
Evaluación de la prevalencia de los genes Polimórficos de la Enzima Convertidora de Angiotensina y del Angiotensinógeno en Hipertensos Primarios de la Población Peruana

Frank Lizaraso S. *, Felix Medina P. **, Martín Salazar C. ***
Fortunato Diestefano U. ****, Ricardo Fujita A. ****

RESUMEN

Se decidió identificar la prevalencia en nuestra población de los polimorfismos genéticos más importantes en las enfermedades cardiovasculares como son el polimorfismo I/D del gen de Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) y el polimorfismo M235T del gen del Angiotensinógeno (AGT), así como su asociación con la HTA primaria. Este estudio también pretendió demostrar que el genotipo DD del gen ECA, se asocia a mayores niveles de ECA sérico en HTA primaria.

Este estudio de tipo Caso-Control, Multicéntrico Nacional incluyó 238 pacientes de ambos sexos, siendo 118 hipertensos, provenientes de 48 familias que se compararon con 120 normotensos.

Se extrajeron muestras para ADN, se realizó el análisis del polimorfismo por PCR en los genes ECA y AGT, dosaje de ECA sérico y la determinación bioquímica del perfil lipídico.

Los resultados obtenidos mostraron que la prevalencia de DD fue (13/118)11% y de TT (78/118) 66%. Obtuvimos diferencias significativas en los valores del ECA sérico: DD 44 ± 20 U/l, ID 33 ± 19 U/L, 13 ± 9.8 U/l ($p < 0,001$), no se encontró asociación de HTA con estos genotipos.

Como conclusión tenemos que en nuestro grupo muestral la prevalencia del genotipo TT es mayor que la de DD. Existe un mayor nivel de ECA sérico en los portadores del genotipo DD, respecto a los portadores de ID y de II. No encontramos asociación de estos genotipos con la HTA primaria

Palabras claves: HTA, Polimorfismo del gen ECA, polimorfismo del gen AGT, DD, ID, II, TT, MT, MM, SRAA, ECA sérico, Ang II.

ABSTRACT

Evaluation of the Prevalence on the Polymorphic genes from the Angiotensin Converting Enzyme and from angiotensinogen on Primary Hypertense People on Peruvian Population

We have decided to identify the prevalence in our population about the most important genetic polymorphisms in the cardiovascular diseases such as the I/D polymorphism of the gene at the angiotensin converting enzyme (ACE) and the polymorphism of the gene at the angiotensinogen (AGT), and also his association with primary High Blood Pressure (HBP). This study has also tried to show that the DD genotype of ACE gene is associated with greater levels of serum ACE at HBP.

This study of the type: Case - Control, National Multicentric has included 238 patients, males and females, being 118 hypertensives, who come from 48 families that are compared with 120 normotensives.

Some samples have been extracted for the DNA, it has been made the polymorphism analysis for the PCR at the ACE and AGT genes, dosage of serum ACE and the biochemical determination of the lipidic profile.

*Médico Cardiólogo, Profesor de la Universidad de San Martín de Porres – Instituto de Investigación.

** Médico Cardiólogo Hosp. Cayetano Heredia.

*** Jefe del Servicio de Cardiología, Hosp. Cayetano Heredia.

****Servicio de Cardiología, Hosp.. EsSalud-Chincha

*****Director del Instituto de Genética y Biología Molecular FMH-USMP.

Results: The DD prevalence was of (13/118) 11% and the TT prevalence was (78/118) 66%. We have obtained significant differences on the values of serum ACE: DD 44 ± 20 U/l, ID 33 ± 19 U/l, 13 ± 9.8 U/l ($p < 0,001$), it has not been association from HBP with those genotypes.

Conclusion: We must say that in our sample group the prevalence of TT genotype is bigger than the prevalence of DD genotype. There is a higher level of serum ACE at the DD genotype carriers. We haven't found any association of those genotypes with the primary HBP.

INTRODUCCIÓN

1. Epidemiología.

La hipertensión arterial (HTA) afecta aproximadamente al 25% de la población mundial, siendo una enfermedad multifactorial y poligénica. Más del 15% de la población adulta en países industrializados padece de HTA (1).

La HTA afecta aproximadamente 50 millones de americanos (74) y es responsable de enfermedades deletéreas como Infarto de Miocardio Agudo, Insuficiencia Cardíaca Congestiva, Enfermedad Vasculor, Shock y Falla Renal. Además éstas contribuyen anualmente con 200 mil muertes, en los Estados Unidos de Norteamérica.

Los estudios realizados en gemelos y en familias confirman que los genes juegan un papel en la HTA, pero menos del 5% de los pacientes con HTA tienen una causa monogénica (2). Se estima que un 20-40% de las familias Hipertensas, tengan una base genética poligénica (3).

2. Genética y HTA

La Hipertensión Arterial se considera producto de una compleja interacción de factores genéticos y ambientales. La variabilidad interindividual de HTA es también regida, probablemente y en gran medida, por un patrón genético.

La HTA secundaria representa menos del 6% de todas las causas de HTA (4), mientras que la HTA primaria con 94%, tiene una base genética evidente y compleja.

La totalidad de defectos genéticos identificados operan a través del Sistema Renina - Angiotensina - Aldosterona (S.R.A.A) o a través de procesos fisiológicos alternas que permiten la retención de electrolitos, la retención de volumen por diferentes mecanismos y/o tiene efecto sobre la función del órgano endotelial.

2.1. Causas monogénicas de HTA

Algunos defectos genéticos identificados, asociados con hipertensión arterial, tienen un mecanismo hereditario Mendeliano, es decir tienen una transmisión de rasgos codificados por un solo gen. Así tenemos el Síndrome de Liddle, que produce hipertensión severa y es un rasgo autosómico dominante, cuyo defecto está en el canal de sodio epitelial del nefrón distal, por defecto de la subunidad beta, cuya actividad está aumentada. El Síndrome del aldosteronismo remediable o tratable con corticoides, cuyo fenotipo está mapeado en 8q21, que contiene 2 genes candidatos, la sintasa aldosterona y la 11-B-hidroxilasa, es autosómico dominante causado por duplicación de genes que se fusionan, originando un gen quimérico aldosterona sintasa, que codifica la proteína que hidroxila al cortisol en posición 18 y cuya expresión está bajo el control de la ACTH (hormona Adrenocorticotrófica) y en menor cuantía responde a angiotensina II (AII). Administrando corticoides se controla el problema de HTA ⁽⁵⁾. El Síndrome de aparente exceso de mineralocorticoides es autosómico recesivo, causado por deficiencia de 11-B-hidroxisteroide deshidrogenasa (11-B-HSD) así el cortisol no es inactivado en las células del túbulo colector, por lo que su exceso activa el receptor mineralocorticoide y conlleva a la reabsorción de sodio, por el canal epitelial de sodio.

2.2. Alelos de susceptibilidad a HTA

No todo está explicado por estas mutaciones de rasgos dominantes o recesivos, sino que es más complejo ante la presencia de varios genes los cuales interactúan y sufren pequeñas variaciones que por si solas no tendrían mayor significado, sin embargo, al combinarse con otras variaciones de otros genes, crean efectos deletéreos. Además estos cambios y combinaciones parecen ser diferentes entre los individuos hipertensos (6).

Entre estos "alelos de riesgo" que aumentan la susceptibilidad a HTA están el polimorfismo Gly 460 Trp del gen *aducin* a de la proteína *aducina* α/β heterodimérica, que conforma el esqueleto del túbulo renal, y que actúa uniéndose a la actina en el cito esqueleto (7). Sus mutaciones están implicadas en la presencia de HTA, ya que produce aumento de la velocidad de la bomba sodio potasio (8). Esto se demostró en familias hipertensas italianas, japonesas y francesas (9,10,11), por medio de una asociación existente entre mutación del gen *alfa aducin* y HTA El Gly 460 Trp polimórfico tiene alelos Trp 460 y Gly 460, éstos se relacionan con la mayor o menor sensibilidad a la sal para su absorción renal siendo el Trp 460 el más estudiado, por su relación con HTA En el estudio de O' Melander et al (7) no se encontró asociación entre este polimorfismo y la HTA primaria en Escandinavos.

Hay también diferencias genéticamente determinadas para el óxido nítrico sintasa tipo constitutivo, que se relaciona con elementos importantes del Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA), como es la A II, además de otros elementos reguladores del órgano endotelial. De tal manera que podría desarrollar un papel en la variabilidad de respuestas para el daño de órgano blanco, en personas con HTA severa (4).

2.3. La mutación de genes del Sistema de Renina - Angiotensina – Aldosterona y HTA

El SRAA sérico y tisular tienen un rol importante en la patogenia de HTA, así como en la de las otras patologías cardiovasculares. La variabilidad en la expresión genética compromete algunos de sus componentes enzimáticos. Es por eso que se ha estudiado el código genético para cada proteína de este sistema (1): Renina, Angiotensinógeno, ECA, AII, receptor ATI-A y ATI-B de AII, receptor AT2 de AII, aldosterona; además otros que interactúan con el sistema del Oxido Nítrico Sintasa, gen de Endotelina 1 y gen del receptor Beta-2 para Bradiquinina. Estos componentes afectarían también el órgano blanco del hipertenso.

2.3.1. Variación del Gen Aldosterona Sintasa

La Aldosterona, uno de los componentes finales del SRAA juega un rol importante tanto en la presión arterial como en la estructura arterial. Es sabido que tiene rol importante en la reabsorción del sodio a nivel renal, pero también estaría implicada en la disminución de elasticidad en las grandes arterias contribuyendo indirectamente al desarrollo de HTA ⁽¹²⁾.

El gen Aldosterona Sintasa (CYP11Beta 2) con sus dos polimorfismos T 344 C localizado en el gen promotor y el T4986C localizado en 7mo. exón, en el codón 386 (Val 386 Ala) han sido poco estudiados no encontrándose asociación significativa con HTA, pero si con la variación de niveles de aldosterona y la falta de elasticidad arterial ⁽¹²⁾. La Aldosterona cuyo estimulador importante es la aldosterona sintasa, es responsable de la síntesis de colágeno cardiaco y vascular ^(13, 14) Y esto contribuiría a la rigidez de la pared arterial en las grandes arterias y por ende al aumento de presión arterial.

