://www.namrata.co/category/metabolism-proteins/case-studies-metabolism-of-proteins/>

3. JUSTIFICACIÓN

No se conoce con exactitud la etiología de la HT esencial; sin embargo, se han identificado diversos factores tanto ambientales como genéticos involucrados en la génesis de esta patología (Caulfield et al., 2003; Province et al., 2003).

Diversos trabajos se han enfocado a estudiar la posible asociación entre HT esencial y polimorfismos en numerosos genes con resultados diversos. Sin embargo, la mayoría de estos estudios han sido llevados a cabo principalmente en poblaciones sajonas y asiáticas.

Por otro lado, la falta de estrógenos desempeña un papel importante en el desarrollo de la HT. La deficiencia estrogénica se asocia con alteraciones del endotelio, cambios en la estructura de la pared arterial, aumento en la actividad del sistema nervioso simpático que estimula la vasoconstricción, etc. Asimismo, los estudios demuestran que, a partir de la menopausia natural o quirúrgica, la HT comienza ganar terreno en el sexo femenino, dándose tanto o más frecuentemente en las mujeres que en los varones.

Finalmente, en México, nuestras poblaciones tienen un acervo genético distinto, determinado por el mestizaje que se dio entre las distintas etnias mexicanas con los españoles y algunos grupos de origen africano (Lisker et al., 1990); por lo que no se pueden extrapolar los resultados de una población a otra.

Por lo que nos interesa conocer si en las mujeres postmenopáusicas que provienen de una población maya (con acervo genético maya) que ya no tienen la

protección de los estrógenos, hay una asociación de los polimorfismos antes mencionados con la hipertensión arterial esencial.

4. OBJETIVOS

General

Analizar si algún(os) polimorfismo(s) y/o haplotipo(s) en los genes APLN, APLNR y MTHFR se asocia(n) con la presencia de HT esencial en mujeres postmenopáusicas de origen étnico mestizo-maya.

Específicos

1. Analizar los polimorfismos rs3761581 y rs56204867 de la región promotora del gen APLN, en mujeres postmenopáusicas de origen étnico mestizo-maya con y sin HT esencial.
2. Analizar los haplotipos de los polimorfismos del gen APLN, en mujeres postmenopáusicas de origen étnico mestizo-maya con y sin HT esencial.
3. Analizar los polimorfismos rs7119375 y rs10501367 del gen APLNR, en mujeres postmenopáusicas de origen étnico mestizo-maya con y sin HT esencial.
4. Analizar los haplotipos de los polimorfismos del gen APLNR, en mujeres postmenopáusicas de origen étnico mestizo-maya con y sin HT esencial.

5. Analizar los polimorfismos rs13306560 y rs1801133 del gen MTHFR, en mujeres postmenopáusicas de origen étnico mestizo-maya con y sin HT esencial.
6. Analizar los haplotipos de los polimorfismos del gen MTHFR, en mujeres postmenopáusicas de origen étnico mestizo-maya con y sin HT esencial.

5. HIPÓTESIS

Las mujeres postmenopáusicas de origen étnico mestizo-maya con HT esencial tienen polimorfismos de un solo nucleótido en los genes de APL, APLNR y MTHFR que se asocian con la presencia de dicha patología.

6. METODOLOGÍA

6.1 Diseño de la investigación

Es un estudio de asociación de casos y controles, el cual se llevó a cabo con muestras de DNA de una corte de mujeres de origen étnico mestizo-maya de la Unidad Universitaria de Inserción Social y del Centro de Jubilados y Pensionadas del ISSTEY de Yucatán, que aceptaron participar en el estudio y a las cuales se les midió la presión arterial para definir el diagnóstico de HT esencial realizado por un Médico Cardiólogo de acuerdo a los criterios establecidos por la OMS y la AHA, y aceptados por la Secretaría de Salud.

6.2 Criterios de selección

Criterios de inclusión de sujetos con HT esencial

- Origen étnico mestizo-maya, resultado de la mezcla de los españoles con los mayas principalmente; con al menos un apellido maya en las tres últimas generaciones; y que vivan en el estado de Yucatán (Gorodezky et al., 2001).
- Cese de menstruación de más de 12 meses y tener ≥ 40 años de edad.
- Que acepten participar en el estudio y firmen la carta de consentimiento informado.
- Que acepten se les extraiga sangre para exámenes de laboratorio y extracción de DNA.
- Con diagnóstico de HT esencial realizado por médico cardiólogo de acuerdo a los criterios establecidos por la OMS y la AHA, y aceptados por la Secretaría de Salud.

Criterios de exclusión de sujetos con HT esencial

- Mujeres con diagnóstico de HT secundaria a:
 - Patología renal: enfermedad renal de origen parenquimatoso, glomerulonefritis aguda, nefritis crónica, enfermedad poliquística, nefropatía diabética, hidronefrosis, enfermedad renovascular, estenosis de la arteria renal, vasculitis intrarrenal, tumores productores de renina, retención primaria de sodio (Síndrome de Liddle).

- Patología de tipo endócrino: acromegalia, hipotiroidismo e hipertiroidismo, hipercalcemia, hiperparatiroidismo, trastornos suprarrenales: feocromocitoma, hiperaldosteronismo primario, síndrome de Cushing, tumores cromafines extra-suprarrenales, carcinoide, hormonas exógenas (estrógenos, glucocorticoides, mineralocorticoides, simpaticomiméticos, eritropoyetina).
- Tratamiento con quimioterapia y radioterapia menor de 6 meses por cualquier tipo de cáncer.
- Insuficiencia cardíaca crónica.
- Coartación de la aorta
- Hipertensión pulmonar
- Ingesta crónica de esteroides
- Hipertensión portal
- Mujeres con trastornos neurológicos: hipertensión endocraneana, apnea del sueño, porfiria aguda, disautonomía familiar, intoxicación por plomo, síndrome de Guillian-Barré.
- Mujeres con cardiopatía isquémica.
- Mujeres con tratamiento crónico por hipotensión arterial.

Criterios de eliminación de con HT esencial

- Deseen abandonar el estudio y retirar su consentimiento informado.
- Mujeres que durante la realización de la historia clínica y evaluación presenten algún criterio de exclusión.

Criterios de inclusión de sujetos control

- Origen étnico mestizo-maya, resultado de la mezcla de los españoles con los mayas principalmente; con al menos un apellido maya en las tres últimas generaciones; y que vivan en el estado de Yucatán (Gorodezky et al. 2001).
- Cese de menstruación de más de 12 meses y tener ≥ 40 años de edad.
- Que acepten participar en el estudio y firmen la carta de consentimiento informado.
- Que acepten se les extraiga sangre para exámenes de laboratorio y extracción de DNA.
- Mujeres sin HT esencial realizado por médico cardiólogo de acuerdo a los criterios establecidos por la OMS y la AHA, y aceptados por la Secretaría de Salud.

Criterios de eliminación de sujetos control

- Mujeres que durante el interrogatorio o exploración física se detecte alguna enfermedad o trastorno fisiológico o metabólico que pudiera condicionar HT.
- Deseen abandonar el estudio y retirar su consentimiento informado.

6.3 Cálculo del tamaño de muestra

Para el cálculo del tamaño de muestra se utilizó el programa Quanto versión 1.2.4. Los parámetros que se utilizaron en dicho programa son: estudio de casos y controles no pareados, un control por cada caso, efecto solamente del gen,

frecuencia alélica del alelo variante, se consideran los modelos aditivo, dominante y recesivo, prevalencia de la enfermedad en nuestra población (que es del 60%), y un poder estadístico del 80%.

6.4 Consideraciones éticas

Para la realización de este estudio, se obtuvo la aprobación tanto de la Unidad Universitaria de Inserción Social como del Centro de Jubilados y Pensionadas del ISSTEY de Yucatán. Todas las participantes que aceptaron ingresar al estudio, firmaron previamente una carta de consentimiento informado. La forma de consentimiento informado se estructuró acorde con las disposiciones de la Secretaría de Salud en materia de investigación en humanos. Los riesgos implícitos en la toma de las muestras de sangre, mismas que se solicitaron para la obtención del DNA, son considerados mínimos.

6.5 Asignación de hipertensión arterial

La asignación de HT de las pacientes a las cuales se les tomó muestra, se llevó a cabo mediante los parámetros señalados a continuación:

Tabla 1. Clasificación de la presión arterial para adultos acorde al JNC7

Clasificación	PAS mmHg	PAD mmHg
Normal	< 120	< 80
Pre-hipertensión	120 - 139	80 - 89
HIPERTENSIÓN		
Etapa I	140 - 159	90 - 99
Etapa II	≥ 160	≥ 100

Tanto a las mujeres control como a las mujeres con HT esencial, se les aplicó una historia clínica completa y se tomó la presión arterial de acuerdo a los lineamientos establecidos por la OMS que se describen a continuación:

- El individuo debe estar sentado de manera confortable y con un buen soporte para la espalda, su brazo descubierto, semi-flexionado y apoyado en una mesa que permita al brazo mantenerse a la altura del corazón. La presión se toma en posición supina y de pie.
- Se toman dos mediciones separadas 1-2 min, en ambos brazos y se realiza una adicional si se observa una diferencia sustancial entre las dos primeras. Si se encuentran valores elevados se mide también en ambas extremidades inferiores.
- Se utiliza un brazalete estándar (12-13 cm de ancho y 35 cm de largo). En el caso de individuos obesos (>35 cm de circunferencia del brazo), se utiliza brazalete de 20 cm de ancho. La cámara de aire debe cubrir al menos 80% de la circunferencia del brazo.

