

**POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA QUINASA 4 DEL RECEPTOR
DOPAMINÉRGICO ACOPLADO A LA PROTEÍNA G (GRK4) COMO FACTORES
DE RIESGO PARA HIPERTENSIÓN ARTERIAL ESENCIAL (HAE) EN UNA
MUESTRA POBLACIONAL DE BUCARAMANGA**

FRANCISCO JAVIER LEÓN

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA**

2011

**POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA QUINASA 4 DEL RECEPTOR
DOPAMINÉRGICO ACOPLADO A LA PROTEÍNA G (GRK4) COMO FACTORES
DE RIESGO PARA HIPERTENSIÓN ARTERIAL ESENCIAL (HAE) EN UNA
MUESTRA POBLACIONAL DE BUCARAMANGA**

FRANCISCO JAVIER LEÓN

**Trabajo para optar por el título de:
Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas**

**Directora
Adriana Castillo Pico, Bact. MSc**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA**

2011

DEDICATORIA

A Dios

A mi madre, Bernarda y mi querido hermano Omar

A mí amada familia Adriana, Christopher Adriam y Diana Alejandra

Francisco Javier

AGRADECIMIENTOS

Para mi querida directora de tesis Dra. Adriana Castillo Pico y a la Dra. Clara Inés Vargas Castellanos por su dedicación, su conocimiento y su calidad humana.

Para Adriana María, Viviana Lucía y Adriana, quienes siempre estuvieron dispuestas a ayudarme y escucharme desinteresadamente en el momento preciso.

Para Fernando Rondón por su amistad, aportes y enseñanzas.

Para Henry Bautista, por su mano amiga, voluntad de servicio y consejos.

Para Anderson y su querida familia, por ese calor de hogar en otras tierras.

A todos ellos gratitud perenne, pues me permitieron cumplir con tan importante meta. Les agradezco enormemente su tiempo y consejos, su buen ejemplo y apoyo, su entrega y compromiso en este proceso, que me permitió aprender que las cosas en la vida demandan sacrificio y sobre todo que el trabajo en equipo y con responsabilidad siempre entrega una sonrisa y buenos frutos.

Gracias

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	21
1. OBJETIVOS	23
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	23
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
2. MARCO TEORICO.....	24
2.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL	24
2.2 GENÉTICA DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL ESENCIAL	25
2.3 POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL ESENCIAL	28
2.4 RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G	30
2.5 RECEPTORES RENALES DE DOPAMINA	32
2.6 EFECTOS RENALES DE LA DOPAMINA	34
2.7 RECEPTORES QUINASA ACOPLADOS A LAS PROTEÍNAS G (GRK4).....	36
2.8 POLIMORFIMOS DEL GEN DE LA QUINASA 4	39
3. PREGUNTA E HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN	42
3.1 PREGUNTA	42
3.2 HIPÓTESIS	42
4. METODOLOGÍA	43

4.1 TIPO DE ESTUDIO	43
4.2 ÁREA DE ESTUDIO.....	43
4.3 MUESTRAS	43
4.4 CÁLCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA.....	43
4.5 DEFINICIÓN DE CASOS	45
4.6 DEFINICIÓN DE CONTROLES	46
4.7 PAREAMIENTO DE LOS CASOS Y CONTROLES	47
4.8 VARIABLES.....	48
4.8.1 Sociodemograficas	48
4.8.2 Factores de riesgo	48
4.9 GENOTIPIFICACIÓN	49
4.9.1 Extracción de ADN.....	49
4.9.2 Cuantificación del ADN.	50
4.9.3 Determinación de los polimorfismos del gen GRK4.....	50
4.9.4 Amplificación del ADN genómico.	52
4.9.5 Secuenciación.....	52
4.9.7 Electroforesis capilar del polimorfismo 448G>T, R65L.	55
4.10 PROCESAMIENTO DE LOS DATOS.....	56
4.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	56
4.11.1 Cálculo de frecuencias genotípicas	56
4.11.2 Cálculo de frecuencias alélicas.....	56
4.11.3 Test de equilibrio “Hardy Weinberg” (EH-W)	57
4.11.4 Coeficiente de Endogamia o Estadístico F_{st}	57
4.11.5 Cálculo de las frecuencias haplotípicas	58
4.11.6 Cálculo del estudio de asociación.....	58
4.11.7 Análisis bivariado para los polimorfismos del gen de la quinasa 4 (GRK4).....	59

4.11.7.1	Modelo codominante.	60
4.11.7.2	Modelo dominante.	60
4.11.7.3	Modelo recesivo:.....	61
4.12	ASPECTOS ÉTICOS	61
5.	RESULTADOS	63
5.1	CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN	63
5.2	RESULTADOS DE LA TIPIFICACIÓN	64
5.2.4	Electroforesis capilar del polimorfismo 448G>T, R65L.	67
5.3	ANÁLISIS POBLACIONAL.....	70
5.3.1	Frecuencias genotípicas	70
5.3.2	Frecuencias alélicas.....	71
5.3.3	Test de Equilibrio de Hardy-Weinberg (EH-W)	72
5.3.4.	Estructura poblacional, prueba F_{st}	73
5.3.5	Análisis de haplotipos.	73
5.4	Estudio de asociación entre los niveles de tensión arterial y los polimorfismos R65L, A142V, A486V del gen de la quinasa 4 (GRK4).....	75
5.4.1	Antecedentes familiares de enfermedad crónica	75
5.4.2	Antecedentes personales y factores de riesgo.	75
5.4.3	Análisis Bivariado.....	76
5.4.4	Análisis bivariado para los polimorfismos del gen de la quinasa 4 (GRK4).	76
6.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	78
7.	ANÁLISIS CRÍTICO DE LOS RESULTADOS	86
8.	CONCLUSIONES.....	87
	CITAS BIBLIOGRAFICAS	89

BIBLIOGRAFÍA..... 101

ANEXOS 107

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Genes candidatos para hipertensión	30
Tabla 2. Prevalencia de los polimorfismos 448G>T (R65L), 679C>T (A142V) y 1711C>T (A486V) en los sujetos hipertensos en varias poblaciones	44
Tabla 3. Cálculo del tamaño de muestra.	45
Tabla 4. Clasificación de los niveles de presión sanguínea	46
Tabla 5. Interpretación de los valores para Fst	58
Tabla 6. Descripción de las características socio-demográficas de la población en estudio	64
Tabla 7. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos del gen de la quinasa 4 (GRK4).	71
Tabla 8. Frecuencias alélicas de los polimorfismos del gen de la quinasa 4 (GRK4)	72
Tabla 9. Equilibrio de Hardy-Weinberg de los polimorfismos del gen de la quinasa 4 (GRK4)	73
Tabla 10. Frecuencia de haplotipos de los polimorfismos del gen de la quinasa 4 (GRK4)	74

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Expresión de los receptores de dopamina en la nefrona	33
Figura 2. Acción de la dopamina sobre los receptores D1R en células del túbulo renal proximal y su efecto sobre el transporte de solutos	36
Figura 3. Desensibilización de los receptores D1R por medio de la quinasa 4 del receptor de la proteína G (GRK4) en los túbulos proximales renales	38
Figura 4. Localización de los polimorfismos del gen de la quinasa 4	40
Figura 5. Esquema de la técnica de PCR-mismatch aplicada a un segmento genómico que incluye el polimorfismo 679C>T	51
Figura 6. Total de muestras tipificadas	63
Figura 7. Electroforesis convencional del polimorfismo 448G>T (R65L)	65
Figura 8. Electroforesis convencional del polimorfismo 679C>T (A142V)	66
Figura 9. Electroforesis convencional del polimorfismo 1711C>T (A486V).	67
Figura 10. Electroforesis capilar del polimorfismo 448G>T (R65L) Genotipo GG	68
Figura 11. Electroforesis capilar del polimorfismo 448G>T (R65L). Genotipo TT	68
Figura 12. Electroforesis capilar del polimorfismo 448G>T (R65L). Genotipo GT	69
Figura 13. Liz 500 marcador de peso molecular electroforesis capilar	69

LISTA DE ANEXOS

	Pág.	
Anexo A	Consentimiento informado	107
Anexo B	Tabla 1. Especificaciones técnicas de Primers	118
Anexo C	Tabla 2. Protocolo de amplificación condiciones PCR	118
Anexo D	Tabla 3. Protocolo de amplificación PCR	119
Anexo E	Tabla 4. Protocolo de digestión con enzimas de restricción	119
Anexo F	Tabla 5. Enzimas de restricción y tamaños del producto de la restricción	120
Anexo G	Secuenciación de los polimorfismos 448G>T, 679C>T y 1711C>T	121
Anexo H.	Tabla 6. Características de los antecedentes familiares de los casos y los controles	124
Anexo I.	Tabla 7. Características de los antecedentes personales de los casos y los controles.	125
Anexo J	Tabla 8. Antecedentes familiares, valores de OR del modelo pareado en HAE y los polimorfismos del Gen GRK4	126

Anexo J	Tabla 9. Antecedentes personales, valores de OR del modelo pareado en HAE y los polimorfismos del Gen GRK4	127
Anexo K	Tabla 10. Modelos de herencia codominancia, dominante y recesivo para los polimorfismos del Gen GRK4	128
Anexo L	Tabla 11. Estudio de asociación de los polimorfismos del gen GRK4 con HAE	129

GLOSARIO

ADN: Acido desoxirribonucleico, es el material genético presente en el núcleo celular.