2.3.2. Gen de Renina

Este gen fue el primero en ser estudiado, pero se fracasó en el intento por demostrarse su posible relación con HTA, quedando como que su rol no fuese determinante en la etiología ⁽¹⁵⁾.

2.3.3. Mutación del Gen de Angiotensinógeno

El angiotensinógeno, como se conoce es la enzima determinante para los niveles de A II. Teóricamente y por estudios experimentales se sabe que la mutación del gen del angiotensinógeno (AGT) produce mayores niveles de angiotensinógeno circulante. Si bien algunos han demostrado una fuerte asociación entre el gen AGT y la HTA, otros no lo han podido corroborar. El gen de AGT con la presencia de Treonina en vez de Metionina en posición 235 de ese codón (M235T) predispone al sujeto a desarrollar HTA o por lo menos lo hace susceptible. Se le ha relacionado a la HTA inducida por el embarazo y la sensibilidad a la sal, así como a la hipertensión sistólica aislada, pero sin resultados definitivos⁽¹⁶⁾.

Esta mutación M235T se ha estudiado extensamente. Una persona normal tiene el genotipo MM, una mutación homocigote sería TT y un heterocigote con un alelo anormal sería MT. El TT es común en japoneses y caucásicos y en estas razas se asociaría a HTA⁽¹⁹⁾. Algunos autores como Johnson et al.⁽¹⁸⁾ lo colocan como predictor de la HTA del anciano, por lo que sería importante investigar si la prevalencia de HTA que sabemos aumenta con la edad, así como que existe una relación de edad y sexo, está en relación a estos y otros genotipos.

En un estudio realizado por Hingorani AD, et al.⁽¹⁹⁾ los sujetos hipertensos con MT y TT tienen mejor respuesta a la terapia con inhibidores de la ECA, respecto a los MM, sin embargo esto no se pudo corroborar en otras investigaciones⁽²⁰⁾.

Hopkins et al.⁽²¹⁾ especula por resultados obtenidos, que el genotipo TT sería un marcador de HTA y además un marcador predictor del riesgo de sufrir enfermedad renal terminal. La infusión de AII en personas hipertensas con genotipo TT, produjo una reactividad brusca a nivel renovascular, deteriorando la función renal. Hasta la fecha existen resultados divergentes, en su papel predictor en la producción de daño de órgano blanco por HTA.

La variante M235T, como predictor de enfermedad coronaria, se mantiene aún controversial⁽²⁶⁾

2.3.4. El Polimorfismo I/D del Gen ECA

El Dipeptil Carboxipeptidasa 1 ó enzima convertidora de angiotensina 1 o Kinasa II, tiene un rol mayor en la regulación de la presión arterial y el balance electrolítico, así como otras funciones a nivel sistémico y tisular, hidrolizando AI a AII. Es vasopresor potente y estimula al péptido aldosterona, además inactiva a la bradiquinina que es un vasodilatador importante. El gen ECA codifica dos enzimas: La isoenzima somática ECA expresada en muchos tejidos, como la célula endotelial vascular, célula epitelial renal y célula del tejido testicular. La otra isoenzima ECA germinal o testicular expresada sólo en el esperma⁽²²⁾.

El ECA sérico puede variar entre los individuos, tanto como cuatro a cinco veces su nivel; sin embargo son pequeñas estas variaciones en el mismo individuo⁽²³⁾. Rigat B. et al.⁽²⁸⁾, identificaron el polimorfismo del gen ECA, la inserción o delección de un fragmento de 287 pares de bases (bp) , en el intron 16, el cual no tiene efecto sobre la actividad transcripcional del gen o de la estructura proteica. Su presencia define el alelo I y su ausencia la define el alelo D. De tal manera que aquellos homocigotes para la inserción se designan II y para la delección, DD, el heterocigoto para ambas mutaciones se designa como ID.

El genotipo DD incrementa los niveles tisulares del ECA y genera una mayor cantidad de AII, que produce cambios a corto y largo plazo en la estructura y tono vascular, aumentando la resistencia vascular lo que a su vez mejora la expresión vascular del ECA perpetuando la HTA⁽¹⁾. Actualmente las publicaciones respecto a su asociación y riesgo de tomar parte en la expresión fenotípica de HTA, es realmente controversial.

Se sugiere que el polimorfismo I/D del gen ECA sea el gen mayor responsable de la variabilidad del ECA plasmático⁽²⁴⁾, a pesar de esto Berge i Berg⁽²⁵⁾ no encontraron

asociación significativa entre este polimorfismo y la variación de presión arterial sistólica y diastólica.

Ulrich F, et al ⁽²⁶⁾ publicaron un estudio en el que no encontraron asociación significativa entre polimorfismo I/D del gen ECA y polimorfismo M235T del gen de angiotensinógeno, con la HTA primaria; pero sí mayores niveles de ECA sérico, en aquellos con el genotipo DD del gen ECA. A pesar de estos resultados no deja de reconocerse la importancia que vienen teniendo estos polimorfismos.

El genotipo DD, probablemente sea responsable de la predisposición a HTA, esta afirmación se infiere a partir de observaciones, como la realizada en africanos - americanos hipertensos, comparados con normotensos; en la cual la frecuencia del genotipo DD estuvo incrementado en los hipertensos ⁽²⁷⁾. Se encontró también niveles más altos de ECA sérico en aquellos sujetos con el genotipo DD, en relación a los genotipos I/D e I/I ^(28, 29, 30). Se acepta que existe una interacción de este polimorfismo con otros genes reguladores que han sufrido variación y que dependerían de factores raciales, ambientales y hereditarios, esto podría en parte explicar las diferencias encontradas en los trabajos realizados.

Ueda et al. ⁽³¹⁾ también mostraron una mayor elevación de presión arterial en aquellos sujetos con genotipo DD, al infundir angiotensina I, en comparación con aquellas que tenían el genotipo II. Mattei et al. asignaron al gen ECA el locus 17q23 por hibridación in situ ⁽³⁶⁾.

Zee Ryl et al, encontraron asociación entre el alelo I y HTA en una población australiana ⁽³²⁾. En contraste, otros investigadores no encontraron dicha asociación, pero se recalca que se estudió otra población hipertensa (raza blanca y raza japonesa) ^(29, 33, 34). El alelo D también se ha asociado a enfermedad coronaria ⁽³⁰⁾, infarto de miocardio, en reestenosis post angioplastia, cardiopatía isquémica dilatada, cardiomiopatía hipertrófica e hipertrofia ventricular izquierda; sin embargo, no todos estos hallazgos han podido confirmarse en otros estudios.

2.3.5. El gen del Receptor ATI de la AII

El gen del Receptor ATI de AII sufre una mutación que ha sido identificada como el polimorfismo A1166 C y ha contribuido a comprender alteraciones arteriales ⁽³⁷⁾.

La frecuencia del alelo C de este gen se ha visto incrementada en HTA severa ^(37,38) parece ser que el polimorfismo A1166C tendría mayor importancia que el polimorfismo del gen ECA, en determinar la elasticidad arterial ⁽³⁸⁾. Tiene tres genotipos identificados: AA normal, AC y CC, siendo el alelo C como se revisó, el que se relaciona a la mayor rigidez de las arterias de gran calibre, demostrada por la medida de la velocidad de la onda de pulso, la que fue mayor en los portadores del alelo C ⁽³⁹⁾. También contribuiría a producir un aumento de la relación de colesterol total/C - HDL, aumentando así el riesgo coronario.

Por otro lado, los sujetos con alelo C mostrarían mejor respuesta a la terapia con inhibidores de la ECA al reducir la velocidad de onda de pulso ⁽⁴⁰⁾.

2.4. Respuesta genética a la Terapia Farmacológica.

En cuanto a la terapia con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), existe gran variación interindividual de respuestas hemodinámicas y hormonales, por lo que los estudios están enfocados a descubrir los factores como: edad, sexo, origen étnico, etc., pero han fallado en dar una repuesta satisfactoria, debido a la gran heterogeneidad de la población y especialmente porque existe una base gen ética compleja responsable de casi 96% de las causas de HTA primaria. Esto actualmente viene formando parte de lo que se conoce como farmacogenética.

La variación de renina interindividual, parece no tener mucha importancia (variación menor del 10%) como para explicar la variación en la respuesta a los IECA. ⁽⁴¹⁾

El nivel sérico de ECA per sé parece igualmente tener menos importancia en regular la respuesta a los IECA. Evidencias recientes sugieren que el 50% aproximadamente de la variación de la actividad ECA es familiar y puede ser explicado por efecto de un gen mayor ⁽⁴²⁾

Como se ha revisado anteriormente el polimorfismo I/D del gen ECA influye no sólo en la concentración sérica de la ECA y su actividad ⁽²⁸⁾, sino en el ECA tisular ⁽⁴³⁾, así como del ECA de linfocitos T ⁽⁴⁴⁾.

Los sujetos con genotipo II tendrían mejor respuesta antihipertensiva que los otros genotipos a los IECA, con una reducción mayor de la presión arterial en las primeras horas. Ueda et al, postulan que el genotipo ECA predice más del 50% de la variación en respuesta a la inhibición de los ECA independientemente de la actividad de ECA ⁽⁴²⁾ inclusive en un estudio realizado por ellos, encontraron que el efecto del Enalaprilato fué significativamente mayor y más duradero en normotensos homocigotes para el genotipo II del gen ECA, comparado con aquellos que poseían el genotipo DD, estos requerían de mayores dosis del fármaco, así como más tiempo para estabilizar la presión arterial.

Debemos señalar, que la identificación de las variaciones genéticas contribuiría a identificar defectos moleculares primarios que forman la base de mecanismos normales de regulación de la presión arterial en humanos, al entendimiento de las vías bioquímicas y fisiológicas que ligan a los factores de riesgo con HTA, al entendimiento de la fisiopatología de las otras enfermedades cardiovasculares, así como al mejor conocimiento de la farmacodinamia y farmacocinética dentro del nuevo campo de la farmacogenética.