- Se identifica la fase I y V de los ruidos de Korotkoff para determinar las presiones sistólica y diastólica respectivamente.

Todos los individuos deben abstenerse de fumar, tomar café o hacer ejercicio, al menos 30 minutos antes de la medición; asimismo, se consideran las variaciones debidas al dolor y/o ansiedad.

6.6 Extracción de DNA

La extracción del DNA se realizó mediante el método de Miller modificado (Miller et al., 1988). Inicialmente se extrajo sangre con EDTA y se enfrió a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 2300 rpm / 10 minutos y se retiró el plasma. A continuación se colocaron 2mL de sacarosa tritón 2X y 1mL de agua destilada, se agitó en vórtex y se dejó 10 minutos en hielo (4°C). Después se centrifugó nuevamente a 2300 rpm / 10 minutos y se decantó vigilando que el botón de leucocitos se quedara en el fondo del tubo. En seguida se colocó 1mL de sacarosa tritón 2X y 1mL de agua destilada, se agitó en vórtex y después se centrifugó a 2300 rpm / 10 minutos. Nuevamente se agregaron 1mL de sacarosa tritón 2X y 1mL de agua destilada, se agitó en vórtex y se centrifugó a 2300 rpm / 10 minutos.

Posteriormente se decantó el tubo y se agregaron 72µL de NaCl 5mM para despegar el botón de leucocitos y transferirlo junto con el NaCl a un tubo de 1.5mL, se agitó en vórtex y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos, durante el cual se volvió a agitar en vórtex. Se adicionaron 36µL de SDS 10%, se agitó en

vórtex y se dejó incubar a temperatura ambiente por 5 minutos durante los cuales, se volvió a agitar en vórtex. A continuación se agregó 246.36µL de NaCl saturado, se agitó en vórtex y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos durante los cuales, se volvió a agitar en vórtex.

Toda la mezcla anterior se centrifugó a 14 000 rpm / 10 minutos a 4°C, y el sobrenadante se pasó a un tubo nuevo y se volvió a centrifugar a 14 000 rpm / 10 minutos a 4°C, para pasar nuevamente el sobrenadante a un tubo nuevo donde se agregaron 800µL de etanol absoluto frío (aproximadamente 2 volúmenes de etanol a 4°C). Se agitó vigorosamente y se separó el DNA con una punta de 200µL.

Finalmente, se agregaron 1mL de etanol 70% a temperatura ambiente, se centrifugó a 14 000 rpm / 5 minutos a temperatura ambiente y se desechó el sobrenadante. Esto se repitió las veces necesarias para lavar el DNA. Se decantó el tubo y el botón obtenido es el DNA. Una vez evaporado todo el etanol del tubo y se adicionaron aproximadamente 50-60 µL de agua inyectable para resuspender el DNA.

6.7 Dilución de DNA

Se necesita diluir el DNA extraído de las muestras para genotipificar cada una de ellas. Por lo que se midió la concentración de DNA y la pureza en cada una de las muestras por espectrofotometría mediante el equipo "Nanodrop" y se realizaron los cálculos para obtener una concentración de 10ng/µL de la muestra

en un volumen final de 50 μ L, con agua inyectable y en un tubo eperdorf de 0.6mL. Como muestra blanco se utilizó agua inyectable.

Para conocer la pureza de la muestra la relación 260/280 debe estar en un rango de 1.8 a 2.0. Cuando éste valor es menor se dice la muestra está contaminada con sales y si es mayor está contaminada con proteínas.

6.8 Integridad del DNA

Posteriormente, se corroboró la integridad del DNA de las muestras, para lo cual se utilizó la técnica de gelRED en geles de agarosa.

En la preparación de un gel de agarosa al 1 % en TBE 0.5X se agregó directamente 1 μ L de gelRED (previamente diluido 1:4) por cada 100mL de gel de agarosa antes de calentar la mezcla para disolver. Después que se disolviera y solidificara, se depositaron 4 μ L de muestra de DNA diluida (aprox. 40ng) con 1 μ L de buffer de carga. Finalmente se corrió el gel en buffer de TBE 0.5X a 100 volts por 20 minutos. Al terminar el tiempo, se observó el gel en el transiluminador de rayos UV y se determinó la integridad del DNA cuando las bandas en el gel no se observaron degradadas.

6.9 Genotipificación

La genotipificación se realizó tanto de pacientes como de controles. Se utilizó la técnica de discriminación alélica por PCR en tiempo real con sondas de hidrólisis

de acuerdo con el sistema PCR allelic discrimination TaqMan assays. En todos los ensayos se incluyeron los controles positivos correspondientes y al menos un control negativo.

Primero se colocaron el buffer Master Mix (2X), la sonda Taqman respectiva y el agua para PCR en un tubo ependorf de 1.5mL. Se agitó en vórtex y se centrifugó. A esta mezcla se le llama “premix”. Las placas que se utilizaron tienen 96 pozos, los cuales se llenaron con 4µL de premix cada uno. Se trabajó la placa sobre un refrigerante frío. Posteriormente se colocó 1µL de muestra de DNA diluida (aprox. 10ng) en cada pozo. En el pozo del control negativo se colocó 1µL de agua estéril para PCR. Finalmente, se colocó la membrana para cubrir los pozos y se centrifugó la placa por 20 segundos a 2500 rpm. La composición de la mezcla de reacción se puede observar en la Tabla 2.

Tabla 2. Mezcla de reacción para discriminación alélica por PCR en tiempo real con sondas Taqman

Reactivo	Volumen por muestra (µL)
Master Mix (2X)	2.5
Sonda Taqman (40X)	0.125
Agua para PCR	1.375
DNA	1.0

* El volumen final de la reacción es de 5µL.

Posteriormente, la placa se colocó en el equipo de PCR en tiempo real y se procesó bajo las siguientes condiciones:

Tabla 3. Condiciones de reacción para la PCR en tiempo real en el Equipo Light Cycler 480

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	# Ciclos
Pre-incubación	95	10 min	1
Amplificación	95	15 seg	40
	60	1 min	
Enfriamiento	40	10 eg	1

Una vez terminados los ciclos estipulados, el software asignó un genotipo a cada una de las muestras en la placa. Los resultados se analizaron de acuerdo a las curvas y valores de absorbancia, al gráfico de plot, al valor del score y al ciclo en el que amplificaron.

6.10 Equilibrio de Hardy-Weinberg

Una vez obtenido el genotipo de cada una de las muestras de DNA para los SNPs en cuestión, se elaboró una base de datos que contiene información básica de las pacientes, así como información que está relacionada con la HT esencial y que puede fungir como factor de confusión al momento de buscar una asociación entre los SNPs y la HT esencial. En este caso dicha información es: edad; concentración en sangre de glucosa, colesterol, triglicéridos, HDL, LDL y VLDL;

tiempo de menopausia; edad de menarca; si padece diabetes y/o dislipidemias; IMC; si realiza ejercicio; si fuma y si consume alcohol.

En la base de datos también se incluye el conteo de cada genotipo de cada SNP por grupo control o caso, y se calcula el equilibrio de Hardy-Weinberg en la siguiente página: ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl

6.11 Tratamiento estadístico

Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov a las variables numéricas para determinar su ajuste a una distribución normal. Las comparaciones entre variables numéricas continuas se analizaron mediante t de Student cuando su distribución fue normal, o con la prueba de suma de rangos de Wilcoxon cuando la distribución no fue normal. Para examinar la asociación en las variables discretas se utilizó la prueba de X^2 en caso de cumplir con los requerimientos para la misma, en caso contrario se utilizó la prueba exacta de Fisher.

También se llevó a cabo el análisis de las frecuencias alélicas de los diferentes polimorfismos de los genes que se estudiaron; y se analizó el desequilibrio de ligamiento (DL) entre los diversos polimorfismos mediante el programa Haploview 4.2. (Barrett et al., 2005).

Finalmente, se utilizó el paquete estadístico SPSS v16.0 para realizar la regresión logística multinomial e identificar los predictores de HT esencial; se ajustó por posibles variables confusoras (factores de riesgo conocidos relacionados con

HT esencial: diabetes mellitus, dislipidemias, edad, género, IMC, etc). Se consideró asociación entre el SNP y la presencia de HT esencial cuando $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

Se obtuvieron un total de 356 muestras de DNA pertenecientes a mujeres de origen étnico mestizo-maya que aceptaron participar en el estudio y a las cuales se les midió la presión arterial para diagnóstico de HT esencial. Dichas mujeres tuvieron un cese de menstruación de más de 12 meses.