ALELO: Una de las variantes de un gen, por lo general se refiere a una específica sitio en el gen.

CROMOSOMA: Cada uno de los pequeños cuerpos en que se organiza la cromatina del núcleo celular durante las divisiones celulares.

DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO: Medida de asociación entre los alelos de diferentes loci.

DOMINANTE: Describe cualquier rasgo que se expresa en un heterocigoto, es decir, una copia de ese alelo es suficiente para manifestar su efecto

FENOTIPO: conjunto de características físicas y químicas encontradas en un ser vivo, tal como viene determinada por su genotipo y el ambiente dentro del cual se desarrolla.

GENOMA: La colección completa de la información genética (o genes) que un organismo posee.

GEN: secuencia de DNA que codifica para partes de una proteína o para una proteína completa.

GENOTIPO: Serie completa de genes contenidos en el material genético presente en un individuo, el término se usa a veces en un sentido más limitado para indicar los alelos existentes en uno o más loci.

HAPLOTIPO: Set de alelos en un cromosoma que tienden a heredarse en bloque.

HETEROCIGOSIDAD: Probabilidad matemática de que un individuo sea heterocigoto en un loci.

HETEROCIGOTO: Individuo que tiene una pareja de alelos diferentes en un determinado locus de un par de cromosomas homólogos.

HOMOCIGOTO: Individuo que posee un par de alelos idénticos en un determinado locus de un par de cromosomas homólogos.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

RFLP: *Restriction fragment length polymorphism* ó polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción. Técnica para estudios moleculares de las secuencias del DNA.

SNP: *Single nucleotid polymorphism*, o polimorfismo de nucleótido simple. Variación en la secuencia de ADN que ocurre cuando un nucleótido simple en el genoma difiere entre miembros de una especie o pares de cromosomas de un individuo.

RECESIVO: Describe cualquier rasgo que se expresa en un individuo homocigoto pero y que no está en un heterocigoto, es decir, dos copias de ese alelo son necesarios para manifestar su efecto.

RESUMEN

TITULO: Polimorfismos del gen de la quinasa 4 del receptor dopaminérgico acoplado a la proteína G (GRK4) como factores de riesgo para hipertensión arterial esencial (HAE) en una muestra poblacional de Bucaramanga.

AUTOR: LEÓN, Francisco Javier **

PALABRAS CLAVES: Gen GRK4, polimorfismos, 448G>T (R65L), 679C>T (A142V), 1711C>T (A486V), caso-control, proteína G, hipertensión arterial esencial.

DESCRIPCIÓN

Se ha sugerido que los receptores del gen de la quinasa 4 acoplados a las proteínas G (GRKs) están asociados al desarrollo de la hipertensión arterial esencial (HAE) y específicamente los polimorfismos 448G>T (R65L), 679C>T (A142V) y 1711C>T (A486V) de los receptores dopaminérgicos (DR1), porque afectan su actividad al hiperfosforilarlos, fenómeno que se refleja en la disminución de su capacidad de unión con la proteína G, cesando el efecto natriurético, y posibilitando el incremento de la carga de sodio y agua en el túbulo contorneado proximal y consecuentemente un aumento de la tensión arterial.

Objetivo: Determinar si los polimorfismos 448G>T (R65L), 679C>T (A142V) y 1711C>T (A486V) del gen de la quinasa 4 (GRK4) del receptor dopaminérgico acoplado a la proteína G son factores de riesgo independientes para HAE en una muestra poblacional de Bucaramanga.

Materiales y métodos: se seleccionaron un total de 549 individuos con HAE (casos) y 552 normotensos (controles), pareados por sexo, edad e índice de masa corporal (IMC). Para el cálculo de la muestra se contemplaron los parámetros: Nivel de confianza del 95%, poder de 86%, riesgo relativo esperado (RRE) de 2.0 y la frecuencia del alelo de menor prevalencia que fue del 11%. Se extrajo ADN por el método de fenol-cloroformo con posterior amplificación y detección por PCR-RFLP. Los datos obtenidos fueron analizados con los software Epi Info versión 3.5, Arlequín v 3.5 GenAlex 6.3 y Stata 9.

Resultados y discusión: Los polimorfismos se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg (EH-W), el más diverso fue el 448G>T (R65L) con una frecuencia de heterocigotos del 47,8% y no se encontró estructura genética poblacional ($F_{st} = -0,000007$). Para el análisis de asociación se empleó la regresión logística y no se encontró asociación entre ninguno de los polimorfismos del gen GRK4 y la HAE en la muestra poblacional estudiada.

* Trabajo de grado

** Facultad de salud. Escuela de Medicina y Escuela de Microbiología y Bioanálisis, Directora Adriana Castillo Pico.

RESEARCH ABSTRACT

TITLE: The polymorphisms in the G protein-coupled receptor kinase 4 gene (GRK4) (R65L, A142V and A486V) and essential hypertension as risk factors for essential hypertension (EH) in a population sample of Bucaramanga*

AUTHOR: LEON, Francisco Javier**

KEY WORDS: Gene GRK4, polymorphisms 448G> T (R65L), 679C> T (A142V), 1711C> T (A486V), case-control study, protein G, essential hypertension.

DESCRIPTION

It has been suggested that the receptors kinase 4 gene coupled to G proteins (GRKs) are associated with the development of essential hypertension (EH) and specifically the polymorphisms 448G> T (R65L), 679C> T (A142V) and 1711C> T (A486V) of dopamine receptors (DR1), because they affect its activity when being hyperphosphorylated- This phenomenon is reflected in the decline of their bond with the protein G, ceasing the natriuretic effect and enabling the increase of the load sodium and water in the proximal tubule and consequently an increase in blood pressure.

Objective: To determine whether polymorphisms 448G> T (R65L), 679C> T (A142V) and 1711C> T (A486V) of the G protein-coupled receptor kinase 4 gene (GRK4) are independent risk factors for EH in a population sample of Bucaramanga.

Materials and methods: We selected a total of 549 individuals with EH (cases) and 552 normotensive (controls), matched by sex, age and body mass index (BMI). To calculate the sample the following parameters were considered: confidence level of 95%, power of 86%, expected relative risk (ERR) of 2.0 and minor allele frequency of prevalence was 11%. DNA was extracted by phenol-chloroform method with subsequent amplification and detection by PCR-RFLP. The data were analyzed with Epi Info software version 3.5, Arlequin v 3.5 GenAEx 6.3 and Stata 9.

Results and discussion: The polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium (EH-W), the most different were 448G>T (R65L) with a heterozygote frequency of 47.8% and a population genetic structure was not found ($F_{st} -0.000007$). For the association analysis, logistic regression was used and we did not find any association between any of the GRK4 gene polymorphisms and EH in the sample population studied.

* Research abstract

** Facultad de salud. Escuela de Medicina y Escuela de Microbiología y Bioanálisis, Directora Adriana Castillo Pico.

INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades cardiovasculares (EC) fueron la primera causa de muerte a nivel mundial; en el año 2005, dentro de este grupo de patologías se encuentra la hipertensión arterial esencial (HAE) la cual es responsable de más del 90% de las consultas en cardiología.

La HAE tiene una etiología multifactorial, por tanto en ella participan diferentes factores tanto de naturaleza biológica como ambientales; entre los factores biológicos están la étnicidad, el sexo, la edad y los genes y entre los factores ambientales están la nutrición, la no actividad física, la ingesta de alcohol, el tabaquismo y el estrés; estos están relacionados con el estilo de vida de individuo y por tanto pueden ser modificables. También existen enfermedades de base que pueden influir en el desarrollo de HAE como la diabetes, obesidad y la hipercolesterolemia.