Es la primera vez que se realiza un estudio de este tipo en nuestro medio, y fuera del país no hay un estudio hasta el momento realizado en una población tan diversa en cuanto a mestizaje. Este estudio pretende contribuir al mejor conocimiento de los genes afectados por factores como es la raza, de allí que la amplia heterogenicidad racial, por el gran mestizaje de razas como la indígena, blanca, amarilla y negra, nos dará muy valiosa información, que alimentará a la controversia existente. Contribuiría a identificar al grupo en riesgo, por la mayor prevalencia y frecuencia de estos genes; así como también permitirá un mejor entendimiento de la variación y complejidad de estos patrones genéticos que interactúan con factores exógenos ambientales.

Esto permitirá optimizar en nuestra población la prevención primaria con mucho tiempo de anticipo a la manifestación fenotípica que es la HTA, identificando además grupos en riesgo de desarrollar daño de órgano blanco; así como también a los subgrupos que se beneficiarían de un determinado fármaco antihipertensivo, por tener una mejor sensibilidad genética al fármaco.

OBJETIVOS DEL ESTUDIO.

- Identificar la prevalencia de los polimorfismos genéticos más importantes y mejor estudiados como son el polimorfismo I/D del gen ECA y el polimorfismo M235T del gen de AGT en nuestra población muestral Hipertensa.
- Demostrar si existe o no una asociación de estos genotipos con la HTA primaria.
- Establecer si el genotipo D ID del gen ECA, se asocia a mayores niveles de ECA sérico en HTA primaria.
- Establecer la frecuencia de los genotipos en relación a la edad y sexo en los pacientes con HTA.

MATERIAL Y METODOS

1. Diseño del Estudio Poblacional

Es un estudio de tipo Caso - Control (observacional, transversal, comparativo, efecto - causa) Multicéntrico Nacional, en el que se estudiaron 238 pacientes hombres y mujeres mayores de 18 años, de los servicios de cardiología de tres hospitales nacionales y del

consultorio médico de la Facultad de Medicina de la USMP. De los cuales 118 pacientes provenientes de 48 familias, son portadores de Hipertensión Arterial Primaria o Esencial y a los que se les denominó casos. Se incluyeron a los familiares en primer grado de consanguinidad, de tales pacientes hipertensos, debido a la existencia de la influencia hereditaria conocida. Se le sugirió al paciente con HTA que invitara a participar del estudio a sus familiares en primer grado de consanguinidad sean o no hipertensos, de tal manera que los portadores de HTA formaron parte del grupo de casos y los normotensos parte del grupo control. Se excluyeron aquellos pacientes con HTA secundaria (o causa conocida), ICC GF II - IV, insuficiencia renal aguda o crónica, infarto al miocardio agudo y antecedentes de infarto al miocardio, aquellos menores de 18 años o aquellos que se negasen a firmar un consentimiento informado por escrito para el estudio.

A las personas estudiadas que fueron normotensas de los mismos centros se les denominó controles y fueron en número de 120. Estos controles estaban compuestos por familiares sanos de los casos y por normotensos que provenían de familias normotensas.

El número mínimo de muestra a estudiar que se determinó fue de 92 casos y 92 controles. Se calculó en base a la prevalencia de exposición esperada del genotipo DD: en el grupo de casos 27% y 10% en el grupo control, tomándose como referencia uno de las primeras publicaciones de prevalencia en la población general, publicado por Cambien et al. en 1992⁽⁴⁸⁾. Así mismo, se utilizó un nivel de confianza del 95% y potencia del 80%, el cálculo se realizó en el paquete estadístico Epiinfo 6.0.

El estudio se realizó entre Marzo del 2000 y Diciembre del 2001.

2. Recolección de Datos y Muestras

Se prepararon cuestionarios estructurados, que tenían anexados consentimientos informados, los cuales fueron aprobados por el Comité de Ética de cada Hospital. Se realizó de manera directa a través de dichos cuestionarios y en forma indirecta a través de la historia clínica, al momento del ingreso a los servicios consignados.

Se determinaron datos de filiación, antecedentes contributorios, examen físico y la determinación de un electrocardiograma en la mayoría de pacientes. Los exámenes de laboratorio y estudios genéticos se realizaron en el Instituto de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad San Martín de Porres. Los hospitales participantes fueron el Hospital Cayetano Heredia, Hospital Nacional Arzobispo Loayza y el Hospital de EsSalud de Chincha, así como el consultorio médico de la Facultad de Medicina de la USMP.

Se extrajeron dos muestras sanguíneas por persona y en ayunas, tanto al grupo de casos como a los del grupo control para el dosaje de Enzima Convertidora de Angiotensina sérica (ECA), perfil lipídico y determinación del ADN. Para aquellos con prescripción de inhibidores de la enzima convertidora, se suspendió esta medicación 15 días (75) antes de la extracción de sangre para el dosaje de la ECA. Se utilizó el método de extracción al vacío en dos tubos de ensayo, uno con EDTA y otro sin anticoagulantes.

3. Determinación Genética

3.1 Muestras

Con el consentimiento del individuo se procedió a la toma de la muestra de sangre periférica colectada en tubos vacutainer conteniendo un anticoagulante (EDTA).

3.2 Extracción del ADN

La extracción del ADN estuvo basada principalmente en la metodología simplificada utilizada por Fujita en 1991 (45). A 5 ml. de sangre periférica se le adicionó 2 volúmenes de la solución tampón TE 2:5 (20mM Tris-HCl, 5mM EDTA), se mezcló produciéndose la lisis parcial por hipotonía y se centrifugó a 3,000 rpm por 10 min. Este paso fue repetido por 5 veces o hasta que se haya eliminado la mayor cantidad de eritrocitos anucleados y la hemoglobina. El pellet fue resuspendido en 0.2 volúmenes de TE 20:5 y se

adicionó Sarkosyl (Lauroylsarcosine) a una concentración final del 1 % para lisar los núcleos restantes liberando el ADN. El lisado fue incubado toda la noche con 100 ug/ml de proteinasa K a 50°C y luego se le adicionó acetato de amonio a una concentración final de 3M y 2.5 vol. de etanol absoluto para precipitar el ADN. Se eliminó el etanol y la suspensión de ADN fue resuspendida en 500 ul de TE 20:5, luego se le adicionó NaCl a una concentración final de 0.2M y 2.5 vol. de etanol absoluto. Se eliminó el etanol y el ADN fue re suspendido en TE 20: 1 a una concentración estimada de 200 ug/ml. La cantidad de ADN fue estimada empíricamente por inspección visual del tamaño de la suspensión de ADN precipitada.

3.3 Análisis del polimorfismo por PCR en los genes de la Enzima Convertidora de Angiotensina-I (ECA) y Angiotensinógeno (AGT)

3.3.1 ECA

El polimorfismo inserción/delección del ADN localizado en el intrón 16 del gen de la enzima convertidora de la angiotensina-I fue detectado utilizando oligonucleótidos (primers) complementarios a las regiones que flanquean la inserción y mediante la amplificación en cadena de la polimera (PCR).

Las reacciones se llevaron a cabo según la metodología de Rigat y col.(1992)⁽⁴⁶⁾ utilizando 10 pmoles de cada primer: forward 5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3' y reverse 5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T-3' en un volumen final de 25ul conteniendo 1X PCT buffer (Perkin Elmer), 3mM MgCl₂, 0.5mM dNTPs y 1U de Taq polimerasa (Perkin Elmer). El ADN fue amplificado por 30 ciclos con una denaturación de 94°C por 1 min., una hibridación de 58°C por 1 min. y una extensión de 72°C por 1 min. usando un termociclador Amplitron II (Thermolyne). El producto de PCR fue visualizado mediante la electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y la tinción con bromuro de etidio. El producto de PCR es un fragmento de 190pb en ausencia de la inserción (D) y un fragmento de 490pb en presencia de la inserción (I). (fig 1).

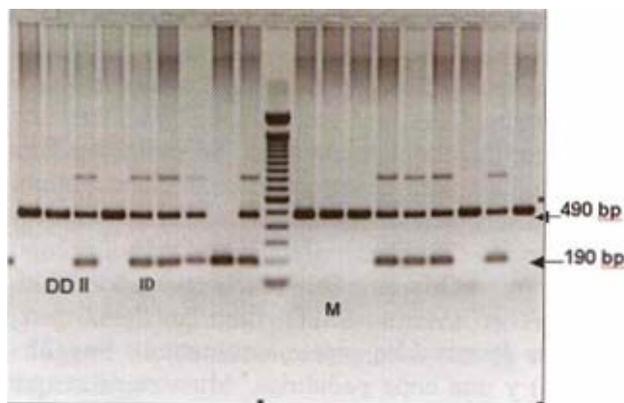


Figura 1.- Análisis de Polimorfismo del gen de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) en individuos con enfermedades cardiovasculares de diferentes centros de salud de Lima. El polimorfismo consta de dos fragmentos alélicos: uno de 490 nucleótidos (bp) denominado inserción (I) y el otro de 190 bp denominado delección (D). En algunos estudios, en otras poblaciones los individuos DD tienen una propensión superior en 3 a 4 veces para sufrir algunas enfermedades cardiovasculares. Hemos analizando 400 muestras de pacientes y 300 controles.

II = Homocigote para la inserción
 ID = Heterocigote inserción/delección
 DD = Homocigote para la delección
 M = Marcador de tamaño 100 bp

3.3.2 AGT

Algunos reportes muestran una fuerte evidencia que la variante molecular del gen del angiotensinógeno constituida por la mutación de T por C en el nucleótido 704 del exon 2 que conlleva a la sustitución de la treonina por la metionina en el aminoácido 235, se encuentra muy ligado al fenotipo de hipertensión y niveles elevados de angiotensinógeno en el plasma. Este polimorfismo puede ser detectado a través de la amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) y el análisis con enzimas de restricción. El cambio de T por C no altera un sitio de restricción, sin embargo produce una mitad del sitio para Tth1111 (GACNNNGTC), la otra mitad es sintetizada por el PCR utilizando primers con 2 CAMBIOS en la posición 4 y 5 del extremo 3' el primer reverse.

Las reacciones se llevaron a cabo utilizando 5 pmoles de cada primer diseñados por Russ y col. (1993)⁽⁴⁷⁾: forward 5'-CCG TTT GTG CAG GGC CTG GCT CTC T-3' y reverse 5'-CAG GGT GCT GTC CAC ACT GGA CTC CC-3'.