El rango de edad al momento del estudio de las pacientes fue de 41 a 80 años; este rango tan amplio debido a que en el estado de Yucatán la prevalencia de HT es alta lo cual dificulta tener mujeres control. Además, que el origen de la menopausia en el presente estudio debía ser natural y no quirúrgica.

El cálculo del tamaño de muestra inicial se realizó como se describe en la metodología, considerando la frecuencia alélica del alelo variante de la página del NCBI (Hapmap de mexicanos) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). Sin embargo, estos cálculos del tamaño de muestra eran sólo preliminares ya que posteriormente se tiene que realizar nuevamente el cálculo del tamaño de muestra con los datos de frecuencia alélica del alelo variante encontrados en nuestra población.

7.1 Características bioquímicas y demográficas de la población

A través de la historia clínica, se obtuvieron de las 356 muestras de DNA, los parámetros bioquímicos y demográficos. Dichos parámetros son importantes ya que pueden tener algún efecto en el paciente que predisponga a la HT, por lo que se deben descartar si deseamos ver únicamente la influencia del gen, o en este caso del SNP en la presencia de HT esencial. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Para aquellos parámetros que poseen una distribución normal, se reporta la media y su desviación estándar; para aquellos que no siguen una distribución normal se reporta la mediana y el rango. Con respecto a los parámetros categóricos, se reporta el número y porcentaje en cada caso (controles y HT).

Tabla 4. Parámetros bioquímicos y demográficos de las poblaciones estudiadas

Variable	Controles	HT	<i>p</i>
n	178	178	
Edad (años)	59.84 ± 8.49	65.81 ± 8.29	7.E-11
TAS (mm Hg)	119.5 (90 - 130)	130 (100 - 190)	1.E-31
TAD (mm Hg)	76 (50 - 85)	80 (59 - 110)	2.E-06
Glucosa (mg/dL)	92.5 (65 - 275.5)	94.55 (65 - 273)	0.990
Colesterol (mg/dL)	187.39 ± 37.39	186.45 ± 35.72	0.808
HDL (mg/dL)	52.56 ± 10.98	52.19 ± 10.46	0.745
LDL (mg/dL)	102.62 ± 33.46	102.96 ± 31.45	0.921
Triglicéridos (mg/dL)	160.41 ± 68.04	156.25 ± 53.16	0.521
VLDL (mg/dL)	30.35 (10.1 - 83.2)	29.70 (11.6 - 221)	0.905
IMC (Kg/m ²)	29.02 ± 4.58	29.99 ± 4.95	0.055
Diabetes, n (%)	33 (18.53%)	30 (16.85%)	0.677
Dislipidemias, n (%)	18 (10.11%)	6 (3.37%)	0.011
Tiempo de menopausia (años)	10 (1 - 35)	19 (2 - 38)	8.E-12
Menarca (años)	12 (9 - 16)	12 (9 - 17)	0.492
Ejercicio, n (%)	1 (0.56%)	60 (33.70%)	1.E-16
Fuma, n (%)	13 (7.30%)	9 (5.05%)	0.379
Consume alcohol, n (%)	56 (31.46%)	36 (20.22%)	0.015

7.2 Concentración e integridad del DNA

Una vez obtenido el DNA genómico de las muestras de sangre, se cuantificó la concentración de DNA mediante espectrofotometría UV-Visible y su densidad óptica en el Nano Drop. El software del equipo calcula automáticamente la concentración del DNA mediante la relación:

$$1 A_{260nm} = 1 DO DNA = 50 \mu g/ml$$

Es importante considerar el cociente de densidad óptica 260/280 nm, que automáticamente nos da el equipo, ya que un cociente entre 1.8 – 2.0 significa que el DNA tiene una pureza adecuada. Posteriormente se realizó la dilución correspondiente para llegar a $[DNA]=10ng/\mu L$, ya que esta es la dilución recomendada para la genotipificación mediante PCR tiempo real.

Finalmente se corroboró la integridad del DNA de cada una de las muestras en un gel de agarosa al 1%, ya que el cociente 260/280 nm únicamente nos habla de su pureza, pero no de su integridad. En la Figura 8 se observa un ejemplo de gel de agarosa mediante el cual se corrobora la integridad del DNA de las muestras.

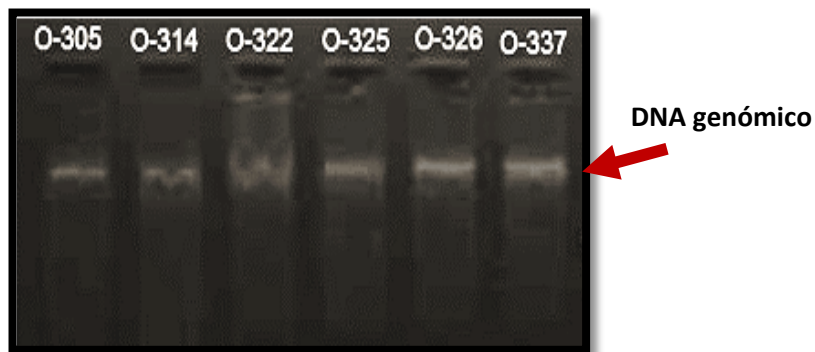


Figura 8. Gel de integridad de DNA. Gel de agarosa al 1% en TBE 0.5X teñido con Gel RED. En la parte superior del pozo se indica el nombre de la muestra. Se cargaron 40 ng de DNA de cada una.

7.3 Genotipificación

Con la certeza de la integridad del DNA de las muestras, se procedió a realizar la genotipificación mediante PCR tiempo real con sondas TaqMan, tal y como se describe en materiales y métodos, de los seis SNPs de los genes de APLN, APLNR y MTHFR. En la Figura 9 se muestra un gráfico de dispersión correspondiente a la genotipificación de diversas muestras para el SNP rs10501367 del gen APLNR.

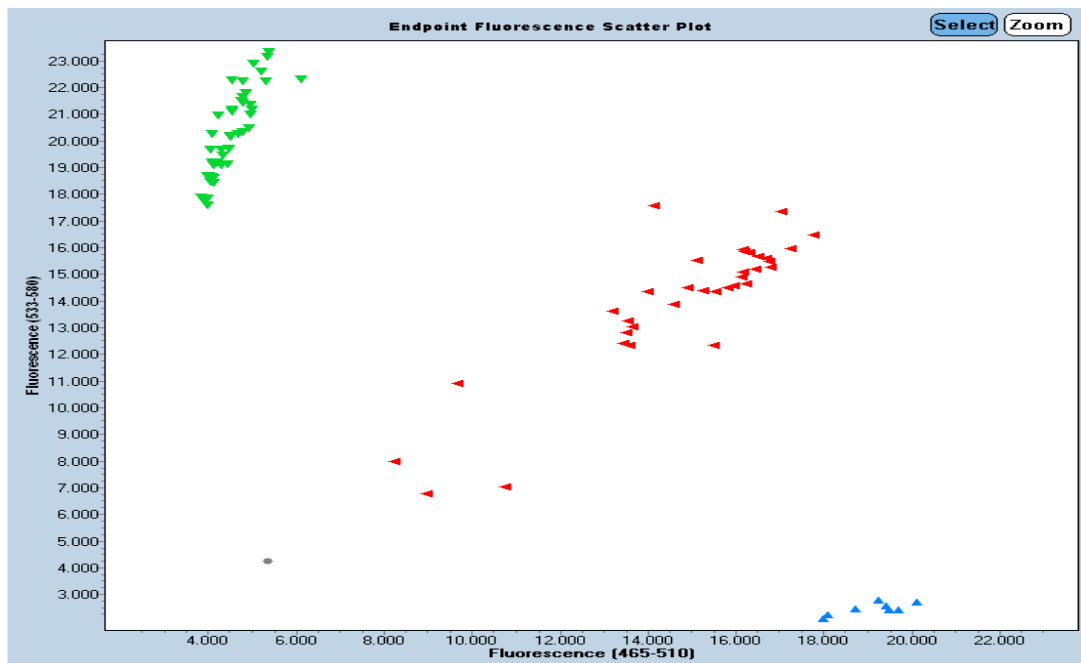


Figura 9. Genotipificación de diversas muestras para el polimorfismo rs10501367 por PCR en tiempo real. Se puede observar los genotipos homocigotos CC en color verde y TT en color azul, así como los heterocigotos en color rojo al centro del gráfico. En el extremo inferior izquierdo se observa el control negativo en gris.

7.4 Equilibrio de Hardy-Weinberg

Una vez obtenido el genotipo de cada muestra, se pudo calcular el equilibrio de Hardy-Weinberg que establece que la composición genética de una población

permanece en equilibrio mientras no actúe la selección natural ni ningún otro factor y no se produzca ninguna mutación. Los resultados se muestran en la Tabla 5; donde se puede observar que ambas poblaciones de estudio (controles y HT) se encuentran en equilibrio.