Desde la década de los 90 se ha dado gran importancia a los estudios genéticos a nivel molecular y en especial al estudio de los genes implicados en la regulación de los diferentes procesos fisiológicos, principalmente a nivel renal como uno de los sitios clave en la homeostasis corporal y por tanto en la regulación de la presión arterial.

En los últimos años ha tomado gran importancia el estudio de las proteínas G que participan en la regulación del equilibrio electrolítico a nivel renal y especialmente los polimorfismos 448G>T, 679C>T y 1711C>T del gen de la quinasa 4 del receptor dopaminérgico acoplado a las proteínas G; estos han sido involucrados como factores que afectan la función de la quinasa 4, produciendo la hiperfosforilación del receptor y disminuyendo su capacidad de unión con la

proteína G, cesando el efecto natriurético, y posibilitando aumento de la carga de sodio y agua con un aumento posterior de la tensión arterial en el individuo.

Este trabajo pretende establecer si existe asociación entre los niveles de tensión arterial y los polimorfismos del gen de la quinasa 4 (GRK4) utilizando un diseño de casos y controles en una muestra poblacional de Bucaramanga.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar si los polimorfismos 448G>T (R65L), 679C>T (A142V) y 1711C>T (A486V) del gen de la quinasa 4 (GRK4) del receptor dopaminérgico acoplado a la proteína G son factores de riesgo independientes para Hipertensión Arterial Esencial (HAE) en una muestra poblacional de Bucaramanga.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.2.1 Cuantificar las prevalencias de los polimorfismos 448G>T (R65L), 679C>T (A142V) y 1711C>T (A486V) del gen de la quinasa 4 (GRK4) en una muestra poblacional con hipertensión arterial esencial (casos) así como en una muestra poblacional no hipertensa (controles) de Bucaramanga.

1.2.3 Cuantificar las prevalencias de los haplotipos de los polimorfismos del gen de la quinasa 4 (GRK4) en una muestra poblacional de Bucaramanga.

1.2.2 Cuantificar la asociación entre los niveles de tensión arterial y los polimorfismos 448G>T (R65L), 679C>T (A142V) y 1711C>T (A486V) del gen de la quinasa 4 (GRK4) utilizando un diseño de casos y controles apareados por género y edad en una muestra poblacional de Bucaramanga.

2. MARCO TEORICO

2.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades cardiovasculares (ECV) fueron la primera causa de muerte a nivel mundial; en el año 2005, 17,5 millones de personas murieron a causa de este tipo de enfermedades (1), (2) y se prevé que sigan siéndolo. En América Latina y el Caribe en el año 2001, las ECV representaron alrededor del 31% de todas las muertes y se espera que esta cifra aumente a 38% en el año 2020 (3).

En Colombia durante el periodo de 1990-1996 representaron en promedio el 44.5% del total de la mortalidad del país (4) y en Santander, de acuerdo con los resultados de los indicadores de morbilidad de 2006 del observatorio de salud pública, basados en los registros individuales de prestación de servicios en salud (RIPS), la primera causa de morbilidad en consulta de cardiología fue la hipertensión arterial (HA) con un 77.88% (5) y en Bucaramanga según el estudio de factores de riesgo asociados con la prevalencia de HA en adultos realizado en 1996, esta fue del 22.9% (IC 95%: 18.6 a 27.3) ajustada por edad y sexo (6).

Entre las ECV se encuentra la enfermedad isquémica, la insuficiencia cardiaca y HAE entre otras patologías. Dentro de este grupo la HAE ha sido considerada como la principal causa de ECV y su etiología en gran parte es desconocida y por ello se ha clasificado como HAE o hipertensión de causa no determinada (7). En los últimos años ha tomado gran importancia el análisis genético de los diferentes sistemas que regulan la tensión arterial y a su vez el papel que tienen en el desarrollo de la HAE.

2.2 GENÉTICA DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL ESENCIAL

En la década de los años 40 Ayman, describió que los hijos de hipertensos tenían cifras elevadas de presión arterial y fijó la posibilidad de desarrollar hipertensión en un 3,1% en hijos de padres normotensos, 28,5% si uno de los progenitores era hipertenso y 45,5% si ambos lo eran, a su vez Stamler demostró que la incidencia de la enfermedad en una población con historia positiva de hipertensión era el doble en relación con los individuos normotensos y planteó que la predisposición a padecer hipertensión era de carácter poligénico, por tanto en ella participan diferentes factores tanto de naturaleza biológica como ambientales; entre los factores biológicos están la étnicidad, el sexo, la edad y los genes y entre los factores ambientales están la nutrición, la no actividad física, la ingesta de alcohol, el tabaquismo y el estrés; estos están relacionados con el estilo de vida de individuo y por tanto pueden ser modificables. También existen enfermedades de base que pueden influir en el desarrollo de hipertensión como la diabetes, obesidad y la hipercolesterolemia (8) (9). Posteriormente Pickering y cols en 1968 concluyeron que la relación entre presión arterial y padres e hijos era de forma lineal y adicionalmente la clasifico en hipotensión, normotensión e hipertensión (10). Años más tarde Weitz, concluyó en sus investigaciones que la hipertensión esencial era heredada a través de un único gen, atribuyéndole un carácter monogénico y propuso que se podrían esperar dos distribuciones distintas de la presión arterial en la población, los hipertensos y los normotensos (11). En los estudios actuales se plantea que en el origen genético de la HAE más de un gen está involucrado y por tal razón los rasgos mendelianos dominantes y recesivos no son fácilmente perceptibles en los sujetos hipertensos, excepto en aquellos con formas monogénicas de hipertensión (12).

La hipertensión esencial es una enfermedad común que tiene una etiología multifactorial, es decir tiene una combinación de múltiples causas genéticas en otros loci (es decir, las interacciones gen-gen) y de factores ambientales (es decir, interacciones gen-ambiente) como el estrés psicológico y la ingesta elevada de sal. (9) (12). En pacientes normales cuando se eleva la presión arterial, aumenta la excreción renal de sodio y agua, disminuyéndose así el volumen líquido y haciendo regresar la presión a la normalidad; este fenómeno se denomina “presión-natriuresis” (13), sin embargo en un paciente con HAE, un cambio en la relación de presión excreción de sodio, impide que la presión regrese a la normalidad. El papel central de los riñones en la regulación de este fenómeno se apoyó con los estudios realizados por Dahl y Heine (1975), usando ratas con predisposición genética que las volvía resistentes (R) o sensibles (S) a la acción hipertensiva de la sal, posteriormente se les realizó el trasplante de un riñón de un donador normotenso a uno hipertenso, evidenciándose la normalización de la presión arterial en la rata hipertensa y viceversa al trasplantar un riñón de una rata hipertensa se eleva la presión arterial en la rata normotensa (14). En los estudios realizados por Akita y cols en 2003, donde se evaluó el efecto de niveles bajos, intermedios y elevados de Na^+ (3, 6 y 9 g), administrados por 30 días cada uno en forma randomizada, asociado o no a dieta DASH (*Dietary Approach to Stop Hypertension*). En este estudio participaron 412 adultos con presiones sistólicas entre 120 y 160 y diastólicas entre 80 y 95 mm Hg, al reducir el aporte de Na^+ de 6 a 3 g. causó un descenso de presión arterial sistólica mayor que el obtenido cuando se redujo de 9 a 6 g (-4.6 versus -2.1 mm Hg); para presión diastólica el descenso fue mayor al descender de 9 a 6, que de 6 a 3 g (-1.1 versus 0.6 mm Hg) (15). En estos estudios se evidencia el papel importante del riñón en la regulación de la presión arterial y en manejo del metabolismo anormal del cloruro de sodio que es frecuentemente encontrado en sujetos con HAE. La hipertensión y la sensibilidad a la sal son dos factores importantes en la etiología de la HAE los

cuales han sido difíciles de dilucidar debido a las complejas interacciones entre los genes y el medio ambiente.

A partir de la década de los 90 el estudio de la hipertensión ha dado un giro de los estudios fisiológicos clásicos hacia la genética molecular desde donde se tratan de esclarecer como estos mecanismos regulan la homeostasis del sodio y como los genes y sus productos proteicos interactúan en las diferentes vías metabólicas que contribuyen a la enfermedad y se realiza especial énfasis en el túbulo proximal y rama gruesa ascendente de Henle del riñón donde ocurre el 70% de la reabsorción de sodio (16).