El PCR se llevó a cabo con las modificaciones realizadas en el Instituto de Genética y Biología Molecular de la USMP. En un volumen final de 25ul conteniendo IX PCR buffer (Perkin Elmer) , 0.5mM dNTPs, 4 mM MgC12 y IU de Taq polimerasa (Perkin Elmer) se amplificó el ADN por 30 ciclos con una denaturación de 94°C por 45 seg., una hibridación de 66°C por 45 seg. y una extensión de 66°C por 45 seg. usando un termocic1ador Amplitron II (Thermolyne). El producto amplificado de 165pb fue visualizado mediante la electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y la tinción con bromuro de etidio.

Se diluyeron 10ul del producto amplificado en 20 ul conteniendo IX del buffer correspondiente a la enzima, IX de BSA (albúmina de suero de bovino) y 3U de TthIII (Promega) y se incubaron a 65°C por toda la noche. El fragmento de 141pb producido por la digestión de Tth 111I en los fragmentos amplificados que llevan C en la posición 704 puede ser visualizado a través de la electroforesis en geles de agarosa al 2.5% y la tinción en bromuro de etidio. (fig. 2).

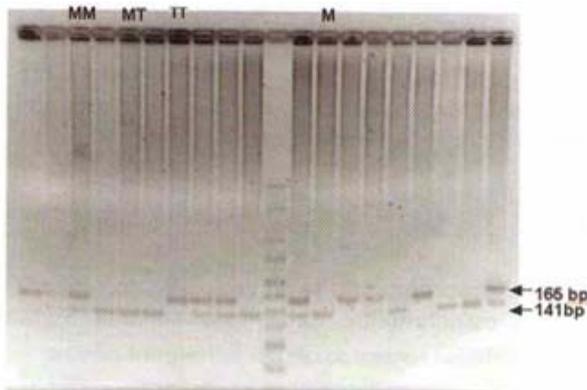


Figura 2. - Análisis de Polimorfismo M235T del gen de la Angiotensina (AGT) en individuos con enfermedades cardiovasculares de diferentes centros de salud de Lima. Una mutación convierte el codón 235 del aminoácido metionina (ATG) a treonina (ACG) y la vez crea un sitio de reconocimiento de una enzima de restricción que corta en los cromosomas que tienen la versión treonina. En algunas poblaciones la treonina en posición 235 aumenta el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares. Hemos analizando 400 muestras de pacientes y 300 controles.

MM = Homocigote para Metionina
 MT = Heterocigote
 TT = Homocigote para Treonina
 M = Marcador 25 bp

4. Determinación Bioquímica

4.1 Dosaje de ECA sérico:

De una muestra de sangre heparinizada se extrajo el plasma o suero por centrifugación. Se guardó estable a lo más por una semana en refrigeración y luego de este período por congelación en los casos que fue requerido. Se tuvo en consideración que el ECA sérico podía regresar a niveles normales a partir de las 12 horas de administrado un IECA como el Captopril por ejemplo, por lo que no se aceptaron muestras de pacientes que habían tomado este tipo de medicación desde dos semanas antes, inclusive.

Se utilizó el ECA Reagent, un producto de Sigma Diagnostics para la determinación del ECA sérico a 340 nm de absorbancia. Se utilizaron: un ECA calibrador, un espectro fotómetro capaz de medir una absorbancia de 340 nm., pipetas y cubetas con propiedades ópticas, un timer y una cámara de cubetas a temperatura constante.

El método es espectrofotométrico, modo cinético que consiste en comparar la tasa de reacción de la muestra de un sustrato sintético catalizada por ECA, con la obtenida con el calibrador ECA a temperatura de 30°C ó 37°C. El sustrato sintético es el Tripéptido N - [3 - (2 - furil) acriloyl] - L - fenilalanilglicina (FAPGG) y es hidrolizado a furilacriloylfenilalanina (FAP), que resulta en un decremento de la absorbancia a 340 nm.



En este procedimiento se siguieron las recomendaciones estrictamente dadas por la casa Sigma Diagnostics.

Se preparó el ECA Reagent, luego se reconstituyó el ECA calibrador de acuerdo al inserto de la caja. Se pipeteó 1.0 ml de la solución del ECA Reagent en cada una de dos

cubetas rotuladas con TEST y CALIBRATOR. Se agregó 0.1 ml. Del espécimen a la cubeta marcada con TEST y 0.1 ml. del calibrador ECA a la cubeta marcada con CALIBRATOR a 340 nm. Se mezclaron por inversión, luego se colocaron las cubetas a temperatura constante en el compartimento de cubetas y se esperó 5 minutos aproximadamente. Se hizo la lectura y se grabó las absorbancias de TEST y CALIBRATOR a 340 nm. vs agua como referencia. Estas tuvieron las "A" iniciales. Exactamente 5 minutos después, nuevamente se leyó y grabó las absorbancias como "A" finales. El procedimiento de calibración es lineal hasta una actividad del ECA de 120 u/l. Los valores normales del ECA sérico van desde 8 - 52 u/l a 37°C ó 5 - 33 a 30°C. Se tomó en cuenta las condiciones de bioseguridad durante el procesamiento.

4.2 Determinación bioquímica del perfil lipídico

Los equipos utilizados fueron un autoanalizador bioquímico VITALAB modelo SELECTRA 2 y una centrifugadora automática. Se utilizaron Kits de reactivos para la determinación del colesterol total, determinación de colesterol HDL sérico, y triglicéridos. Se utilizaron: un suero control normal y patológico (Merck - Qualitrol), calibrador multi-paramétrico (Merck -SMT), tubo de 75x12 mm., guantes descartables, pipeta automática y tips (25 - 250 ul) y una copa pediátrica. Muestra de sangre venosa, que luego de centrifugada a 3500 r.p.m. por 5 minutos se separó el suero en el tubo de 75 x 12 -mm. Luego de calibrar el equipo y hacer el control de calidad (reglas de Westgard), se realiza el procesamiento de la muestra, mezclando el re activo precipitante con la muestra y colocando finalmente el sobrenadante en el equipo VITALAB SELECTRA 2, para su lectura.

Se tomaron en cuenta en todos los procedimientos las condiciones de bioseguridad.

4.2.1 Concentración del colesterol total sérico: Método enzimático colorimétrico. Se utilizaron Kits de reactivos para la determinación de colesterol total.

4.2.2 Concentración del colesterol HDL sérico: Método enzimático colorimétrico, del sobrenadante producto de la precipitación del fosfotungstato.

4.2.3 Concentración de triglicéridos séricos: Método enzimático colorimétrico.

4.2.4 Concentración del LDL sérico: Se utilizó la fórmula de Friedwald, válida para triglicéridos menores a 300 mg/ dl. ($C\text{-LDL} = C\text{. Total} - C\text{-HDL} + \text{TRIG}/5$).

5. Análisis Estadístico

Concluido el trabajo de campo los datos fueron procesados en el paquete estadístico SPSS, versión 10 para realizar los siguientes análisis:

- Identificación de datos perdidos (missing) debido a que algunas fichas presentaban información incompleta (<10%).
- Obtención de frecuencias y porcentajes en datos cualitativos.
- Obtención de medias y desviaciones estándares en datos cuantitativos.
- Análisis de riesgo con su respectiva significancia estadística empleando el análisis OR (Odds Ratios), y la prueba de Chi².
- Análisis de diferencias de medias con la prueba t de student.
- Análisis de diferencias de mas de dos medias con la prueba F de análisis de varianza.
- Análisis de diferencia de porcentajes con la prueba de Chi² de comparación de proporciones.
- Regresión logística para determinar la relación conjunta de los factores de riesgo con la variable dependiente.
- La significancia estadística utilizada ha sido del 5%, es decir toda vez que el valor de p resultó menor que 0,05 se consideró un resultado estadísticamente significativo.
- Elaboración de cuadros y gráficas con la ayuda de la hoja de cálculo Excel.

RESULTADOS

Las características demográficas y clínicas se muestran en la tabla 1.

Tabla 1.

	Grupo Caso (n=118)		Control (n=120)		
	Media	Desv. típica	Media	Desv. típica	p<
EDAD (años)	55,0	14,0	51,0	14,0	NS
IMC (Kg/m ²)	18,0	15,0	26,0	4,0	0,001
PAS (mmHg)	146,0	39,0	108,0	14,0	0,001
PAD (mmHg)	87,0	22,0	70,0	9,0	0,001
CT (gr/dl)	213,0	43,0	182,0	40,0	0,001
C-LDL (gr/dl)	123,0	35,0	103,0	37,0	0,001
C-HDL (gr/dl)	48,0	15,0	48,0	16,0	NS
TRIG (gr/dl)	191,0	110,0	160,0	111,0	NS
ECA sérico (U/l)	27,0	19,0	22,0	13,0	NS

NS: No significativo ($p > 0,05$)

IMC: Índice de Masa Corporal; PAS: Presión Arterial Sistólica; PAD: Presión Arterial Diastólica; CT: Colesterol Total; TRIG: Triglicéridos.

El IMC (gráfico 1) fue mayor en el grupo control, mientras que el CT y C-LDL (gráfico 3) fueron más altos en el grupo de casos con diferencia estadística significativa. Obviamente la diferencia PAS y PAD (gráfico 2) es a favor del grupo de casos.