Tabla 5. Equilibrio de Hardy-Weinberg de las poblaciones estudiadas

Gen	SNP	Frecuencia genotípica			Equilibrio H-W	
		AA	CA	CC		
APLN	rs3761581					
	Controles	155	21	2	0.202	
	HT	158	19	1	0.465	
	rs56204867		AA	AG	GG	
	Controles	155	21	2	0.202	
	HT	159	18	1	0.431	
APLNR	rs7119375		GG	GA	AA	
	Controles	98	68	12	1.000	
	HT	100	66	12	0.842	
	rs10501367		CC	CT	TT	
	Controles	96	69	13	0.85	
	HT	100	66	12	0.842	
MTHFR	rs13306560		GG	GA	AA	
	Controles	166	12	0	1.000	
	HT	170	8	0	1.000	
	rs1801133		CC	CT	TT	
	Controles	44	88	46	0.881	
	HT	30	99	49	0.128	

7.5 Frecuencias genotípicas, frecuencias alélicas y razón de Momios

Posteriormente, con los resultados de la genotipificación, se calcularon frecuencias genotípicas y alélicas de cada SNP. Lo anterior junto con el ajuste proveniente de la regresión logística multinomial, dan la posibilidad de analizar la asociación de los polimorfismos de estudio con la hipertensión arterial esencial. Los

resultados se muestran a continuación (Tabla 6); una p significativa ($p < 0.05$) indica asociación del SNP con la presencia de HT esencial.

Tabla 6. Asociación de los polimorfismos de estudio con hipertensión arterial esencial en mujeres mestizas yucatecas postmenopáusicas

	Genotipos (%)					Dominante		Recesivo		Aditivo	
						OR (95% IC)	P	OR (95% IC)	P	OR (95% IC)	P
APLN / rs3761581											
	CC	CA	AA	A *	C						
Controles	2 (0.01)	21 (0.12)	155 (0.87)	0.93	0.07	0.86	0.675	1.159	0.675	0.826	0.545
HT	1 (0.01)	19 (0.11)	158 (0.89)	0.94	0.06	(0.433 - 1.720)		(0.581 - 2.311)		(0.445 - 1.534)	
APLN / rs56204867											
	AA	AG	GG	A *	G						
Controles	155 (0.87)	21 (0.12)	2 (0.01)	0.93	0.07	0.839	0.622	1.192	0.622	0.808	0.502
HT	159 (0.89)	18 (0.10)	1 (0.01)	0.94	0.06	(0.418 - 1.684)		(0.594 - 2.391)		(0.433 - 1.507)	
APLNR / rs7119375											
	GG	GA	AA	G *	A						
Controles	98 (0.55)	68 (0.38)	12 (0.07)	0.74	0.26	0.952	0.830	1.051	0.830	1.006	0.976
HT	100 (0.56)	66 (0.37)	12 (0.07)	0.75	0.25	(0.604 - 1.499)		(0.677 - 1.655)		(0.698 - 1.499)	
APLNR / rs10501367											
	TT	TC	CC	C *	T						
Controles	13 (0.07)	69 (0.39)	96 (0.54)	0.73	0.27	0.906	0.671	1.103	0.671	0.967	0.856
HT	12 (0.07)	66 (0.37)	100 (0.56)	0.75	0.25	(0.575 - 1.427)		(0.701 - 1.738)		(0.672 - 1.391)	
MTHFR / rs13306560											
	AA	AG	GG	G *	A						
Controles	0 (0)	12 (0.07)	166 (0.93)	0.97	0.03	0.653	0.403	1.532	0.403	0.653	0.403
HT	0 (0)	8 (0.04)	170 (0.96)	0.98	0.02	(0.240 - 1.775)		(0.563 - 4.166)		(0.240 - 1.775)	
MTHFR / rs1801133											
	TT	TC	CC	C *	T						
Controles	46 (0.26)	88 (0.49)	44 (0.25)	0.49	0.51	1.76	0.051	0.569	0.051	1.305	0.113
HT	49 (0.28)	99 (0.56)	30 (0.17)	0.45	0.55	(0.997 - 3.097)		(0.323 - 1.003)		(0.939 - 1.814)	

OR = razón de Momios

Se analizaron bajo los modelos de herencia dominante, recesivo y aditivo. En ningún modelo se observó asociación de los SNPs con la presencia de HT esencial.

7.6 Desequilibrio de ligamiento y haplotipos

Cuando se encuentra una asociación entre el SNP y la presencia de HT esencial, se procede a calcular el desequilibrio de ligamiento (DL), el cual se refiere a la característica de algunos genes (en este caso SNPs) de no segregar de forma independiente; y suele deberse a que los dos marcadores genéticos implicados se encuentran muy cercanos (en el mismo cromosoma). Por lo tanto, nos dice si los haplotipos de los SNPs de un mismo gen, se heredan juntos (en bloque). Un haplotipo es una combinación de alelos de diferentes loci de un cromosoma que son transmitidos juntos, en este caso una pareja de SNPs en un cromosoma.

Como resultado se obtiene una r^2 y una D' , cuando ambas son cercanas a 1, quiere decir que ambos SNPs (ese haplotipo en particular) se heredan juntos. Y cuando se encuentra que cierto haplotipo tiene correlación, entonces se procede a calcular la frecuencia de ese haplotipo y su asociación con la presencia de la enfermedad. Lo anterior se puede observar en la Tabla 7 y Tabla 8. Haplotipos con una frecuencia menor a 0.05 fueron excluidos.

Tabla 7. Desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos de los genes APLN, APLNR y MTHFR

APLN				
			Haplotipos	Frecuencia
rs3761581	D' =	1.0	AA	0.935
rs56204867	LOD =	59.05	CG	0.063
	r ² =	0.977		
APLNR				
			Haplotipos	Frecuencia
rs10501367	D' =	0.993	CG	0.739
rs7119375	LOD =	124.5	TA	0.254
	r ² =	0.964		
MTHFR				
			Haplotipos	Frecuencia
rs1801133	D' =	0.857	TG	0.527
rs13306560	LOD =	2.67	CG	0.445
	r ² =	0.024	CA	0.026

Tabla 8. Asociación de los haplotipos de los genes APLN, APLNR y MTHFR con la presencia de hipertensión arterial esencial en mujeres mestizas yucatecas postmenopáusicas

Haplotipos	p
APLN	0.546
APLNR	0.788
MTHFR	0.018

7.7 Nuevo cálculo del tamaño de muestra

Posteriormente, se calculó el poder estadístico alcanzado con el tamaño final de muestras, así como el tamaño de muestra necesario para alcanzar un poder

estadístico de 0.8 y lograr ver una asociación o no de los SNPs con la presencia de HT esencial. Para ello se utilizaron las frecuencias alélicas y la razón de Momios obtenida de la regresión logística multinomial. Los resultados se muestran a continuación.

Tabla 9. Cálculo del tamaño de muestra y poder estadístico

SNP	Modelo de herencia	Riesgo poblacional	Frecuencia alélica	OR	Poder estadístico	Tamaño de muestra para PE = 0.8
rs3761581	Dominante			0.86	0.074	6 645
	Recesivo	0.6	0.06	1.159	0.051	204 480
	Aditivo			0.826	0.094	3 762
rs56204867	Dominante			0.839	0.083	4 899
	Recesivo	0.6	0.06	1.192	0.051	144 889
	Aditivo			0.808	0.104	3 022
rs7119375	Dominante			0.952	0.056	26 348
	Recesivo	0.6	0.25	1.051	0.052	108 777
	Aditivo			1.006	0.050	> 1 000 000
rs10501367	Dominante			0.906	0.075	6 540
	Recesivo	0.6	0.25	1.103	0.056	28 143
	Aditivo			0.967	0.054	37 117
rs13306560	Dominante			0.653	0.124	2 229
	Recesivo	0.6	0.02	1.532	0.051	229 936
	Aditivo			0.653	0.127	2 164
rs1801133	Dominante			1.76	0.578	300
	Recesivo	0.6	0.55	0.569	0.689	232
	Aditivo			1.305	0.421	450

OR = razón de Momios

7.8 Comparación con otras poblaciones

Finalmente, y aunque no era parte de nuestros objetivos, realizamos una comparación de nuestros resultados con los de otras poblaciones. En particular, del polimorfismo rs1801133, ya que su comportamiento a nivel mundial es generalmente como factor de riesgo (Yang et al., 2014), excepto en poblaciones

mexicanas (Pérez-Razo et al., 2015), como se puede observar en la Tabla 10. No obstante, también podemos observar en la Tabla 11, que aún en poblaciones mexicanas, las frecuencias genotípicas y alélicas no son las mismas.