Actualmente se considera que el componente genético en la HAE es hasta de un 40% (17) evidenciándose una gran variabilidad interindividual en los valores de la tensión arterial; por lo cual para encontrar el posible gen o genes involucrados o aquellos que codifican proteínas que participan en la regulación de la presión sanguínea se han seguido dos estrategias. La primera es tratar de ubicar el gen de susceptibilidad realizando estudios de ligamiento genético para lo cual se requiere varias familias con múltiples casos de HAE, en ellas se busca establecer regiones relevantes que puedan contener múltiples genes de los cuales alguno pudiera ser el verdadero gen involucrado en el desarrollo de la HAE. La otra estrategia consiste en realizar estudios de asociación con genes candidatos (17), este tipo de estudios tiene la particularidad que la población en estudio queda compuesta por un grupo de sujetos con HAE (casos) y un grupo de sujetos sin HAE (controles), los cuales no están emparentados entre sí y se controlan otras variables como el género y la edad (18) (19) (20).

2.3 POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL ESENCIAL

El polimorfismo genético hace referencia a la existencia de dos o más alelos de un gen que se segregan en una población, es decir, un polimorfismo es una variación en el tamaño o en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos y con una frecuencia del alelo menos común mayor al 1% en la población (21) (22).

Los polimorfismos de tamaño corresponden a diferencias en el tamaño de ciertos fragmentos del ADN cuya secuencia común de nucleótidos se repiten varias veces una a continuación de la otra (repetición en tándem), por tanto los individuos se diferencian por el número de veces que tienen esta repetición, y consecuentemente por el tamaño total del fragmento. Los polimorfismos de tamaño más estudiados en el genoma son los microsatélites o STR (*Short Tandem Repeat*) cuyo motivo de repetición es de 2 a 7 pb y los minisatélites o VNTR (*Variable Number of Tandem Repeat*) cuyo motivo de repetición es de 10 a 70 pb (23).

Por otra parte los polimorfismos de secuencia corresponden a diferencias en la secuencia de una región del ADN donde un nucleótido puede cambiar por otro, esta variación afecta a una sola base nitrogenada, originado así diferencias en esa secuencia entre los individuos de una población; también se denominan polimorfismo de un solo nucleótido o SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). y se presentan aproximadamente cada 1,300 bases en el genoma humano (24) (25).

Al ser la HAE una enfermedad multifactorial los estudios para tratar de dilucidar sus orígenes se han enfocado en los diferentes genes que de una u otra manera intervienen en el control de la presión sanguínea y que codifican enzimas y péptidos del sistema renina-angiotensina o de otras proteínas relacionadas con manejo del flujo sanguíneo y en el equilibrio electrolítico; y a su vez el estudio de estos genes ha permitido dilucidar los efectos de algunos polimorfismos específicos que están asociados con el desarrollo de la HAE en diversas poblaciones humanas (Tabla 1) (26). (27).

Entre los polimorfismos genéticos que se han estudiado se incluyen los ubicados en el gen de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE), angiotensinogeno (AGT), el receptor tipo 1 de la angiotensina II (AGTR1), la sintasa aldosterona (CYP11B2) (28) (29) (30), el receptor quinasa 4 acoplado a la proteína G (GRK4) (31) y la sintasa de óxido nítrico endotelial (NOSe). (32) (33).

Algunas de las proteínas de estos genes interactúan entre sí para ejercer su acción, tal es el caso de la dopamina, su receptor DR1 esta acoplado a la proteína G en el túbulo contorneado proximal y el receptor tipo 2 de la angiotensina II implicados en la regulación de la función renal donde el efecto vasoconstrictor renal de la angiotensina II es contrarrestado por el efecto vasodilatador de la dopamina. (34)

Tabla 1. Genes candidatos para hipertensión

MECANISMO RELACIONADO	PRODUCTO DEL GEN CANDIDATO	POLIMORFISMOS	REFERENCIAS
Sistema renina-angiotensina	Angiotensinógeno	C-532T, G-6A, T-174M, M-235T	Vargas y cols 2006
	Enzima convertidora de	Delección/inserción intrón 16	Staessen y cols 1999
	Angiotensina Receptor tipo I de	A-1166C	Staessen y cols 1997
	angiotensina II	C-344T	
	Aldosterona sintasa		
Péptidos vasoactivos	Óxido Nítrico Sintasa Endotelial	Glu298Asp, -789T>C, 4a4b Int 14,	Veldman y cols 2002
	Carbamil fosfatasa sintasa	T786C, G894T,	Chrysohoou y cols
	EDHF sintasa	T1405N, R139K, K269F, K399R	2004 Wang y cols 1997
Sistema nervioso simpático	Receptor $\alpha 2\beta$ adrenérgico	Delección/inserción 297-309	Herrmann y cols
	Receptor $\beta 1$ adrenérgico	R389G, S49G	2002
	Receptor $\beta 2$ adrenérgico	R16G, Q27E, C19R (T-47C), T-20C, G16R (G+46A), Q27E (C+79G)	Bao y cols 2005
Proteína G	Quinasa 4 del receptor dopaminérgico	R65L, A142V, A486V, C825T	Wang y cols 2006 Bengra y cols 2002 Speirs H y cols 2004

Fuente VARGAS ALARCÓN, Gilberto. Fisiopatogenia de la hipertensión. Arch Cardiol Mex 2006; 76: S2, p. 157-160. R- Arginina, L- Leucina, A- Alanina, V- Valina, G- Glicina, S- Serina, Q- Glutamina, E- Acido glutámico, K- Lisina, F- Fenilalanina.

2.4 RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G

La dopamina es una catecolamina endógena que produce una gran diversidad de efectos biológicos mediados por interacciones con receptores específicos en la superficie celular y además regula diferentes sistemas de señalización a través de receptores acoplados a la proteína G (GPCRs).

Los GPCRs, representan el grupo más diverso de proteínas de señalización conocidas (35) y pertenecen a la familia de los receptores de la rodopsina, que se caracterizan por poseer siete dominios transmembrana (7TM). Los GPCRs están implicados en la regulación de una gran variedad de procesos fisiológicos, como las percepciones sensoriales del dolor, la luz, olores y los gustos, la cognición, la contracción muscular, secreciones exocrinas y endocrinas, el metabolismo, la inflamación y la inmunidad. (36)

Los GPCRs se clasifican en tres grupos basados en el tamaño de la región N terminal, en la homología de secuencia y la identidad de los residuos conservados dentro de los siete dominios transmembrana que participan en la unión del ligando, el modo de acción, y la farmacología (37) (38)

- Clase A es el grupo más grande (más del 90%), comprende la rodopsina, los receptores de las aminas biógenas, péptidos y sustancias odoríferas.
- Clase B es el grupo más pequeño y son receptores de péptidos de gran tamaño como la secretina, citoquinas, la trombina, y el glucagón.
- Clase C está compuesta aproximadamente por 12 miembros como el receptor ácido γ -aminobutírico B (GABA), ocho receptores metabotrópicos de glutamato, el receptor del Ca^{2+} y los receptores de algunos feromonas y gusto (39)

Dentro de los GPCRs de la clase A están los receptores de la dopamina, que farmacológicamente se han clasificado en dos tipos, importantes en el cerebro y en la vasculatura esplácnica y renal, denominados D1R y D2R. Los receptores D1R están constituidos por los subtipos D1 y D5, que se acoplan proteínas G_s y G_{olf} que estimulan la adenilatociclasa, por otro lado el receptor D1 también estimula la fosfolipasa C (PLC) contrario a receptor D5 que la inhibe. Los