GRAFICO 1: INDICE DE MASA CORPORAL EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO

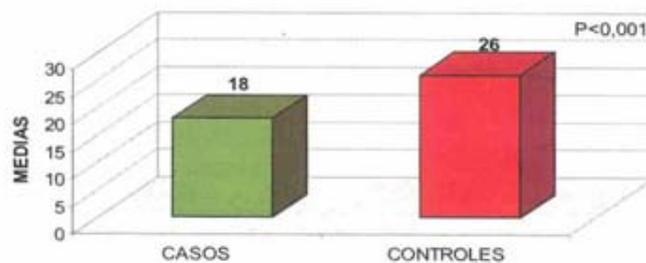


GRAFICO 2: PRESION ARTERIAL EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO

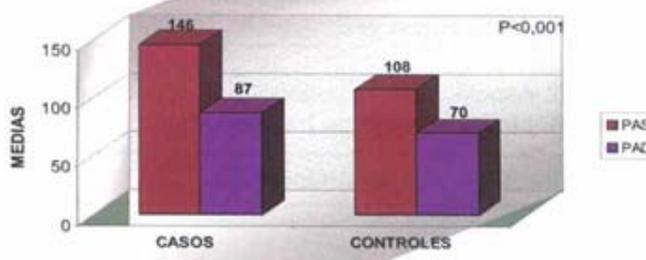
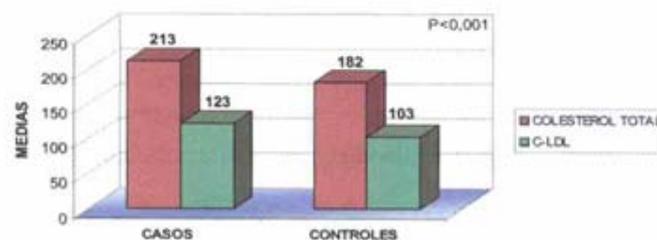


GRAFICO 3: PERFIL LIPIDICO EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO



En lo referente a las características personales o antecedentes que afectan a los grupos muestrales de estudio, observamos que la DM estaba presente en mayor cantidad en los casos que en los controles (10,3%) vs (1,9%) respectivamente ($p<0,01$); el tabaquismo era mayor en los controles que en los casos (19,7%) vs (7,9%) respectivamente ($p<0,01$); la ingesta de alcohol frecuente estuvo presente en mayor cantidad de controles que de casos (42%) vs (7,9%) respectivamente ($p<0,01$) (ver tabla 2).

Tabla 2. Características personales que afectan a la población de estudio

	Grupo Casos (n=118)		Control (n=120)		p<
	n	%	n	%	
Diabetes Mellitus	13	10.30%	3	1.90%	0.01
Dislipidemia	29	23.00%	26	16.60%	NS
Tabaco	10	7.90%	31	19.70%	0.01
Alcohol	10	7.90%	66	42.00%	0.001

NS: No significativo ($p>0,05$)

En las tablas 3, 4, 5, 6 (ver anexos) se observa la no existencia de riesgo para sufrir HTA en los portadores de DD y/o TT comparado con los otros genotipos del mismo gen.

Tabla 3. Asociación de los genotipos del polimorfismo ECA y la presencia de hipertensión

Genotipo	Casos	Controles	Total
DD	13	12	25
ID	54	56	110
TOTAL	67	68	135

OR=1,12 IC95%: 0,47-2,68 $p=0,79$

Tabla 4. Asociación de los Genotipos del Poli-morfismo ECA y la presencia de hipertensión

Genotipo	Casos	Controles	Total
DD	13	12	25
II	51	52	103
TOTAL	64	64	128

OR=1,26 IC95%: 0,53-2,99 $p=0,60$

Tabla 5. Asociación de los Genotipos del Polimorfismo AGT y la presencia de hipertensión

Genotipo	Casos	Controles	Total
T235	78	67	145
M235T	33	41	74
TOTAL	111	108	219

OR=1,45 IC95%: 0,82-2,54 $p=0,20$

Tabla 6. Asociación de los Genotipos del Polimorfismo AGT y la presencia de hipertensión

Genotipo	Casos	Controles	Total
T235	78	67	145
235M	7	11	18
TOTAL	85	78	163

OR=2,32 IC95%: 0,94-5,78 $p=0,06$

En cuanto a la distribución de los diferentes genotipos del ECA y AG T, obtuvimos una distribución uniforme desde el punto de vista estadístico entre casos y controles y de las cuales calculamos la prevalencia de cada una, obteniendo lo siguiente: II (51/118) 43%; ID (54/118) 45%; DD (13/118) 12%; MM (7/118) 6%; MT (33/118) 28%; TT (78/118) 66% (Tablas 7 y 8).

Tabla 7. Presencia de los Polimorfismo ECA y la presencia de hipertensión

ECA	Casos	Controles	Total
DD	13	12	25
ID	54	56	110
II	51	52	103
TOTAL	118	120	238

X²=0,09

p=0,95

Tabla 8. Presencia de los Polimorfismo AGT y la presencia de hipertensión

AGT	Casos	Controles	Total
T235	78	67	145
M235T	33	41	74
235M	7	11	18
TOTAL	118	119	237

X²=4,76

p=0,09

En cuanto al sexo cuando se comparan casos y controles con HTA no se encuentran diferencias en su distribución (tabla 9). Tampoco hubo diferencias en el sexo cuando se les comparó con los polimorfismos del ECA y AGT (tablas 10 y 11), lo cual era de esperar ya que ninguno de estos genes están ligados al cromosoma X, ni al cromosoma Y.

Tabla 9. Relación entre la variable sexo y la Presencia de hipertensión

Sexo	Casos	Controles	Total
M	31	44	75
F	87	76	163
TOTAL	118	120	238

X²=1,44

p=0,23

Tabla 10. Relación entre la variable sexo y Genotipo ECA

SEXO	DD	ID	II	Total
M	4	16	11	31
F	9	38	40	87
TOTAL	13	54	51	118

X²=1,03

p=0,60

Tabla 11. Relación entre la variable sexo y Genotipo AGT

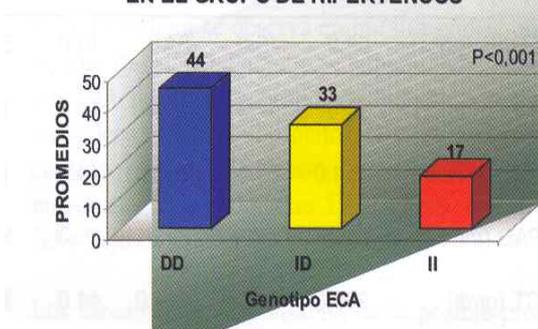
SEXO	T235	M235T	235M	Total
M	21	9	1	31
F	57	24	6	87
TOTAL	78	33	7	118

X²=0,55

p=0,76

En las tablas 12 y 13 mostramos que los genotipos tienen distribución uniforme según la variable edad. En las tablas 14 y 15 observamos las características clínicas y de laboratorio en HTA según los diferentes genotipos estudiados. Observamos en la tabla 14 una diferencia estadística significativa en los valores del ECA sérico según: DD 44 ± 20 U /l, ID 33 ± 19 U /L, II 13 ± 9.8 U /l (p<0,001) (gráfico 4).

GRAFICO 4: ECA SERICO SEGUN EL GENOTIPO ECA EN EL GRUPO DE HIPERTENSOS



Finalmente cuando se aplicó la regresión logística, se confirma que el IMC y el C- LDL en este grupo muestral afectan la presión arterial en conjunto, no siendo así con el CT.

Tabla 12. Relación entre la variable edad y genotipo ECA

EDAD (años)	DD	ID	II	Total
30-40	3	10	11	24
41-50	0	13	8	21
51-60	4	13	16	33
61-70	3	10	11	24
71-80	3	8	5	16
TOTAL	13	54	51	118

X²=5,99

p=0,65

Tabla 13. Relación entre la variable edad y Genotipo AGT

EDAD (años)	T235	M235T	235M	Total
30-40	15	8	1	24
41-50	19	2	0	21
51-60	20	11	2	33
61-70	17	6	1	24
71-80	7	6	3	16
TOTAL	78	33	7	118

X²=13,04

p=0,11

Tabla 14. Características clínicas y de laboratorio en hipertensión según genotipos ECA

	ECA DD (n=13)		ID (n=54)		II (n=51)		p<
	Media	Desv. típica	Media	Desv. típica	Media	Desv. típica	
EDAD (años)	58.0	15.0	54.0	14.0	54.0	13.0	NS
IMC (Kg/m ²)	24.0	11.0	16.0	15.0	18.0	15.0	NS
PAS (mmHg)	154.0	15.0	139.0	44.0	154.0	32.0	NS
PAD (mmHg)	91.0	5.0	84.0	26.0	91.0	17.0	NS
CT (gr/dl)	220.0	51.0	214.0	44.0	206.0	41.0	NS
C-LDL (gr/dl)	123.0	22.0	123.0	38.0	120.0	32.0	NS
C-HDL (gr/dl)	48.0	16.0	46.0	11.0	52.0	19.0	NS
TRIG (gr/dl)	226.0	103.0	211.0	132.0	153.0	54.0	NS
ECA sérico (U/l)	44.0	20.0	33.0	19.0	17.0	13.0	0.001

NS: no significativo (p>0,05)

Tabla 15. Características clínicas y de laboratorio en hipertensión según genotipos AGT

	AGT T235 (n=78)		M235T (n=33)		235M (n=7)		p<
	Media	Desv. típica	Media	Desv. típica	Media	Desv. típica	
EDAD (años)	53.0	13.0	55.0	15.0	62.0	14.0	NS
IMC (Kg/m ²)	16.0	15.0	19.0	14.0	30.0	8.0	NS
PAS (mmHg)	148.0	37.0	142.0	41.0	161.0	16.0	NS
PAD (mmHg)	88.0	20.0	85.0	24.0	89.0	9.0	NS
CT (gr/dl)	207.0	39.0	224.0	51.0	202.0	35.0	NS
C-LDL (gr/dl)	122.0	31.0	121.0	43.0	122.0	29.0	NS
C-HDL (gr/dl)	49.0	16.0	45.0	13.0	49.0	17.0	NS
TRIG (gr/dl)	176.0	94.0	231.0	139.0	153.0	52.0	NS
ECA sérico (U/l)	28.0	20.0	28.0	19.0	17.0	7.0	NS

NS: no significativo (p>0,05)

DISCUSION

La HTA esencial como sabemos es genéticamente heterogénea y la tercera parte de la variación de presión arterial (PA) ha sido atribuida al factor genético (3). Por tanto los dos genes polimórficos que nos ha preocupado investigar, así como otros marcadores han sido ampliamente revisados en innumerables estudios fuera de nuestro país(7-12, 69,70, 72, 73), aunque con resultados controversiales no dejan de ser el foco de atención para estudios más profundos en el terreno de la genética. Es importante estudiar gente de otras razas para obtener hipótesis más sólidas a ser confirmadas por mejores estudios de investigación más dirigidos y mejor diseñados.