Tabla 10. Asociación del polimorfismo rs1801133 del gen MTHFR con hipertensión arterial en diferentes poblaciones mundiales

Mestiza-Maya	Mestiza-Mexicana	Caucásica
<u>Dominante</u>	<u>Aditivo</u>	<u>Dominante</u>
1.76 (0.997 - 3.097) p= 0.051	0.768 (0.624 - 0.947) p= 0.0133	1.19 (1.02 - 1.40) p= 0.031
<u>Recesivo</u>		<u>Recesivo</u>
0.569 (0.323 - 1.003) p= 0.051		1.42 (1.10 - 1.84) p= 0.008
Asiática	China	India-Turka
<u>Dominante</u>	<u>Dominante</u>	<u>Dominante</u>
1.47 (1.28 - 1.68) p= 0.000	1.52 (1.34 - 1.71) p= 0.000	2.22 (1.28 - 3.83) p= 0.004
<u>Recesivo</u>	<u>Recesivo</u>	<u>Recesivo</u>
1.37 (1.12 - 1.68) p= 0.002	1.45 (1.24 - 1.70) p= 0.000	8.58 (2.20 - 33.53) p= 0.002

Se reportan los valores de la razón de Momios, del intervalo de confianza al 95% y de p .

Tabla 11. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos rs13306560 y rs1801133 del gen MTHFR en dos diferentes poblaciones mexicanas

	Frecuencias genotípicas			Frecuencias alélicas		
	rs13306560	GG	GA	AA	G	A
Mestiza-Mexicana						
Controles		98.2	1.8	0	99	0.99
HT		92.7	7.3	0	96.3	3.7
Mestiza-Maya						
Controles		93	7	0	97	3
HT		96	4	0	98	2
	rs1801133	CC	CT	TT	C	T
Mestiza-Mexicana						
Controles		23	51.2	25.7	48.5	51.48
HT		30	46.6	23.3	53	46.9
Mestiza-Maya						
Controles		25	49	26	49	51
HT		17	56	28	45	55

La Figura 10 muestra las frecuencias alélicas de este SNP a nivel mundial. Podemos observar que las frecuencias más altas se encuentran en Europa, en el este de Asia y en México. Sin embargo, y con respecto al polimorfismo, estas poblaciones se comportan de manera diferente.

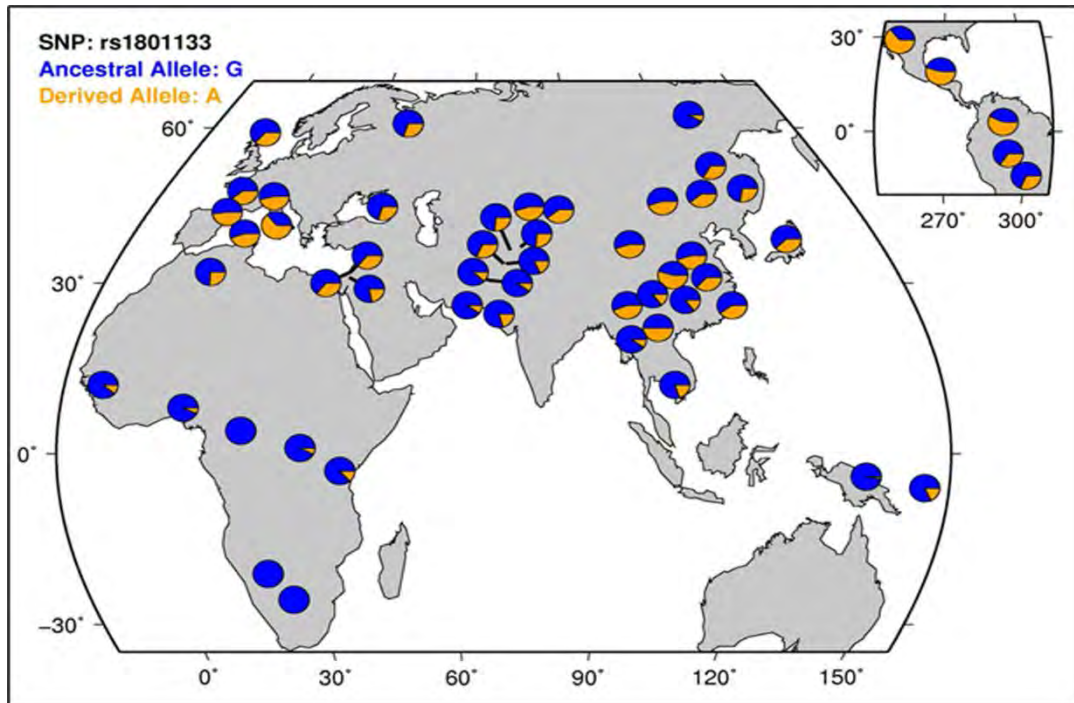


Figura 10. Frecuencias alélicas del polimorfismo rs1801133 en todo el mundo. Se observan las frecuencias de los alelos G y A del polimorfismo rs1801133 en todo el mundo, utilizando los datos del HapMap así como SNP genotificados en la plataforma Illumina y la base de datos Entrez. Se indica el alelo ancestral en color amarillo. Referencia: <http://hgdp.uchicago.edu/cgi-bin/alfreqs.cgi?pos=11778965&chr=chr1&rs=rs1801133&imp=false>

Los polimorfismos de los genes APLN y APLNR los comparamos entre dos poblaciones mexicanas distintas, mestiza-mexicana (Esteban-Martínez et al., 2016) y mestiza-maya. En este caso, se puede observar en la Tabla 12, que ambas poblaciones mexicanas se comportan diferente ante la presencia de los polimorfismos, ya que nosotros no encontramos asociación de estos SNPs con la

HT esencial en población mestiza-maya, pero si la hay en población mestiza-mexicana. En cuanto a las frecuencias genotípicas y alélicas, éstas son muy similares entre sí.

Tabla 12. Asociación de los polimorfismos rs7119375 y rs10501367 del gen APLNR con hipertensión arterial esencial en dos diferentes poblaciones mexicanas

	Frecuencias genotípicas			Frecuencias alélicas		OR (95% IC)	P
	rs7119375	GG	GA	AA	G		
Mestiza-Maya							
Controles	55	38	7	74	26	1.006	0.976
HT	56	37	7	75	25	(0.698 - 1.499)	
Mestiza-Mexicana							
Controles	51.2	42	6.8	72.2	27.8	0.717	0.039
HT	58.5	36.5	5	76.8	23.2	(0.522 - 0.984)	
	rs10501367	TT	TC	CC	C	T	
Mestiza-Maya							
Controles	7	39	54	73	27	0.967	0.856
HT	7	37	56	75	25	(0.672 - 1.391)	
Mestiza-Mexicana							
Controles	7.8	41.7	50.5	71.4	28.6	0.703	0.029
HT	5.5	36.3	58.2	76.4	23.6	(0.512 - 0.964)	

OR = razón de Momios

8. DISCUSIÓN

Se sabe que la HT es el principal factor de riesgo de morbilidad y mortalidad por enfermedad cardiovascular en la mujer postmenopáusica, afectando aproximadamente al 60% de las mujeres mayores de 65 años de edad (Aranda-Lara P et al. 2003; Rosas M et al. 2004; ENSANUT 2012). Esto es prácticamente el doble de la media de la prevalencia nacional en 2012 (Secretaría de Salud, Gobierno de México. Informe la salud de los mexicanos 2015). Esto sugiere que la

falta de estrógenos desempeña un papel importante en el desarrollo de la HT (Lima et al. 2012; Martell et al. 2002; Aranda-Lara et al. 2003).

En este estudio se analizaron 356 muestras de DNA de mujeres postmenopáusicas de origen étnico mestizo-maya, que tienen al menos un apellido maya y con residencia en la península de Yucatán. Población que ha sido estudiada por nuestros grupos de trabajo en estudios relacionados con polimorfismos genéticos y preeclampsia (Canto P et al., 2008; Canto et al., 2007), y con densidad mineral ósea (Canto et al., 2015; Canto et al., 2013).

De acuerdo a los datos clínicos y demográficos de las mujeres control y HT incluídas, se encontró una diferencia significativa en lo que se refiere a “Edad”, “Dislipidemias”, “Tiempo de menopausia”, “Ejercicio” y “Consume alcohol”. Es importante tomar en cuenta estos parámetros ya que se consideran que son condicionantes de HT, es decir, pueden estar actuando como factores confusores en la asociación de los SNPs con la HT esencial.

Cabe mencionar, que en lo que respecta al parámetro “Consume alcohol”, el grupo control presenta un porcentaje mayor. Por lo mismo se consideró que sería necesario tener una evaluación más precisa de esta característica para futuras investigaciones.

Con respecto al parámetro “Ejercicio”, aunque ambos grupos mostraron una diferencia estadísticamente significativa, no se tomó en cuenta para la regresión logística multinomial, ya que sólo un paciente del grupo control realizaba esta actividad contra 60 pacientes del grupo HT que realizaban ejercicio, lo que podría

resultar en un sesgo en el análisis estadístico. De hecho, el ejercicio bien controlado en pacientes con HT, se ha considerado como parte del tratamiento para la enfermedad (Vamvakis et al., 2017).