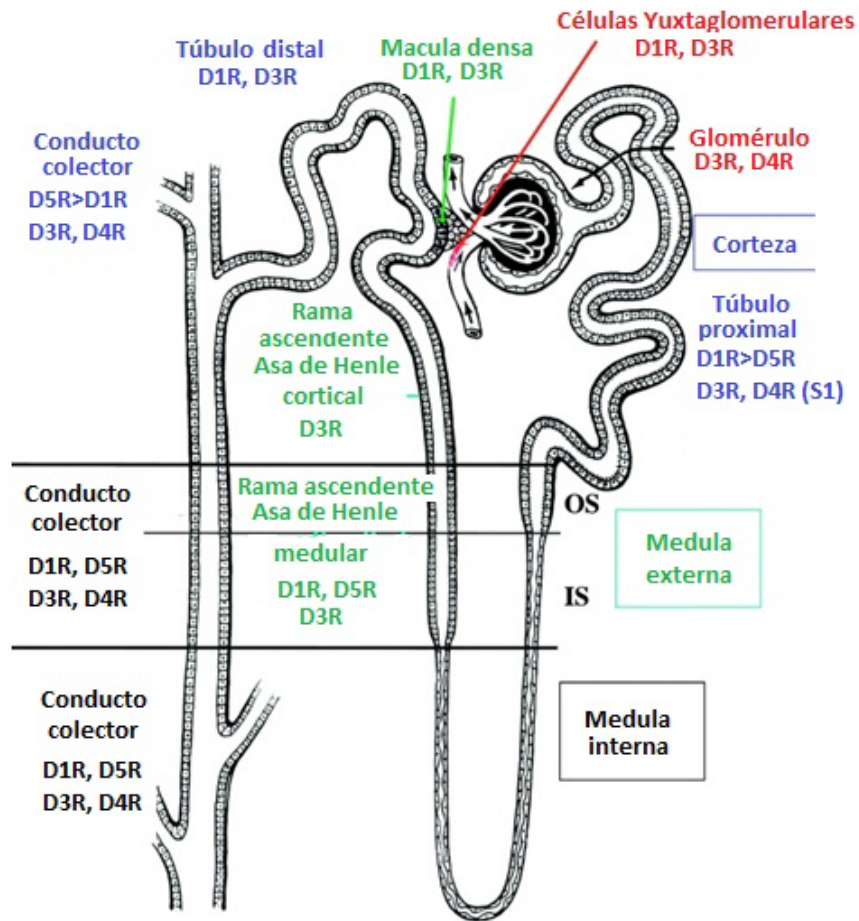
receptores tipo D2R están compuestos por los subtipos D2, D3 y D4 que se acoplan a las proteínas Gi y Go que inhiben la adenilatociclasa (40) (41). Los receptores D1 y D5 se clonaron por primera vez a principios de 1990 (42) y el receptor D1 consta de 446 aminoácidos, mientras que el D5 se compone de 477 aminoácidos en humanos y 475 en ratas. Estos receptores comparten un 82% de homología en la región transmembrana de las hélices y el 100% en la región de unión al ligando.

2.5 RECEPTORES RENALES DE DOPAMINA

A nivel renal la dopamina es producida por los túbulos proximales a partir del precursor L-3,4-hidroxifenilalanina (L-DOPA) proveniente de la circulación que no se metaboliza a la norepinefrina y actúa en forma autocrina y paracrina para regular el transporte de sodio en el túbulo contorneado proximal y la rama gruesa ascendente de Henle. Los diferentes subtipos de receptores de dopamina son expresados en diversas partes del riñón, esto fue determinado por O'Connell DP y cols en 1995 y 1997, quien empleando técnicas de inmunohistoquímica en riñones de rata localizaron receptores D2, D3 y D4 en la túnica adventicia media de las arteriolas renales y en los nervios presinápticos. Amenta y cols en 1999, trabajando en riñones de rata con técnicas de inmunohistoquímica (anticuerpos antidopamina D1A y anticuerpos para el receptor D1B), establecieron diferentes localizaciones del subtipo DR1 a lo largo de la nefrona, sus resultados mostraron que los receptores D1R se encuentran principalmente en el epitelio del asa de la nefrona (asa de Henle) y de los túbulos colectores y en menos cantidad en los túbulos contorneados proximal y distal, así como en el complejo yuxtaglomerular. En los estudios realizados por O'Connell y cols en 1995 demostraron que en el túbulo proximal de ratas se expresan los receptores D1>D5, D3 en los segmentos

S1, S2 y S3, y los receptores D4 en el segmento 1 y; en otros sitios como la mácula densa y las células yuxtaglomerulares se expresan los receptores D1 y D3. (Figura 1). (43) (44) (45).

Figura 1. Expresión de los receptores de dopamina en la nefrona



Fuente. Zeng, C. y cols. *Physiol. Genomics* 19: 233-246 2004; doi:10.1152/physiolgenomics.00127.2004 usado con permiso de la American Physiological Society.

Los trabajos de Ozono y cols en 1997 mediante Western blot e inmunohistoquímica fueron pioneros porque proporcionaron la primera evidencia de la localización y expresión de la proteína de los receptores D1R en el corazón

humano y el riñón, sus hallazgos a nivel renal evidenciaron que los receptores D1R se encuentran en los túbulos proximales y distales, en los túbulos colectores, y en los grandes vasos grandes intrarrenales y se demostró la ausencia de los D1R en células del aparato yuxtaglomerular y los glomérulos (46)

La familia de receptores acoplados a la proteínas G (GPCRs) que median la acción de la dopamina están ubicados en diferentes porciones de la nefrona específicamente en el Túbulo Contornado Proximal (TCP) son la familia D1R (D1 y D5) que estimulan la actividad de la adenilatociclasa y la familia D2R (D2, D3 y D4) que inhiben la actividad de la adenilatociclasa y activan los canales de calcio y modulan la actividad de los canales de potasio. (40)

2.6 EFECTOS RENALES DE LA DOPAMINA

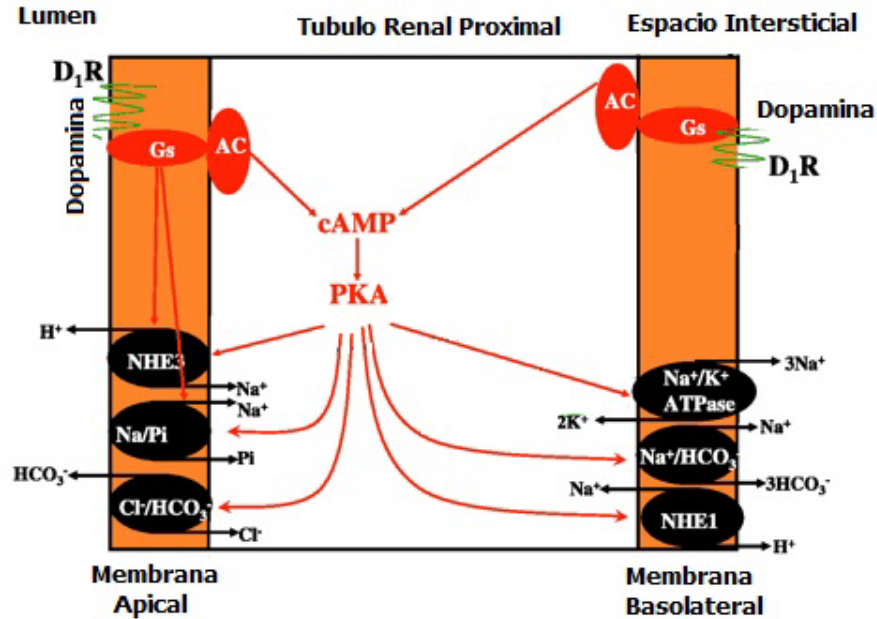
El proceso de transducción de señales mediante D1R se da tras la unión a ligandos como la dopamina, que generan cambios conformacionales en el receptor que se evidencian en el acople a la proteína G heterotrimerica, este acoplamiento estimula la proteína G para alterar la actividad de una variedad de moléculas efectoras posteriores (47), este es un sistema dinámico donde el acoplamiento de la proteína G inicia la generación de segundos mensajeros que a su vez genera un “*feed back*” que busca la desensibilización del receptor (complejo Dopamina-D1R), esta respuesta de adaptación utilizada por las células busca detener la señalización de la proteína G, evitándose de esta forma los efectos potencialmente nocivos que pueden derivarse si en los receptores persiste la estimulación (48).

Esta catecolamina produce varios efectos vasodilatadores sobre la arteriola aferente renal, el primero es mediado por los receptores DR1, que aumentan la

presión intraglomerular (PIG), elevan el flujo sanguíneo renal y el filtrado glomerular (49); el segundo es un efecto natriurético a través de receptores DR1 acoplados a proteínas G (GPCRs) en el túbulo contorneado proximal y en la rama ascendente de Henle (34) (40); en consecuencia la natriuresis es causada por un incremento en el flujo sanguíneo renal y una disminución en la reabsorción renal de sodio en los túbulos (50); la dopamina es responsable del 50% de la excreción de sodio durante un exceso de este electrolito y ejerce su acción inhibiendo el transporte de sodio en varios sitios a lo largo de la nefrona en la membrana luminal actuando sobre varios transportadores NHE3, Na⁺/Pi, Na⁺/HCO₃⁻, Cl⁻/HCO₃⁻; en la membrana basolateral inhibe el cotransportador NHE1 y la bomba Na⁺-K⁺-ATPasa (Figura 2); este efecto de la dopamina sobre la bomba está regulado por el sodio y calcio intracelular cuando las concentraciones intracelulares de sodio son altas (>20 mM), y cuando las concentraciones intracelulares de calcio son bajas (<150 nM) (40).