Cuando comparamos las características demográficas de los casos con los controles de nuestra población, sólo observamos diferencias de CT y CLDL con niveles más altos en los casos y mayor IMC en los controles. El IMC en nuestra población estaba en el rango de normalidad ($IMC < 27$) en promedio. A pesar de que el mayor IMC condiciona desde el punto de vista teórico a una mayor PA, estos sujetos eran normotensos. Por otro lado en la regresión logística se confirma que el IMC influye en la P A, esto nos invita a pensar en una protección genética de otras características genotípicas que contrarresten efectos del mayor IMC en estos normotensos. Sin embargo por nuestros resultados, obviamente no hallamos esa protección ni del II, ni del MM, que carecen de los alelos considerados como de "riesgo". Se realizó el perfil lipídico, en primer lugar con la intención de mostrar cierta homogeneidad en la población muestral en los factores de riesgo cardiovasculares y en segundo lugar con la intención de encontrar alguna relación desde el punto de vista estadístico con los polimorfismos estudiados. Si bien el colesterol total y el C-LDL fueron mayores con diferencia estadística significativa en el grupo de casos, sin embargo estos se mantienen en un nivel promedio aceptado, dado que son pacientes no coronarios, ni precedidos de esta enfermedad. Pero sí cabe comentar que se ha sugerido una relación entre la alteración de lípidos y la presencia del alelo D, ya que los portadores de dicho alelo tienen mayor riesgo de sufrir enfermedad coronaria o infarto de miocardio agudo (49). Cuando se hizo la discriminación en el grupo de casos, se observó que los niveles de colesterol total eran más altos en los portadores de DD, aunque sin significancia estadística.

Existen controversias en cuanto al rol de marcadores de enfermedad cardiovascular, tanto del polimorfismo del gen ECA, como del gen AGT. Sin embargo disponemos de evidencias consistentes en la literatura que indican que el alelo D del gen ECA se relaciona a altos niveles séricos de ECA (50,51), lo cual también se observa en nuestra población de estudio (tabla 14). Cuando se comparan los genotipos DD, ID, II se ha observado que tanto los niveles séricos, celulares (linfocitos T) y tisulares (tejido cardíaco) tienen la misma distribución siendo mayor en los homocigotes DD, intermedio en los ID y bajo en los II (52).

Los mecanismos responsables de la posible predisposición a enfermedades cardiovasculares como la HTA, en las personas portadoras del alelo D, se mantiene en el plano especulativo. Decimos esto porque no hay estudios que lo demuestren fehacientemente. Otros de los factores que podrían interactuar con el genotipo DD en la producción de HTA, obviamente sería el factor racial y otro como la edad, el sexo, la alimentación, además cabe la posibilidad de una interacción con otros genes en completo desequilibrio de ligamiento; pero hablando específicamente de nuestro candidato el polimorfismo I/D desde que está localizado en el intrón 16, es una zona no codificante, o sea que no tiene actividad transcripcional del gen o de la estructura proteica (53). Pero podríamos suponer que este polimorfismo IID sea solamente un marcador ligado en completo desequilibrio a la verdadera variante molecular del gen responsable de estos cambios, que podría localizarse en una zona codificadora, vale decir en un exón. Además no se dispone hasta la fecha de datos que muestren asociación de IID polimórfico con los cambios en la cinética del ECA (54). Otra posibilidad a la luz de los resultados actuales, es que el alelo D sería por un lado responsable de mayor generación de angiotensina II (Ang II) a través del SRAA (55) y por otro lado sería una suerte de marcador para el deterioro de la vasodilatación dependiente del endotelio (56), datos que nos harían pensar en este alelo como candidato a marcador de alto riesgo para enfermedades cardiovasculares como la HTA.

En nuestro estudio al comparar los niveles séricos de ECA entre los casos y controles observamos mayores niveles en el grupo de casos pero sin significancia estadística. Cuando analizamos el grupo de casos y relacionamos el nivel sérico de ECA con los diferentes genotipos, encontramos los mismos resultados de los estudios anteriores citados en nuestra revisión bibliográfica, el nivel es mayor en el grupo con DD, intermedio en ID y bajo en n, con diferencia estadística significativa. El nivel en los portadores de DD es poco más del triple respecto a n, como

se pudo apreciar. Es importante dejar en claro que sabemos muy bien que el rol del ECA a nivel sérico es de menor magnitud que a nivel tisular, para las enfermedades cardiovasculares y su actividad se estima en 10% respecto al otro, pero lo usamos como paralelismo por las dificultades de obtener el ECA tisular por medio de biopsias. Con fines prácticos este parámetro se sigue usando en este tipo de estudios, a nivel mundial.

Con respecto al polimorfismo del gen AGT, sabemos que no existe una relación del AGT con los niveles del ECA y obviamente nuestros resultados corroboraron esto. Lo que sí sabemos a través de estudios realizados en poblaciones Americanas y Francesas (57), es que los niveles de AGT sérico y la HTA se asocian al M235T, así los niveles más altos se relacionan al homocigote TT o 235T, los intermedios al MT y los más bajos al MM (58). Estos niveles altos de AGT promueven mayor velocidad de clivado del precursor renina a angiotensina I (Ang I), que posteriormente pasa a formar Ang II (59). Como vemos los dos genes en estudio tienen vías diferentes para producir el mismo rasgo fenotípico como es la HTA, pero al final interactúan para producir tal efecto.

En lo referente a género y raza, es definitivo que existe una variación en la distribución de los diferentes genotipos de ECA y AGT según el origen étnico, y por tanto estas diferencias étnicas, interactúan con el resto de los genotipos para tener como resultado un determinado fenotipo. De allí la importancia de conocer la prevalencia de los genotipos en nuestra población, porque permite medir anticipadamente su repercusión clínica. Por ejemplo tenemos que en Caucásicos la frecuencia del alelo T del M235T es de [0.35 a 0.50] (60)(61), en Japoneses tiene una frecuencia de distribución de [0.63 a 0.79] (60), por 10 tanto el impacto de este factor genético para este tipo de enfermedades relacionadas es importante. Para el genotipo DD la frecuencia en la población general es de aproximadamente de 0.27 (62). Hay un trabajo de publicación reciente (2001)(63) sobre las diferencias en frecuencia del I/D polimórfico del gen ECA en diferentes grupos étnicos (Afro-Americanos, Indios y Blancos) encontrando una prevalencia del DD en 19% para Indios, 29% para Afro-Americanos y 29% para blancos con diferencia estadística significativa; lo mismo el alelo D tenía una frecuencia de 0.49, 0.59 y 0.44 respectivamente. Esto resalta la importancia de hacer estudios en poblaciones genéticamente homogéneas; además tenemos la explicación del porqué en las diferencias en los resultados respecto a la prevalencia e incidencia de las enfermedades cardiovasculares en las diferentes poblaciones, así como su diferente respuesta a ciertos tratamientos. En nuestro grupo muestral la distribución es uniforme, y la prevalencia de los genotipos DD y TT es de 11 % y de 66% respectivamente. Como vemos la prevalencia de DD comparada con la de otras regiones geográficas es mucho menor, 10 que nos indica que su impacto en enfermedades cardiovasculares no sería tan alto como en otros lugares. En caso se confirme en el futuro que el ser portador del genotipo TT, en nuestra población representa alto riesgo de HTA u otra enfermedad cardiovascular, nos obligaría a preocuparnos y centrar nuestros esfuerzos para su prevención. Como vemos la prevalencia del homocigote TT en nuestro grupo muestral hipertenso se encuentra dentro del rango de la Asiática y por encima de la Caucásica. Esto podría determinar en parte las discrepancias de asociación existentes.

En nuestra población general tenemos gran mestizaje, por lo que el trabajo realizado procuró tener una población muestral lo más representativa hasta donde fue posible, motivo por el cual fue diseñada para ser ejecutada en diferentes centros hospitalarios, incluyendo uno en Chíncha. Así pues una tercera parte de los casos con HTA fue de raza negra.

También nos interesó como objetivo secundario averiguar la prevalencia de los otros genotipos, así la prevalencia de II es de 43% y de ID 45%; para el AGT la prevalencia de MM es de 6% y para MT, 28%.

Si hablamos de género, tenemos trabajos que muestran asociación del polimorfismo II/D con HTA, sólo en varones mas no en mujeres (64,65). Existen dos grandes estudios que señalan asociación de HTA, el polimorfismo II/D y el sexo masculino de raza blanca (65,66). Uno de ellos O'Donnell JC (65) trabajó en la población del Framingham Heart Study. En nuestro grupo de estudio cuando se comparan ambos sexos no encontramos diferencias significativas al relacionar HTA y los diferentes genotipos polimórficos de los genes ECA y AGT.

La edad avanzada y la frecuencia de HTA sistólica aislada es conocida, y es debida a una disminución de la distensibilidad vascular por un lado y al deterioro de la función de los baroreceptores. Sabemos que el consumo de sal, que es el factor ambiental o externo, suprime aún más la función de estos baroreceptores e incrementa el tono vasomotor directamente y produce retención de volumen, aumentando la PA. Existe una relación genética de este fenómeno,

específicamente con el M235T (67,68), inclusive en uno de los trabajos realizados al respecto, Johnson AG et al. sugieren que este polimorfismo tiene un rol modulador en la HTA sistólica aislada, y proponen estudios más profundos. En nuestro trabajo no fue el objetivo estudiar esta variante, por tanto no se diseñó su búsqueda, de tal manera que cuando separamos las edades por intervalos y se le comparó con los diferentes genotipos, no se encontró ninguna asociación. En el Centro de Estudios de la Hipertensión y Lípidos en la Infancia del Hospital de Niños R. Gutiérrez en la Argentina (69) se estudió la prevalencia de homocigotes TT en adolescentes normotensos e hipertensos y su relación con la presión arterial; encontrando una mayor frecuencia del homocigote TT, en el grupo hipertenso respecto al normotenso (56% vs 31 %), confiriéndoles un factor de riesgo para HTA a estos portadores. Además sugirieron que aquellos adolescentes con rangos de PA normal alta y portadores de TT, serían propensos a sufrir HTA en la edad adulta.