Con el fin de determinar la posible influencia de los diferentes polimorfismos con la presencia de HT esencial, los diferentes genotipos y las covariantes que resultaron significativamente diferentes entre los grupos HT y controles, se analizaron mediante un modelo de regresión logística multinomial bajo los modelos de herencia dominante, recesivo y aditivo. A partir de este análisis, no se encontró ninguna asociación de ninguno de los polimorfismos bajo ningún modelo de herencia con la presencia de HT esencial, es decir, que con el tamaño de muestra alcanzado y los cálculos realizados, no se encuentra asociación de los SNPs con la presencia de HT esencial en mujeres mestizas yucatecas postmenopáusicas. Esto puede ser debido a que el tamaño de muestra alcanzado, no es suficiente, como mencionará más adelante. Del mismo modo, las poblaciones de estudio (controles y HT), se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg con respecto a cada polimorfismo de los tres genes de estudio.

Con respecto a los polimorfismos rs1801133 y rs13306560 del gen MTHFR, aunque no se encontró una asociación estadísticamente significativa de sus genotipos con la presencia de la enfermedad, sin embargo, cabe destacar que la significancia obtenida con el rs1801133 ($p= 0.051$) sugiere una tendencia a estar asociado con la HT esencial. Por tal motivo sería necesario, en este caso, incrementar el tamaño de muestra.

Estudios previos por nuestro grupo de trabajo (Pérez-Razo et al., 2015) han mostrado que el alelo T del polimorfismo rs1801133 se ha asociado con protección ($p= 0.0133$, OR= 0.768) en población mestiza-mexicana que es originaria principalmente del centro del país. No obstante, se sabe que la presencia del alelo 677T del gen MTHFR produce una enzima termolábil por el cambio de un residuo de alanina por uno de valina, a su vez asociado a un nivel alto de homocisteína total en plasma (Frosst et al., 1995; Ueland et al., 2001). Este mismo polimorfismo se ha asociado a un mayor riesgo de padecer la enfermedad en poblaciones asiáticas, caucásicas e indias (Yang et al., 2014).

Este diferente efecto del polimorfismo, se ha tratado de explicar en función de la dieta del mexicano que es rica en folatos (Guéant-Rodríguez et al., 2006). Estos investigadores proponen que este consumo de folatos puede ejercer una selección positiva del genotipo TT. Adicionalmente, reportaron una de las más altas frecuencias del alelo 677T y no correlación del genotipo homocigoto TT con niveles totales de homocisteína en sujetos de la Ciudad de México.

Consistente con esta hipótesis, un estudio previo de nuestro grupo, mostró que varias poblaciones amerindias tienen una alta frecuencia del alelo 677T (Juárez-Velázquez et al., 2010). Igualmente, es acorde con lo reportado a nivel mundial (<http://hgdp.uchicago.edu/cgi-bin/alfreqs.cgi?pos=11778965&chr=chr1&rs=rs1801133&imp=false>).

Con respecto al polimorfismo rs13306560, en un estudio realizado en población mestiza-mexicana adulta (Pérez-Razo et al., 2015), se mostró que la presencia del alelo A a -23pb del sitio de inicio de la transcripción, se asoció significativamente con un elevado riesgo de padecer la enfermedad ($p= 0.0003$,

OR= 4.281). Por otra parte, en el mismo trabajo, se mostró que este polimorfismo afecta la actividad reguladora del promotor del gen.

Otro dato que es interesante con respecto a estos polimorfismos rs1801133 y rs13306560 del gen MTHFR, es el comportamiento de las frecuencias alélicas y genotípicas en ambas poblaciones mexicanas, mestiza-mexicana (Pérez-Razo et al., 2015) y mestiza-maya. Las frecuencias genotípicas de ambos SNPs se encuentran distintas en las dos poblaciones, por ejemplo para el SNP rs13306560, el genotipo GG se encuentra más frecuente en el grupo control de la población mestiza-mexicana y por el contrario, más frecuente en el grupo HT de la población mestiza-maya, aunque en ambas poblaciones está ausente el genotipo AA. No obstante, el alelo A, que es el alelo variante, se encuentra más frecuente en el grupo HT de la población mestiza-mexicana, y al contrario en la población mestiza-maya. Como se mencionó anteriormente, Pérez-Razo et al. (2015) reportó este alelo como factor de riesgo de padecer HT en la población mestiza-mexicana ($p= 0.0003$, OR= 4.281); no obstante, en el presente estudio no se encontró asociación.

En cuanto al SNP rs1801133, las frecuencias genotípicas y alélicas en el grupo control de ambas poblaciones es muy similar, pero no es así en grupo HT. El alelo variante T, se encuentra más frecuente en el grupo HT de la población de estudio, caso contrario a Pérez-Razo et al. (2015), que lo encontró más frecuente en el grupo control de la población mestiza-mexicana, lo cual es consistente con el hallazgo de dicho alelo como factor de protección en esta población ($p= 0.0133$, OR= 0.768).

Es interesante ver que dos poblaciones mexicanas se comportan diferente. Esto es debido a que en México, nuestras poblaciones tienen un acervo genético distinto, determinado por el mestizaje que se dio entre las distintas etnias mexicanas con los españoles y algunos grupos de origen africano (Guéant-Rodríguez et al., 2006). Por lo que no se puede esperar que se comporten de la misma manera y por lo tanto que los resultados de una población se puedan extrapolar a otra.

En referencia a los polimorfismos rs3761581 y rs56204867 del gen APLN, rs7119375 y rs105051367 del gen APLNR, estudios realizados por varios investigadores (Li et al., 2009; Li et al., 2015; Niu et al., 2010; Liu et al., 2014) han asociado dichos polimorfismos de los genes APLN y APLNR, como factor de riesgo de padecer HT esencial en población Han China.

En nuestro grupo de trabajo, Esteban-Martínez et al. (2016) encontraron una asociación como factor de protección de los SNPs rs7119375 ($p= 0.039$, OR= 0.717) y rs105051367 ($p= 0.029$, OR= 0.703) del gen APLNR con la presencia HT esencial bajo un modelo de herencia aditivo en población mestiza-mexicana; no estando asociados los polimorfismos rs3761581 y rs56204867 del gen APLN.

Como se mencionó anteriormente, en la población de mujeres mestizas-mayas postmenopáusicas, no se encontró una asociación significativa de dichos polimorfismos de los genes APLN y APLNR con HT esencial. Esto pudo deberse a un tamaño de muestra no suficiente.

No obstante, al comparar las dos poblaciones mexicanas, mestiza-maya y mestiza-mexicana (Esteban-Martínez et al., 2016), con respecto a los polimorfismos

del gen *APLNR*, se puede observar que las frecuencias genotípicas y alélicas en ambas poblaciones son muy parecidas, por ejemplo, para el SNP rs7119375 el alelo variante A, se encuentra más frecuente en el grupo control de ambas poblaciones. Lo mismo ocurre con el alelo variante T del SNP rs10501367.

Por otro lado, los polimorfismos analizados en el presente estudio, se encuentran muy cercanos entre sí en el caso de *APLN* y *APLNR*; en el caso del *MTHFR*, un SNP se encuentra en el promotor del gen, y otro en el exón 4. Por lo tanto, es importante calcular el desequilibrio de ligamiento, el cual nos dice si estos polimorfismos de cada gen segregan de forma independiente o no, y por lo tanto, si los haplotipos de los SNPs de un mismo gen, se heredan juntos (en bloque). En nuestra población de estudio, los polimorfismos de cada gen se encuentran en equilibrio.

En el estudio que llevó a cabo Esteban-Martínez et al. (2016), en población mestiza-mexicana, encontró que ciertos haplotipos resultantes de los SNPs del gen *APLNR*, también mostraban asociación estadística con HT esencial (haplotipo GC $p= 0.026$, OR= 1.292, 95% IC= 1.03-1.62; haplotipo AT $p= 0.032$, OR= 0.779, 95% IC= 0.62-0.98).

Si en este estudio, se hubiese encontrado una asociación entre los SNPs con HT esencial, entonces sería relevante buscar la asociación de los haplotipos con HT esencial, ya que además de que un alelo de un polimorfismo pueda ser factor de riesgo o protección, lo es también la combinación en la que estos alelos de diferentes polimorfismos se pudieran presentar. Sin embargo, dado que no se

encontró ninguna asociación de los SNPs con HT esencial, los resultados de la asociación de los haplotipos con HT esencial son irrelevantes.

Finalmente, al igual que no se encontró ninguna asociación de ningún SNP bajo ningún modelo de herencia con HT esencial, tampoco se alcanzó el poder estadístico ≥ 0.8 en ninguno de los casos. No obstante, el SNP rs1801133 del gen MTHFR requiere tamaños de muestra mucho más pequeños en los tres modelos de herencia, en comparación con los otros SNPs, para alcanzar un poder estadístico de 0.8; esto debido a la alta frecuencia alélica (0.55) y al riesgo poblacional (0.6).