En presencia de calcio, el receptor D1 puede estimular la actividad de la fosfolipasa C (PLC), en el riñón, dando lugar a la formación de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) (aumento citosólico de calcio) y diacilglicerol (DAG), por otro lado la PKA también pueden activar directamente PLC. El aumento del calcio intracelular inducido por IP3 y PKC también puede inhibir la actividad NHE3 promoviendo su endocitosis. Ambos PKA y PKC median la inhibición dopaminérgica de la bomba Na⁺-K⁺-ATPasa. Por lo tanto el resultado neto es una disminución en el transporte de sodio desde la luz tubular hacia el espacio intersticial (41) (34) (40). De esta forma la dopamina ejerce su acción a través de receptores acoplados a las proteínas G, y estas a su vez están reguladas por los receptores quinasa 4 acoplados a las proteínas G (GRK4), y cuando se presentan polimorfismos en estos receptores quinasa (GRKs), se generan alteraciones fisiológicas como la hipertensión y la sensibilidad a la sal (Figura 2) (34) (40).

Figura.2. Acción de la dopamina sobre los receptores D1R en células del túbulo renal proximal y su efecto sobre el transporte de solutos



Fuente. Zeng, C. y cols. *Physiol. Genomics* 19: 233-246 2004; doi:10.1152/physiolgenomics.00127.2004 usado con permiso de la American Physiological Society.

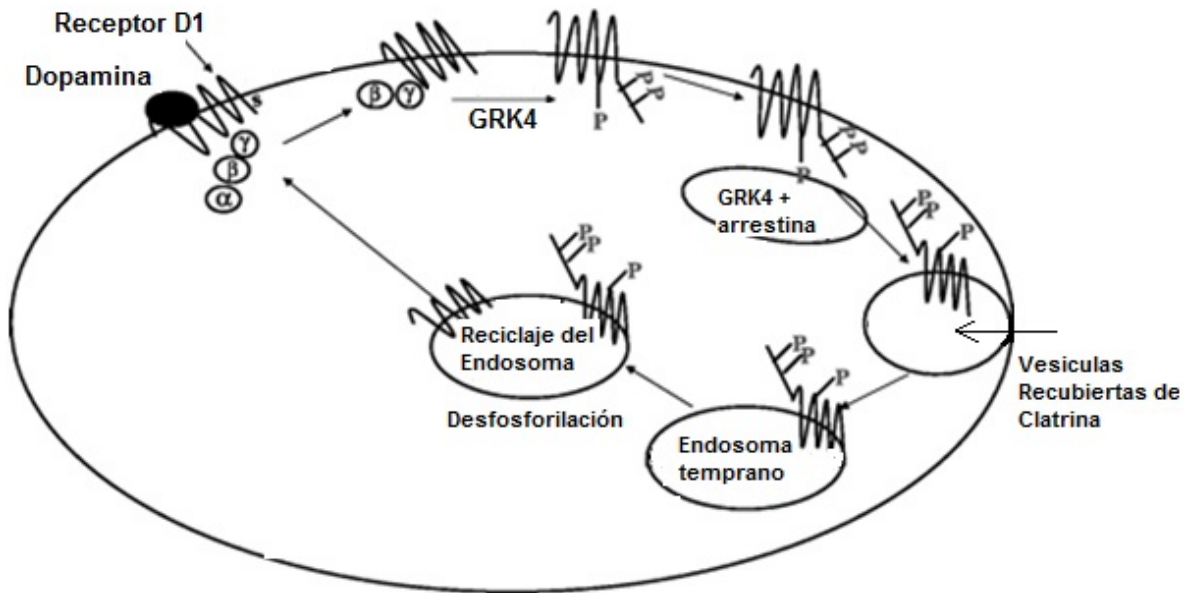
2.7 RECEPTORES QUINASA ACOPLADOS A LAS PROTEÍNAS G (GRK4)

El gen de las GRKs fue identificado por clonación posicional en la búsqueda del locus de la enfermedad de Huntington por Ambrose y cols en 1993. El gen GRK4 está ubicado en el cromosoma 4p16.3 y está compuesto por 16 exones que comprenden 75 kilobases de ADN (51). Las siete GRKs identificadas son quinasas serina-treonina, que se dividen en tres subfamilias clasificadas de acuerdo con las similitudes estructurales y funcionales: GRK1/7, GRK2/3, y GRK4/5/6 (36). La estructura básica de los miembros de la familia GRK es similar, con un alto dominio catalítico central conservado (aminoácidos 263-266), la región N-terminal

de 185 aminoácidos RGS es un regulador de la señalización de la proteína G que contribuye al reconocimiento de los receptores y un dominio variable carboxilo terminal importante para la membrana porque media las interacciones con otras proteínas. La región carboxilo terminal permite que las GRKs se asocien a la membrana plasmática a través de la unión covalente de cualquiera de los ácidos grasos o isoprenoides por su extremo carboxilo terminal: GRK4 (51) y GRK6 son palmitoiladas (52), mientras que GRK1 es farnesilada (53), por otra parte, GRK7 es geranylgeranilada (54) (55), la GRK5 está también asociada con la membrana a través de las interacciones fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) (56). La familia GRK7 se encuentra principalmente en la retina, por lo que media la desensibilización de opsinas y la GRK4 se encuentra principalmente en los testículos y el riñón (36).

La desensibilización de los GPCRs requiere acciones coordinadas de dos familias de proteínas, los GRKs, y las arrestinas. La dopamina al activar los GPCRs adoptan una conformación que favorece la interacción con las GRKs, estas fosforilan los residuos de serina y treonina en el bucle de la cola carboxilo terminal intracelular de los GPCRs; la fosforilación aumenta la afinidad de los GPCRs por las arrestinas, que interactúan con el receptor y desacoplan esta asociación con la proteína G heterotrimérica, resultando en la desensibilización (Figura 3), esto permite que el complejo se acople con la arrestina y se internalice a través de pozos recubiertos de clatrina, formándose un endosoma donde el DR1 es desfosforilado y reciclado nuevamente a la membrana plasmática; de lo contrario, es degradado por los lisosomas o por los proteasomas (57).

Figura 3. Desensibilización de los receptores D1R por medio de la quinasa 4 del receptor de la proteína G (GRK4) en los túbulos proximales renales



Fuente. Zeng, C. y cols. *Physiol. Genomics* 19: 233-246 2004; doi:10.1152/physiolgenomics.00127.2004 usado con permiso de la American Physiological Society.

Para aclarar este proceso Perry y cols., 2002, demostraron que el complejo proteína-receptor (Gs-β2AR) y las β-arrestinas interactúan con fosfodiesterasas (PDE4), fenómeno que se observa después de la activación de los receptores β2 adrenérgicos. Posteriormente las β-arrestinas son reclutadas y las moléculas del receptor desensibilizadas, efecto que se logra translocando las PDE4s con el complejo (Gs-β2AR) en la membrana plasmática de esta forma se afecta la actividad de la enzima adenilatociclase que se encuentra en la membrana plasmática y que es la encargada de catalizar la producción de AMP cíclico, esto resulta en una reducción tanto en la tasa de síntesis de de AMP cíclico como en el incremento en la tasa de su degradación al aumentar la actividad de la PDE4

presente en la membrana de esta manera las β -arrestinas desensibilizan los receptores a través de la degradación del segundo mensajero (58).

En modelos experimentales con ratas Dahl sensibles a la sal y Ratas Espontáneamente Hipertensas (SHRS) y humanos con HAE, se ha observado que el transporte epitelial de sodio se deteriora debido a un desacoplamiento del D1 receptor de la proteína G del complejo efector siendo similar al observado en el proceso de desensibilización (59).