En relación con PAS y PAD no encontramos relación con los diferentes genotipos de riesgo y esto puede deberse en parte a su baja prevalencia en el caso de DD. Podríamos decir también que existen otros marcadores de riesgo dentro del mismo gen u otros genes relacionados a la fisiopatología, que actualmente se vienen estudiando y son alrededor de 150 (53). Se debería buscar en estos genotipos de riesgo la posible asociación con HTA y otras enfermedades cardiovasculares. Cabe mencionar que existen dos estudios recientes e importantes, uno de ellos realizado por Colin A. McKenzie et al. (70), que luego de estudiar familias Afrocaribeñas de origen Jaimaico, proponen 10 tipos polimórficos adicionales del gen ECA, como candidatos para una posible asociación con HTA y niveles altos de ECA sérico. El otro estudio realizado por Xiaofeng Zhu et al. (71) se encargó de buscar una asociación entre uno o más de 13 polimorfismos (13 singlenucleotide polymorphisms = SNPs) del gen ECA con HTA y niveles séricos de ECA, en 1343 Nigercianos, provenientes de 332 familias. Encontraron dicha asociación en dos de ellos el ECA 4 y el ECA 8, sugiriendo que estos alelos tendrían un rol conciliador entre tantas discrepancias en la búsqueda de la causa genética de HTA y mantendrían viva la "Hipótesis del SRAA" para las enfermedades cardiovasculares.

La compleja variación de alelos dentro del gen ECA, son sustituciones de una base por otra cada 250 - 400 pb distribuidas en regiones codificantes y no codificantes (exones e intrones) muchos con significación funcional (53). Esta variación y su ligazón en desequilibrio (72,73), debe prevenirnos a caminar con cautela en la interpretación de asociaciones, cuando estudiamos un solo polimorfismo.

Finalmente debemos decir que comprendiendo la variación genómica que existe en ésta y en otras regiones de cada uno de los genes que deseamos estudiar, así como sus efectos en la fisiología de los órganos, podremos sacar conclusiones más precisas. También deberemos entender la interacción de los múltiples loci, sus alelos y su interacción con el medio ambiente.

CONCLUSIONES

A continuación tenemos las siguientes conclusiones obtenidas de nuestra población muestral:

- La prevalencia del genotipo TT del polimorfismo AGT es mayor que la del genotipo DD del polimorfismo liD del gen ECA.
- El genotipo DD se relaciona a mayor nivel de ECA sérico, respecto a los portadores de ID y de II.
- Los genotipos del polimorfismo liD del gen ECA no se asocian con la HTA Primaria.
- Los genotipos del polimorfismo del gen AGT no se asocian con la HTA Primaria.
- La edad y el sexo no se relacionan con los diferentes polimorfismos del gen ECA y del gen AGT estudiados en nuestra población hipertensa.

RECOMENDACIONES

Dado el gran número de genes candidatos, estimados en cerca de 150, y que van en incremento, sería muy difícil poderlos abarcar, por lo que debemos seguir las recomendaciones dadas por otros investigadores, que es, el preocuparnos de las variantes de los genes más estudiados y que tienen mayor rol en la fisiopatología cardiovascular. Tal es el caso de los genes del ECA, del AGT, del de óxido nítrico constitutivo, del Aldosterona sintasa, del alfa aducina, del receptor tipo 1 de angiotensina II, entre otros. En base a estos hechos nos permitimos recomendar:

- Realizar un estudio a gran escala multicéntrico de tipo epidemiológico para averiguar la prevalencia de los polimorfismos de riesgo de los genes ECA y AGT en HTA primaria, en base a las tres regiones del país. Averiguar en este mismo estudio el impacto de la mayor prevalencia del genotipo TT del gen de AGT.
- Realizar un estudio a gran escala multicéntrico de tipo prospectivo en HTA primaria y trazar los siguientes objetivos importantes:
- Investigar la posibilidad de asociación de daño de órgano blanco con los polimorfismos mas estudiados. -Establecer el riesgo de desarrollar HTA en portadores de otros marcadores ubicados en exones, de los genes ECA y AG T.
- Realizar un estudio prospectivo, tipo caso control, doble ciego, droga vs. placebo y tratar de demostrar la mayor o menor susceptibilidad o resistencia genéticamente determinada o conferida por dife-rentes genotipos de los genes ECA y AGT, a ciertos fármacos cardiológicos como por ejemplo inhibidores ECA, bloqueadores de receptores AT 1, beta - bloqueadores, datos que existen ya en la lite-ratura mundial, pero que aún requieren de más información obtenida de poblaciones de diferente origen étnico.

BIBLIOGRAFIA

1. Henricus S. Duckers MO, Ph D et al. Risk Factor Modification for Cardiac Disease. *American Heart Journal* 134: 195 - 210. 1997.
2. Mc Kusick, V. A. Genetics and the nature of essential Hypertension. *Circulation* 22: p.857. 1960.
3. NIH Guide: SCOR: Molecular genetics of the Hypertension. Vol. 22, Number 45, 1993.
4. Barry J. Materson. Will Angiotensin Converting Enzyme genotype, receptor mutation identification, and other miracles of Molecular Biology permit reduction of NNT? *A J Hypertension* 11: 1385 1425. 1998.
5. Lifton RP.; Dluhy RG.; Powers M.; Rich GM.; Cook S.; Ulick S.; Lalouel JM. A chimeric 11-B hydroxilasa - aldosterona synthase gene causes glucocorticoid - remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature* 355: p. 262. 1992.
6. Takahashi N.; Smithies O. Gene Targeting Approaches to Analyzing Hypertension. *Journal of American Society of Nephrology* p. 1598 1599. 1999.
7. O' Melander, K Bengtsson, M Orho-Melander, et al. Role of the Gly460 Trp polymorphism of the alfa - adducin gene in primary hypertension in Scandivarians. *J. of Human Hypertension* 14: 43 - 46. 2000
8. Bianchi G.; Tripodi G.; Casari G.; Salarfi S.; Barber BR.; Garcia R.; LEoni P.; Torielli L.; Cusi D.; Ferrandi M.; et al. Two point mutation within the adducing genes are involed in blodd pressure variation. *Proc. Natl Acad Sci USA* 91: 3999. 4003-1357. 1997
9. Cusi D.; Barlassina c.; Azzani T. et al. Polimorphism of the alfa - adducin locus with essential hypertension. *Hypertension. Lancet* 349: 1353 - 1357. 1997.
10. Casari G, Barlassina C, Cusi D, Zagato L, Muirhead R, Righetti M, N embri P, Amar K, Gatti M, Macciardi F, et al. Association of the alpha adducin locus with essential hypertension. *Hypertension* 25: 320 - 326. 1995.
11. Tamaki S.; Iwai N.; Ohmichi N. et al. Polymorphism of alpha adducin in japanese patients with essential hypertension - *Hypertens Res.* 21: 29 - 32. 1998.
12. Luminita Pojoga. Genetic determination of plasma aldosterone 1evels y essential. *Hypertension. Am J Hypertens.* 11: 956 - 860. 1998.
13. White PC: Mo1ecu1ar biology of adrenocortical hypertension. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Managment*, 2nd. Edition. Raven, New York, pp: 2177 - 2184. 1995.
14. Lomber M. Immunohistochemical and biochemical evidence for cardiovascular mineralocorticoide receptor. *Circ Res* 71: 503 - 510. 1992.
15. Furrukh S. Malik M.D. et al. Renin Angiotensin System: Genes to besides. *Journal of the American Society of Nephrology.* 10: 514 -524.1999
16. Hata A: Role of angiotensinogen in the genetics of essential Hypertension. *Life sei.* 57: 2385 - 2395. 1995.
17. Nishiuma S.; Kario K.; Kayaba K, et al. Effect of the angiotensinogen gen Met 235 - Thr variant on blood pressure and other cardiovascular risk factor in two Japanese population. *J. Hypertens* 13:717 722. 1995.
18. Johnson AG; Simons LA.; Friedlander Y. et al. M235 - T polymorphism of the angiotensinogen gene predicts hypertension in the elderly. *J Hypertens* 14: 1061 - 1065. 1996.
19. Hingorani AD, Jia H, Stevens PA, Hopper R, Dickerson JE, Brown MJ. Renin - angiotensin system gene polymorphisms influence blood pressure and the response to angiotensin converting enzyme inhibition. *J. Hypertens* 13: 1602 - 1609. 1995.
20. Dudley c.; Keavney B.; Casadei B. et al. Prediction of potent responses to antihypertensive drugs using genetic polymorphisms: investigation of renin - angiotensin system genes. *J. Hypertens* 14: 259 - 262. 1996.
21. Hopkins EN.; Lifton R.E; Hollenberg NK. et al. Blunted renal vascular response to angiotensin II is associated with common variant of the angiotensinogen gene and obesity. *J. Hypertens* 14: 199 207. 1996.