Por lo tanto, se puede especular que si se alcanza el tamaño de muestra requerido, entonces se pueda observar una asociación de este SNP con la presencia de HT esencial en mujeres mestizas yucatecas postmenopáusicas, esto debido a los valores de p obtenidos en los modelos de herencia dominante y recesivo ($p= 0.051$). Sin embargo, lo que no se puede especular es si esta asociación sería de riesgo o de protección.

Con respecto a los otros SNPs, analizando el poder estadístico alcanzado; el tamaño de muestra requerido; los valores de la razón de Momios, IC y p encontrados; podemos inferir que no hay asociación de estos con HT esencial en mujeres mestizas yucatecas postmenopáusicas.

9. CONCLUSIONES

No se encontró asociación de los polimorfismos rs3761581 y rs56204867 del gen APLN, rs7119375 y rs10501367 del gen APLNR, rs13306560 y rs1801133 del gen MTHFR y/o sus haplotipos con la presencia de HT esencial en mujeres postmenopáusicas de origen étnico mestizo-maya.

Analizando un mayor número de muestras, podría establecerse una asociación (riesgo/protección) del SNP rs1801133 del gen MTHFR con HT esencial.

Los polimorfismos se asocian de manera diferente en poblaciones diferentes, lo cual podría estar relacionado con factores genéticos y medio ambientales.

Es necesario realizar estudios más a profundidad con el fin de identificar las mejores variantes que se asocian a la enfermedad en diferentes poblaciones aún dentro de un mismo país.

10. LITERATURA CITADA

- Aranda-Lara P, Aranda-Lara FJ, Aranda-Granados PJ. (2003). Hipertensión arterial y menopausia: aspectos fisiopatológicos y terapéuticos. *Gac Med Bilbao* 100:85-92.
- Barquera S, Campos-Nonato I, Hernández-Barrera L, [et al]. (2010). Hypertension in Mexican adults: results from the National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Publica Mex*; 52 suppl 1:S63-S71.
- Barrett JC, Fry B, Maller J and Daly MJ. (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 21(2):263-265.
- Binia A, Contreras A, Canizales-Quinteros S, [et al]. (2014). Geographical and ethnic distribution of single nucleotide polymorphisms within genes of the folate/homocysteine pathway metabolism. *Genes Nutr*. 9:421.
- Burt VL, Whelton P, Roccella EJ, [et al]. (1995). Prevalence of hypertension in the US adult population: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey 1988-1991. *Hypertension*. 25(3):305-313.
- Calhoun DA, Bakir SE and Oparil S. (2003). Etiology and pathogenesis of essential hypertension. En: Crawford MH, DiMarco JP, eds. *Cardiology*. London: Mosby International. 3.1-3.10.
- Campos-Nonato I, Hernández-Barrera L, Rojas-Martínez R, [et al]. (2013). Hipertensión arterial: prevalencia, diagnóstico oportuno, control y tendencias en adultos mexicanos. *Salud Pública Méx*. 55(2):S144-S150.
- Carretero OA and Oparil S. (2000). Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation*. 101(3):329-335.

- Canto Cetina T, Canizales Quinteros S, de la Chesnaye E, [et al]. (2007). Analysis of C-870T and G-308^a polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha gene in Maya-Mestizo women with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 26(3): 283- 291.
- Canto Cetina T, Cetina Manzanilla JA, González Herrera L, [et al]. (2015). VDR polymorphisms are associated with bone mineral density in post-menopausal Mayan-Mestizo women. *Ann Hum Biol*. 42(5): 470- 475.
- Canto Cetina T, Polanco Reyes L, González Herrera L, [et al]. (2013). Polymorphisms of LRP5, but not TNFRSF11B, is associated with a decrease in bone mineral density in postmenopausal Maya-Mestizo women. *Am J Hum Biol*. 25(6): 713- 718.
- Canto P, Canto Cetina T, Juárez Velázquez R, [et al]. (2008). Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and glutathione S-transferase P1A313G are associated with a reduced risk of preeclampsia in Maya-Mestizo women. *Hypertens Res*. 31(5): 1015- 1019.
- Caulfield M, Munroe P, MRC British Genetics of Hypertension Study, [et al]. (2003). Genome-wide mapping of human loci for essential hypertension. *Lancet*. 361(9375):2118 -2123.
- Chandrasekaran B, Dar O and McDonagh T. (2008). The role of apelin in cardiovascular function and heart failure. *Eur J Heart Fail*. 10(8):725–732.
- Charles CJ, Rademaker MT and Richards AM. (2006). Apelin-13 induces a biphasic haemodynamic response and hormonal activation in normal conscious sheep. *J Endocrinol*. 189 (3):701–710.
- Charles CJ. (2007). Putative role for apelin in pressure/volume homeostasis and cardiovascular disease. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 5(1):1–10.

- Chen MM, Ashley EA, Deng DX, [et al]. (2003). Novel role for the potent endogenous inotrope apelin in human cardiac dysfunction. *Circulation*. 108(12):1432-1439.
- Chobanian AV and Hill M. (2000). National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop on Sodium and Blood Pressure: A critical review of current scientific evidence. *Hypertension*. 35(4):858-863.
- Conen D, Cheng S, Steiner LL, [et al]. (2009). Association of 77 polymorphisms in 52 candidate genes with blood pressure progression and incident hypertension: the Women's Genome Health Study. *J Hypertens*. 27(3):476-483.
- Esteban-Martínez RL, Pérez-Razo JC, Vargas-Alarcón G, [et al]. (2016). Polymorphisms of *APLN-APLNR* system are associated with essential hypertension in Mexican-Mestizo individuals. *Exp Mol Pathol*. 101(1):105-109.
- Falcão-Pires I, Ladeiras-Lopes R and Leite-Moreira AF. (2010). The apelinergic system: A promising therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets*. 14(6):633-645.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, [et al]. (1995). A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*. 10(1):111-113.
- Gamboa-A R. (2006). Fisiopatología de la hipertensión arterial esencial. *Acta Med Per*. 23(2):76-82.
- Guéant-Rodríguez RM, Guéant JL, Debard R, [et al]. (2006). Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr*. 83(3):701-707.

- Gorodezky C, Alaez C, Vázquez-García MN, [et al]. (2001). The genetic structure of Mexican Mestizos of different locations: tracking back their origins through MHC genes, blood group systems, and microsatellites. *Hum Immunol*. 62(2):979-991.
- Harrap SB. (1996). An appraisal of the genetic approaches to high blood pressure. *J Hypertens Suppl*. 14(5):S111-S115.
- Harrison M, Maresso K and Broeckel U. (2008). Genetic determinants of hypertension: an update. *Curr Hypertens Rep*. 10(6):488-495.
- Hong Y, de Faire U, Heller DA, [et al]. (1994). Genetic and environmental influences on blood pressure in elderly twins. *Hypertension*. 24(6):663-670.
- <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks>
- <http://hgdp.uchicago.edu/cgi-bin/alfreqs.cgi?pos=11778965&chr=chr1&rs=rs1801133&imp=false>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>
- Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT). Resultados nacionales.
- <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>
- Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT). Evidencia para la política pública en salud. Hipertensión arterial en adultos mexicanos: importancia de mejorar el diagnóstico oportuno y el control. <http://ensanut.insp.mx/doctos/analiticos/HipertensionArterialAdultos.pdf>
- Irmak MK and Sizlan A. (2006). Essential hypertension seems to result from melatonin-induced epigenetic modifications in area postrema. *Med Hypotheses*. 66(5):1000-1007.

- Jiang S, Yu Y, Venners SA, [et al]. (2011). Effects of MTHFR and MS gene polymorphisms on baseline blood pressure and Benazepril effectiveness in Chinese hypertensive patients. *J Hum Hypertens.* 25(3):172-177.
- Johnson RJ, Herrera-Acosta J, Schreiner GF and Rodriguez-Iturbide B. (2002). Subtle acquired renal injury as a mechanism of salt-sensitive hypertension. *N Engl J Med.* 346(12):913-923.
- Juárez-Velázquez R, Canto P, Canto-Cetina T, [et al]. (2010). Analysis of polymorphisms in genes (AGT, MTHFR, GPIIIa, and GSTP1) associated with hypertension, thrombophilia and oxidative stress in Mestizo and Amerindian populations of Mexico. *Dis Markers.* 28(5):323-331.
- Kagiya S, Fukuhara M, Matsumura K, [et al]. (2005). Central and peripheral cardiovascular actions of apelin in conscious rats. *Regul Pept.* 125(1-3):55–59.
- Kahleová R, Palyzová D, Zvára K, [et al]. (2002). Essential hypertension in adolescents: association with insulin resistance and with metabolism of homocysteine and vitamins. *Am J Hypertens.* 15(10 Pt 1):857-864.
- Kannel WB, Garrison RJ and Dannenberg AL. (1993). Secular trends in blood pressure in normotensive persons: the Framingham Study. *Am Heart J.* 125(4):1154-1158.
- Kleinz MJ, Skepper JN and Davenport AP. (2005). Immunocytochemical localisation of the apelin receptor, APJ, to human cardiomyocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells. *Regul Pept.* 126(3):233–240.
- Kunes J and Zicha J. (2009). The interaction of genetic and environmental factors in the etiology of hypertension. *Physiol Res.* 58 Suppl 2:S33-S41.