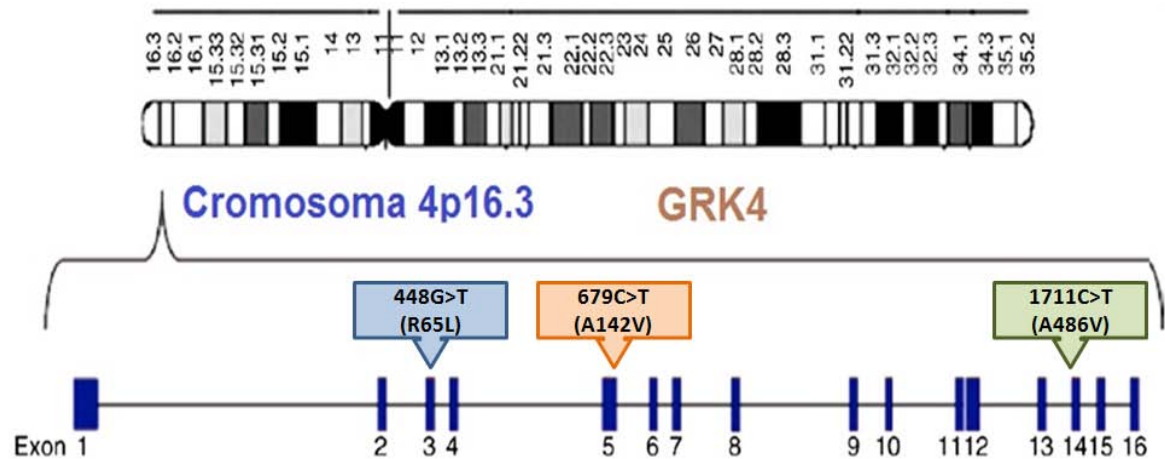
2.8 POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA QUINASA 4

Las GRK4 dentro de la familia GRKs es la única que presenta 4 variantes después del splicing (GRK4 α , β , γ , y δ). La variante GRK4 α , es la isoforma de mayor longitud y es la más homóloga con las demás GRKs. La variante GRK4 β carece de exón 2, porque presenta una deleción de 32 residuos, que compromete el dominio de unión del fosfatidilinositol bifosfato cerca de la región N terminal. La variante GRK4 γ carece del exón 15, porque presenta una deleción de 46 residuos cerca de la región C terminal, y la variante GRK4 δ es la más corta y carece de ambos exones el 2 y 15 (40).

En la HAE el desacople del receptor renal (D1R) y la dopamina es defectuoso, dando lugar a la alteración de la excreción urinaria de sodio, especialmente cuando se presentan tres variantes polimórficas de la isoforma gama 448G>T (R65L), 679C>T (A142V) y 1711C>T (A486V) (60) (29) localizadas en los exones 3, 5 y 14 del gen GRK4 respectivamente, que afectan la función de la quinasa 4 de la proteína G (figura 4), al generar la hiperfosforilación de los residuos de serina

del receptor D1R, lo que deteriora la capacidad de unión con la proteína G, cesando así el efecto natriurético y posibilitando el aumento de la carga de sodio y agua; lo que lleva al aumento de la tensión arterial, efecto observado en roedores y en humanos (61) (41) (62)

Figura 4. Localización de los polimorfismos del gen de la quinasa 4



El gen GRK4 está localizado en el cromosoma 4p16.3. El polimorfismo 448G>T (R65L) se localiza en el exón 3, el 679C>T (A142V) en el exón 5 y el 1711C>T (A486V) en el exón 14.

Felder y cols. en el 2002, utilizó ratones transgénicos que tenían el polimorfismo 679C>T (A142V), en ellos la actividad quinasa sobre el receptor D1R era mayor y desarrollaron un fenotipo hipertenso, mientras que ratones tipo silvestre (sin este polimorfismo) no lo hicieron, evidenciándose que el aumento de la fosforilación del receptor DR1 por la GRK4 produce un deterioro de la transducción de la señal que en última instancia puede conducir a la HAE debido a la retención de sodio por una respuesta inadecuada de los receptores responsables de su regulación (63) (62). Por el contrario, ratones transgénicos con el polimorfismo GRK4 γ 486V se volvieron hipertensos después de un aumento en la ingesta de sodio (40).

En estudios poblacionales realizados en caucásicos italianos por Bengra y cols. 2002, el polimorfismo asociado con HAE era el 486V, al igual que en los estudios realizados en australianos por Speirs H y cols. 2004. En el estudio realizado por Williams y cols. 2003, entre ghaneses y afroamericanos los polimorfismos asociados con HAE fueron el 65L y 142V. En el estudio realizado por Wang y cols 2006, en un grupo de pacientes chinos el polimorfismo de riesgo para HT fue el A486. En el meta-análisis realizado por Zeng y cols 2009, el polimorfismo 486V mostro una asociación significativa con la hipertensión con un odds ratio de 1,5 (IC 95%: 1,2 a 1,9) diferente a los otros dos polimorfismos que no mostraron una asociación significativa.

Considerando lo anterior esta investigación busco establecer si existía asociación de los polimorfismos 448G>T (R65L), 679G>T (A142V) y 1711C>T (A486V) del gen de la quinasa 4 (GRK4) del receptor acoplado a la proteína G y la HAE en una muestra poblacional de estratos dos y tres de la ciudad de Bucaramanga; esta información podría suministrar una herramienta valiosa para identificar personas con alto riesgo de HAE. La identificación de personas a riesgo es un elemento fundamental en la implementación de programas de prevención; ésta es posible hacerla por medio de estrategias de eficacia probada como la reducción de peso, el aumento de la actividad física, la reducción de la ingesta de sal y el tratamiento temprano de personas con presión elevada. Por otra parte, este estudio podría contribuir a una mejor comprensión del rol de factores genéticos y ambientales y las interacciones que pudieran darse entre los diferentes genes involucrados y los factores modificables responsables de la HAE.

3. PREGUNTA E HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

3.1 PREGUNTA

¿Son los polimorfismos 448G>T (R65L), 679G>T (A142V) y 1711C>T (A486V) del gen quinasa 4 del receptor acoplado a la proteína G (GRK4), factores de riesgo de la hipertensión arterial esencial humana (HAE) en una muestra poblacional de Bucaramanga?

3.2 HIPÓTESIS

Los polimorfismos 448G>T (R65L), 679G>T (A142V) y 1711C>T (A486V) del Gen quinasa 4 del receptor acoplado a la proteína G (GRK4), son factores de riesgo independientes de hipertensión arterial esencial (HAE) en una muestra poblacional de Bucaramanga.

4. METODOLOGÍA

4.1 TIPO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio de casos y controles pareados por género y edad, anidado en una encuesta transversal.

4.2 ÁREA DE ESTUDIO

Bucaramanga. Santander. Colombia

4.3 MUESTRAS

Se seleccionaron 1118 muestras del estudio Incidencia de Enfermedades Cardiovasculares y estudio de Factores de Riesgo en Colombianos INEFAC (64), en el que participaron 2989 personas, con edades entre los 19 y 69 años, con un promedio de edad de 35,1 años (95% IC 34.6-35.6) (65). Las muestras fueron tomadas con anticoagulante EDTA y estaban almacenadas a -70°C en la sede Guatiguara de la Universidad Industrial de Santander (Piedecuesta, Santander, Colombia). Todos los participantes diligenciaron y firmaron un consentimiento informado para la realización de pruebas genéticas (Anexo A).

4.4 CÁLCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA

El cálculo de la muestra se realizó con el software EPIDAT versión 3.1 (66), teniendo en cuenta la frecuencia del alelo de menor prevalencia para los

polimorfismos 448G>T (R65L), 679C>T (A142V) y 1711C>T (A486V) en los sujetos seleccionados como caso (hipertensos) en diferentes estudios revisados (tabla 2) (67).

Tabla 2. Prevalencia del los polimorfismos 448G>T (R65L), 679C>T (A142V) y 1711C>T (A486V) en los sujetos hipertensos en varias poblaciones.

Poder	Control:Caso	Prevalencia del polimorfismo en casos			OR	Tamaño de muestra		Referencia
		448G>T (%)	679C>T (%)	1711C>T (%)		Controles	Casos	
NE*	1:1	41**	37	51	1,79	60	60	Bengra y cols, 2002
98% 98% 75%	2:1	40	39	50	1,5	312	168	Speirs y cols, 2004
NE	1:2	49	66	12	1,37	51	126	Williams y cols, 2004
NE	1:1	11	17	45	1,5	490	503	Wang y cols, 2006

* NE: No especificado, ** Frecuencia del alelo de menor prevalencia. OR Odds Ratio

La frecuencia de menor prevalencia para el polimorfismo 679C>T (A142V) fue el alelo T (37%) en caucásicos italianos (60), para el polimorfismo 1711C>T (A486V) fue el alelo T (12%) en Ghaneses (68) y para el polimorfismo 448G>T (R65L) fue el alelo T (11%) en Chinos (62); esta última prevalencia (11%) se consideró para el cálculo del tamaño de muestra, por ser la más baja de los tres polimorfismos analizados, adicionalmente se contemplaron los parámetros de nivel de confianza del 95%, poder de 86%, riesgo relativo esperado (RRE) de 2.0 y relación caso:control 1:1. El tamaño de muestra arrojado por el software fue de 1066 muestras (533 casos y 533 controles) como se puede observar en la tabla 3.