22. Rarmaraj, E; Kessler, S.E; Colmenares, C.; Sen, G. c.: Selective restoration of male fertility in mice lacking angiotensin - converting enzyme by sperm specific expression of the testicu1ar isozyme. *J. C1in. Invest* 102: 371 - 378. 1998.
23. Cambien, F; Alhenc-Gelas,F; Herbert, B. et al. Familial resemblance of plasma angiotensin - converting enzyme level: the Nancy Study. *Am J. Hum. Genet.* 43: 774 -780.1988.
24. Okabe, T; Fumisawa, M.; Yotsumoto, M. et al. Familial elevation of serum angiotensin converting enzyme. *Quart. J. Med.* 216: 55 - 61. 1985.
25. Berge K. E.; Berg, K.E. No effect of insertion I deletion polymorphism at the ACE locus on normal blood pressure level or variability. *Clin. Genet.* 44: 292 - 297. 1994.
26. Mondorf UF, Russ A, Wiesemann A, Herrero M, Oremek G, Lenz T Contribution of angiotensin I converting enzyme gene polymorphism and angiotensin gene polymorphism to blood pressure regulation in essential Hypertension. *AJH.* 11: 174 - 183. 1998.
27. Duru K, Farrow S, Wang JM, Lockette W, Kurtz T Frecuency of a deletion polymorphism in the gene for angiotensin converting enzyme is increased in African - Americans with hypertension. *Am J. Hypertens* 7: 759 - 762. 1994.
28. Rigat B.; Hubert, c.; Alhenc-Ge1as, F. et al. An insertionI deletion polymorphism in the angiotensin I converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme 1evels. *J. Clin. Invest.* 86: 1343 - 1346. 1990.
29. Harrap SB, Davidson HR, Connor JM, Soubrier F, Corvol P, Fraser R, Foy CJ, Watt GC. The angiotensin I converting enzyme gene and predisposition to high blood pressure. *Hypertension* 21: 455 - 460. 1993.
30. Nakai K, Itoh C, Miura y, Hotta K, Musha T, Itoh T, Miyakawa T, Iwasaki R, Hiramori K. Deletion polymorphism of the angiotensin I - converting enzyme gene is asociated with serum ACE concentration and increase risk for CAD in the japanese. *Circulation* 90: 2199 - 2202. 1994.
31. Ueda S.; Elliott HL.; Morton JJ, Connell JM. Enhanced pressor response to angiotensin I in normotensive men with de1etion genotype (DD) for angiotensin - converting enzyme. *Hypertension* 25: 1266 - 1269. 1995.
32. ZeeRY, Lou YK, Griffiths LR, Monis BJ. Association of polymorphism of the angiotensin I converting enzyme with essential hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 181: 486 492. 1992.
33. Ishigami T, Iwamoto T, Tamura K, Yamaguchi S, Iwasawa K, Uchino K, Umemura S, Ishii M. Angiotensin I converting enzyme (ACE) gene polymorphism and essential hypertension in Japan. Ethnic dífference of ACE genotype. *Am Hypertens* 8: 95 - 97. 1995
34. Jeunemaitre X. Jeunemaitre X, Lifton RP, Hunt SC, Williams RR, Lalouel JM. Absence of linkage between the angiotensin converting enzyme locus and human essential hypertension. *Nature Genet* 1:72 - 75. 1992.
35. Lindpaintner K.; Pfeffer, M. A; Kreutz, R. et al. A prospective evaluation of an angiotensin - converting - enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N. Engl. J Med* 80: 633 644. 1986.
36. Mattei, M.; Hubert, c.; A1henc-Gelas, F et al. Angiotensin I converting enzyme gene is on chromosome 17. *Cytogenet Cell Genet.* 51: 1041. 1989.
37. Bonnardeaux A; Davies E.; Jeunemaitre X. et al. Angiotensin I Type 1 receptor gene. polymorphism is human essential hypertension. *Hypertension* 24: 63 - 69. 1994.
38. Tiret L.; Bonnardeaux A; Poirier O.; Ricard S.; Marques- Vidal P. et al. Synergistic effects of angiotensin - converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene. Polymorphism on the risk of myocardial infarction, *Lancet* 1994; 344: 910 - 913.
39. Benetos A.; Topouchian J; Richard S. et al. Influence of angiotensin converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene pol1ymorphisms on aortic stiffness in normotensive in hypertensive patients. *Circulation* 1996; 94: 658 - 703.
40. Benetos A; Cambien F.; Gautier S. et al. Influence of angiotensin converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism on the effects on perindopril and nitrendipine on artificial stiffness in hypertensive individuals. *Hypertension* 1996; 28: 1081 - 1084.
41. Donnelly R, Meredith PA, Elliott HL. The description and prediction of antihypertensive drug response an individual approach. *Br J C1in. Pharmacol.* 1991; 31: 627 - 634.
42. Ueda S, Meredith PA, Morton JJ, Connell JM, Elliott HL. ACE (I/D) Genotype as a Predictor of the Magnitude and Duration of the response to an ACE Inhibitor Drug (Enalaprilat) in Humans. *Circulation.* 98: 2148 - 2153. 1998.
43. Danser AH.; Schalekamp MA; Bax WA et al. Angiotensin I - converting enzyme in the human heart. *Circulation* 92: 1387 - 1388. 1995.
44. Costerousse O.; Allegrini J; López M.; AlhencGelas F. Angiotensin I - converting enzyme in human circulating mononuc1ear cell: genetic polymorphism of expression in T - Lymphocytes. *Biochem J* 290: 33 - 40. 1993.
45. Fujita, R. Localisation du gene de l'ataxie de Friedreich par sa liaison génétique et physique avec les loci D9S5 et D9S15. Tesis para obtener el título de PhD. Universidad Louis Pasteur, Strasbourg, Francia. 1991.
46. Rigat B., Hubert c., Corvol P. y Soubrier F. PCR detection of the insertion/ deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCPI)(dipeptidyl carboxypeptidas e 1). *Nudeic Acids Research* 20(6): 1433. 1992.
47. Russ A, Maerz W., Ruzicka v., Stein U and Grob W Rapid detection of the hypertension-associated Met235 - Thr allele of the human angiotensinogen gene. *Human Mal. Genetic.* 2(5):609-610. 1993.
48. Cambien F., Lecerf L., Evans, A et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting

- enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 359: 641-644. 1992.
49. Pfohl M., Koch M., Prescod S. et al. Angiotensin I - converting enzyme gene polymorphism, coronary artery disease. and myocardial infarction. *Eur Heart J* 20: 1318 - 1325. 1999.
 50. Rigat B, Hubert C, Alhenc Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I - converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest.* 86: 1343 - 1346. 1990.
 51. Butler R, Morris AD, Burchell B, Strithers AD. DD Angiotensin - converting enzyme gene polymorphism is associated with endothelial dysfunction in normal humans. *Hypertension.* 33: 1164 - 1168. 1999.
 52. Tiret L, Rigat B, Visvikis S, et al, Evidence from combined segregation and linkage analysis, that a variant of angiotensin I - converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet.* 51: 197 - 205. 1992.
 53. Carlos J. Pirola. *Genética Molecular de la Hipertension Arterial Esencial Genes de susceptibilidad y resistencia.* Medicina (Buenos Aires) 60: 39 - 66. 2000.
 54. Morris BJ, Zee Ry, Schrader AP. Different frequencies of angiotensin - converting enzyme genotypes in older hypertensive individuals. *J Clin Invest.* 94: 1085 - 1089. 1994.
 55. Lanchurie ML, Azizi M, Guyene TT, Alhenc Gelas F, Menard J. Angiotensin. - converting enzyme gene polymorphism has no influence on the circulating renin angiotensin - aldosterone system of blood pressure in normotensive subjects. *Circulation.* 91: 2933 - 2942. 1995.
 56. Perticone F, Cevarolo R, Maio R, Ventura G, et al. Angiotensin - converting enzyme gene polymorphism is associated with endothelium - dependent vasodilation in never treated hypertensive patients. *Hypertension* 31: 900 - 905. 1998.
 57. Jeunemaitre X, Sorber F, Koteleutsev MV, Lifton RP et al. Molecular basis of human hipertensión: role of angiotensinogen. *Cell* 71: 169 - 180. 1992
 58. Porto PI, García SI, Plotquin Y, et al. Polimorfismos de los componentes del sistema renina - angiotensina en hipertensión arterial esencial (HTA). *Rev Soco Arg Cardiol* 66 (suppl IV): 104. 1998.
 59. Gould AB, Green B. Kinetics of the human renin and human renin substrate reaction. *Cardiovasc Res* 1971; 5: 86 - 89.
 60. Ichihara S, Yokota M, Fujimura F, et al, Lack of association between variance of the angiotensinogen gene and the risk of coronary artery disease in middle - aged Japanese men. *Am Heart J* 734: 260 65. 1997.
 61. Kunz R, Kreutz R, Berge J, et al. Association between the angiotensinogen 235T - variant and essential hypertension whites. A systemic review and methodological appraisal. *Hypertension* 30: 1331 - 1337. 1997.
 62. Cambien F, Poirier O., Lecerf L, et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 359: 641-644, 1992.
 63. Mathew J. Basheeruddin K, Prabhakar S. Differences in frequency of the deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene in different ethnic groups, *Angiology*, 52; 375-379. 2001
 64. Sagnella GA, Rothwell MJ, Onipinia AK, et al. A population study of ethnic variations in the angiotensin - converting enzyme I/D polymorphism; relationship with gender, hypertension and impaired glucose metabolism. *J Hypertens* 17: 657 - 664. 1999
 65. O'Donnell CJ, Lindpaintner K, Larson MG et al. Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin- converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study. *Circulation*, 97: 1799 - 1772. 1998
 66. Fornage M, Amos CI, Kardia S, Sing CF, Turner ST, Boerwinkle E. Variation in the region of the angiotensin - converting enzyme gene influences interindividual differences in blood pressure levels in young white males. *Circulation*. 4: 193 - 201. 1998
 67. Johnson AG, Nguyen TV, Day RO, Evaluation of the accuracy and reproducibility of ambulatory blood pressure monitoring in the elderly using the Takeda TM - 2420 Ambulatory Blood Pressure Monitor. *J. Hum Hypertens* 8: 433 - 39. 1994
 68. Anthony G. Johnson, Tuan V. Nguyen, Darren Davis. Blood pressure is linked to salt intake and modulate by the angiotensinogen gene in normotensive and hypertensive elderly subjects. *J Hypertensive* 19:1053 - 60. 2001.
 69. Porto PI, Sinsolo R, Garcia SI, et al. Asociacion de los alelos de los genes de la enzima convertidora (ECA), angiotensinógeno AGT) y receptor tipo 1 de la angiotensina (AT1R) y la presión arterial (PA) por monitoreo ambulatorio (MAPA) en adolescentes. *Medicina (Buenos Aires).* 60: 585. 1998
 70. Colin A. McKenzie, Gancaleo R. Abecasis, Bernard Keauney et al. Trans-Ethnic fine mapping of a quantitative trait locus for circulating angiotensin I - converting enzyme (ACE) *Hum Molec Genet.* 10:1077 - 108
 71. Xiaofeng Zhu, Nourdine Bouzekri, Lorraine Southam et al. Linkage and association analysis of angiotensin I converting enzyme (ACE) - gene polymorphisms with ACE concentration and blood pressure. *Am J Hum Genet.* 68: 1139 - 1148. 2001.
 72. Reid Mj, Taylor SL, Clark AG, Nickerson DA, Sequence variation in the human angiotensin converting enzyme. *Nat Genet.* 22: 59-62. 1999.
 73. Halushike MK, Fan JB Bently K, Hsie L, et al. Patterns of single - nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood pressure homeostasis . *Nat Genet.* 22: 239-247. 1992.
 74. National Heart, Lung and blood Institute, The Six Report of The Joint National Committee in Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure, 1997.
 75. Dahlöf, B.; Devereux, R.; De Faire, U. et al. The Losartan Intervention For Endpoint Reduction (LIFE) in Hypertension Study. Rationale, Design, and Methods. *Am J Hypertension* 10: 705-713. 1997.