- Li J, Feng M, Wang Y, [et al]. (2015). The relationship between three X-linked genes and the risk for hypertension among northeastern Han Chinese. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 16(4):1321-1328.
- Li WW, Niu WQ, Zhang Y, [et al]. (2009). Family-based analysis of apelin and AGTRL1 gene polymorphisms with hypertension in Han Chinese. *J Hypertens.* 27(6):1194–1201.
- Lim SS, Vos T, Flaxman AD, [et al]. (2012). A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 380(9859):2224-2260.
- Lima R, Wofford M, and Reckelhoff JF. (2012). Hypertension in postmenopausal women. *Curr Hypertens Rep.* 14(3):254-260.
- Lisker R, Ramirez E, Perez-Briceño RP, [et al]. (1990). Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican urban centers. *Hum Biol.* 62(6):791–801.
- Liu R, Zhao H, Wang Y, [et al]. (2014). The contributory role of angiotensin receptor-like 1 gene multiple polymorphisms in hypertension among northeastern Han Chinese. *PLoS One.* 9(1):e86095.
- Luft FC. (2000). Molecular genetics of human hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 9(3):259-266.
- Luft FC. (2001). Twins in cardiovascular genetic research. *Hypertension.* 37(2 Pt 2):350 –356.
- Markan S, Sachdeva M, Sehrawat BS, [et al]. (2007). MTHFR 677 CT/MTHFR 1298 CC genotypes are associated with increased risk of hypertension in Indians. *Mol Cell Biochem.* 302(1-2):125-131.

- Martell Claros N, Ruiz Fernández MD y Vivas Toro F. (2002). Menopausia e hipertensión arterial. *Hipertensión*. 19(8):351-358.
- Mein CA, Caulfield MJ, Dobson RJ and Munroe PB. (2004). Genetics of essential hypertension. *Hum Mol Genet*. 13(Spec No 1):R169-R175.
- Miller SA, Dykes DD and Polesky HF. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 16(3):1215.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Nicolson DJ, Dickinson HO, Campbell F and Mason JM. (2004). Lifestyle interventions or drugs for patients with essential hypertension: a systematic review. *J Hypertens*. 22(11):2043-2048.
- Niu W, Wu S, Zhang Y, [et al]. (2010). Validation of genetic association in apelin-AGTRL1 system with hypertension in a larger Han Chinese population. *J Hypertens*. 28(9):1854-1861.
- O'Dowd BF, Heiber M, Chan A, [et al]. (1993). A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene*. 136(1-2):355–360.
- Oparil S, Zaman MA and Calhoun DA. (2003). Pathogenesis of hypertension. *Ann Intern Med*. 139(9):761-776.
- Organización Mundial de la Salud. Información general sobre la hipertensión en el mundo. Una enfermedad que mata en silencio, una crisis de salud pública mundial. Día Mundial de la Salud 2013.
- [Apps.who.int/iris/bitstream/10665/87679/1/WHO_DCO_WHD_2013.2_spa.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/10665/87679/1/WHO_DCO_WHD_2013.2_spa.pdf)

- Organización Mundial de la Salud. Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles 2014. Cumplimiento de las nueve metas mundiales relativas a las enfermedades no transmisibles: una responsabilidad compartida.

apps.who.int/iris/bitstream/10665/149296/1/WHO_NMH_NVI_15.1_spa.pdf

- Pérez-Razo JC, Cano-Martínez LJ, Vargas-Alarcón G, [et al]. (2015). Functional Polymorphism rs13306560 of the MTHFR Gene Is Associated With Essential Hypertension in a Mexican-Mestizo Population. *Circ Cardiovasc Genet.* 8(4): 603-609.
- Province MA, Kardia SL, National Heart, Lung and Blood Institute Family Blood Pressure Program, [et al]. (2003). A metaanalysis of genome-wide linkage scans for hypertension: the National Heart, Lung and Blood Institute Family Blood Pressure Program. *Am J Hypertens.* 16(2):144 -147.
- Quazi R, Palaniswamy C and Frishman WH. (2009). The emerging role of apelin in cardiovascular disease and health. *Cardiol Rev.* 17(6):283–286.
- Roberts EM, Newson MJ, Pope GR, [et al]. (2009). Abnormal fluid homeostasis in apelin receptor knockout mice. *J Endocrinol.* 202(3):453–462.
- Rosas M, Pastelín G, Comité Institucional para el Estudio y Prevención de la Hipertensión Arterial Sistémica, [et al]. (2004). Hypertension guidelines in Mexico. *Arch Cardiol Mex.* 74(2):134-157.
- Secretaría de Salud, Gobierno de México. Informe sobre la salud de los mexicanos 2015. Diagnóstico general de la salud poblacional. Primera edición, 2015.

http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/64176/INFORME_LA_SALUD_DE_LOS_MEXICANOS_2015_S.pdf

- Seyedabadi M, Goodchild AK and Pilowsky PM. (2002). Site-specific effects of apelin-13 in the rat medulla oblongata on arterial pressure and respiration. *Auton Neurosci.* 101(1-2):32–38.
- Séptimo Informe del Comité Nacional Conjunto de los Estados Unidos de América sobre prevención, detección, evaluación y tratamiento de la hipertensión arterial (JNC 7). www1.paho.org/hq/documents/2010/JNC7_interactivo.pdf
- Sociedad Argentina de Hipertensión Arterial. (2012). Hipertensión arterial y menopausia. Artículo del 07 de marzo de 2012. www.saha.org.ar/hipertension-menopausia.php.
- Sole X, Guinó E, Valls J, [et al]. (2006). SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics.* 22(15):1928-1929.
- Stephens M and Donnelly P. (2003). A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet.* 73(5):1162-1169.
- Stevens G, Dias RH, Thomas KJ, [et al]. (2008). Characterizing the epidemiological transition in Mexico: national and subnational burden of diseases, injuries, and risk factors. *PLoS Med.* 5(6): e125.
- Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, [et al]. (1998). Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 251(2):471–476.

- Tatemoto K, Takayama K, Zou MX, [et al]. (2001). The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept.* 99(2-3):87-92.
- Timberlake DS, O'Connor DT and Parmer RJ. (2001). Molecular genetics of essential hypertension: recent results and emerging strategies. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 10(1):71-79.
- Tomaszewski M, Debiec R, Braund PS, [et al]. (2010). Genetic architecture of ambulatory blood pressure in the general population: insights from cardiovascular gene-centric array. *Hypertension.* 56(6):1069-1076.
- Tylicki L, Födinger M, Puttinger H, [et al]. (2005). Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in essential hypertension relation: with the development of hypertensive end-stage renal disease. *Am J Hypertens.* 18(11):1442-1448.
- Ueland PM, Hustad S, Schneede J, [et al]. (2001) Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci.* 22(4):195-201.
- Vamvakis A, Gkaliagkousi E, Triantafyllou A, [et al]. (2017). Beneficial effects of nonpharmacological interventions in the management of essential hypertension. *JRSM Cardiovasc Dis.* 6:1-6.
- Wang X, Snieder H. Familial aggregation of blood pressure. En: Flynn JT, Ingelfinger JR, Portman RJ, eds. *Clinical Hypertension and Vascular Diseases: Pediatric Hypertension.* 2nd ed. Totowa, NJ: Humana Press Inc; 2010a.
- Wang X and Snieder H. (2010). Genome-wide association studies and beyond: what's next in blood pressure genetics?. *Hypertension.* 56(6):1035-1037.

- Weder AB. (2007). Genetics and hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 9(3):217-223.
- Whitworth JA and 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(11):1983-1992.
- Wolf-Maier K, Cooper RS, Banegas JR, [et al]. (2003). Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European countries, Canada, and the United States. *JAMA*. 289(18):2363-2369.
- Yang KM, Jia J, Mao LN, [et al]. (2014). Methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism and essential hypertension: A meta-analysis of 10,415 subjects. *Biomed Rep*. 2(5):699-708.
- Zhang Q, Yao F, Raizada MK, [et al]. (2009). Apelin gene transfer into the rostral ventrolateral medulla induces chronic blood pressure elevation in normotensive rats. *Circ Res*. 104(12):1421–1428.
- Zhao Q, Hixson JE, Rao DC, [et al]. (2010). Genetic variants in the apelin system and blood pressure responses to dietary sodium interventions: a family-based association study. *J Hypertens*. 28(4):756-763.