Tabla 3. Cálculo del tamaño de muestra.

Confianza	Poder	Control:Caso	Prevalencia del polimorfismo en casos*	RRE*	Tamaño de muestra		Total muestra
					Controles	Casos	
95%	86	1:1	39% (678c>T)*	2	185	185	370
95%	86	1:1	37% (679C>T)†	2	191	191	382
95%	86	1:1	12% (1711C>T)‡	2	491	491	982
95%	86	1:1	11% (448G>T)°	2	533	533	1066

Se realiza considerando la frecuencia del alelo de menor prevalencia en varias poblaciones. *RRE, Riesgo Relativo Esperado. **Speirs y cols, 2004. †Bengra y cols, 2002. ‡Williams y cols, 2004. °Wang y cols, 2006.

Considerando que en el proyecto INEFAC existían 26 casos más respecto al tamaño de muestra calculado, se seleccionó la totalidad de los casos para un total de 559 individuos y de la misma manera se procedió con los controles seleccionando 559 de los 856 individuos normotensos del proyecto INEFAC, para establecer una relación de 1:1, pareados por sexo, edad y obesidad ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$) para un total de 1118 muestras.

4.5 DEFINICIÓN DE CASOS

Se definieron como “casos”, las muestras de sujetos del proyecto INEFAC a quienes se les promediaron dos medidas de tensión arterial y se clasificaron como hipertensos por tener un nivel de presión arterial sistólica (PAS) $>120 \text{ mmHg}$ y/o presión diastólica (PAD) $>80 \text{ mmHg}$ de acuerdo con los criterios definidos en el VII Reporte del Comité Nacional Conjunto para la prevención, detección, evaluación y tratamiento de hipertensión arterial (69) (Tabla 4).

Tabla 4. Clasificación de los niveles de presión sanguínea según el *Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure*

CATEGORÍA	VALOR
Presión normal	(PAS <120 y PAD<80)
Pre-hipertensión	(PAS 120-139 o PAD 80-89)
Hipertensión	(PAS ≥140 o PAD ≥90)
Hipertensión estadio 1	(PAS 140-159 o PAD 90-99)
Hipertensión estadio 2	(PAS ≥160 o PAD ≥100)

PAS, Presión Arterial Sistólica (mmHg). PAD, Presión Arterial Diastólica (mmHg).

Fuente. JAMA 2003; 289:2560-2572.

Considerando las categorías anteriores y revisando la incidencia de hipertensión en el proyecto INEFAC (64), se seleccionaron los individuos que cambiaron a una categoría de presión arterial (PA) más alta desde CARMEN a INEFAC. De acuerdo con estas categorías los individuos “caso” fueron 385 individuos normales en CARMEN y pre-hipertensos en INEFAC más 174 individuos normales o pre-hipertensos en CARMEN e hipertensos en INEFAC, para un total de 559 individuos casos.

4.6 DEFINICIÓN DE CONTROLES

Se definieron como “controles”, las muestras de los sujetos del proyecto INEFAC, a quienes se les promediaron dos medidas de tensión arterial y los resultados obtenidos fueron de presión arterial sistólica (PAS) <120 mmHg y/o presión diastólica (PAD) <80 mmHg, por lo que se clasificaron como normotensos de

acuerdo con los criterios definidos en el VII Reporte del Comité Nacional Conjunto para la prevención, detección, evaluación y tratamiento de hipertensión arterial (69) (Tabla 4), considerando lo anterior los individuos con PA normal en CARMEN y en INEFAC fueron 856 individuos controles de los cuales se seleccionaron 559 para mantener la relación 1:1.

4.7 PAREAMIENTO DE LOS CASOS Y CONTROLES

El apareamiento de los casos con los controles se hizo con el software estadístico Stata 9®, por frecuencia, para lo cual, se creó la variable "edgrpC" correspondiente a los grupos de edad, la otra variable de apareo fue obesidad, definida como $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ y por último se incluyó la variable sexo, todos los datos fueron tomados de la base de datos del proyecto INEFAC (64), con estas tres variables se construyeron estratos y se estimó la distribución proporcional de casos en cada estrato, y se obtuvo una muestra de controles que seguía la distribución observada en los casos.

Primero, se muestreó al azar un número de controles igual al número de casos en cada estrato definido por sexo, edad y obesidad ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$); en algunos estratos esto no fue posible, ya que el número de casos era mayor que el número de controles, cuando esto ocurría se muestrearon controles adicionales de los estratos adyacentes (mitad del estrato anterior y mitad del estrato siguiente, si esto era posible. Por ejemplo, en el estrato 7 faltaban $7-1=6$ controles, que fueron muestreados del estrato 6 (3 controles) y del estrato 8 (3 controles). Aun después de completar este paso, el número de casos en algunos estratos supera al número de controles. En total había 124 casos más que controles. En consecuencia, un grupo adicional de 124 controles fue seleccionado al azar de los estratos en los cuales todavía quedaban controles que no se habían seleccionado para el estudio.

En resumen, 412 controles se seleccionaron apareados por edad-sexo-obesidad; 23 se seleccionaron de los estratos adyacentes (apareamiento imperfecto); y 124 se seleccionaron al azar. Por último los individuos se organizaron en grupos aleatorios de aproximadamente 30 sujetos.

4.8 VARIABLES

Para la construcción de la base de datos se seleccionaron las siguientes variables:

4.8.1 Sociodemográficas

- Edad: En años cumplidos. (Razón)
- Género: Hombre / Mujer. (Nominal)

4.8.2 Factores de riesgo

- Índice de masa corporal: Kg/m². (Razón)
- Antecedente personal de enfermedad cardiovascular: Historia personal de enfermedad cardiovascular. (Nominal)
- Antecedente familiar de enfermedad cardiovascular: Historia de enfermedad cardiovascular en familiares de primer grado de consanguinidad (Nominal)
- Niveles de presión arterial: En milímetros de mercurio, siguiendo las indicaciones y clasificación del VII Reporte del Comité Nacional Conjunto para la prevención, detección, evaluación y tratamiento de hipertensión arterial (69)(Razón)
- Niveles séricos de lípidos: En miligramos por decilitro de triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL. Se clasificará de acuerdo con el III Panel

del Programa Nacional de Educación en el Tratamiento del Colesterol en adultos (70), (71) (Razón)

- Glicemia: En miligramos por decilitro. Se clasificará de acuerdo con los criterios de la Asociación Americana de Diabetes (72). (Razón)
- Actividad física: En horas por día y días por semana por tipo de actividad. (Razón)
- Genotipificación GRK4: 448G>T (R65L), 679C>T (A486V), 1711C>T (A142V) (Nominal)

4.9 GENOTIPIFICACIÓN

Se realizó en el laboratorio de Genética de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander. Los análisis de todas las muestras fueron efectuados en forma enmascarada para evitar sesgos y el 10% de las muestras se procesaron por duplicado como control de calidad.

4.9.1 Extracción de ADN. La extracción de ADN se realizó por el método modificado de fenol-cloroformo (73) mediante el siguiente protocolo: se tomaron 100ul de “buffy coat” obtenido de 3 ml de sangre total tomada con anticoagulante EDTA, se resuspendieron en 500 µl de tampón DLB (100 µl de Tris/HCl 1M pH 7,4, 20 µl de NaCl 5M, 200 µl de EDTA 0,5M pH 8,0 y 9,7 ml de agua bidestilada), posteriormente se añadieron 50 µl de sodio dodecil sulfato (SDS) al 10% y 5 µl de proteinasa K (20mg/ml) (almacenada a -20 °C), se incubaron a 56°C toda la noche con agitación suave; al día siguiente se retiró y se le dio un spin, posteriormente se añadieron 20 µl de NaCl 5M y 287,5 µl de fenol a 4°C y 287,5 µl de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 a 4°C y se mezcló por inversión, luego se centrifugó por 3

minutos a 12000 rpm, y se pasó la fase acuosa (fase superior) a otro tubo de microcentrífuga (eppendorf®), de 1,5 ml con una punta de pipeta amarilla cortada para obtener un mayor diámetro). Seguidamente se añadieron 575 µl de cloroformo: alcohol isoamílico, 24:1 a 4°C, se mezcló por inversión y centrifugó nuevamente. Se repitió el paso anterior recogiendo la fase acuosa en un nuevo tubo al que se le adicionó 1 ml de etanol al 96% a -20°C y se mantuvo por una hora a -20°C; posteriormente se retiró y se centrifugó durante 15 minutos a 12000 rpm, quedando el ADN adherido a la pared del tubo; con cuidado se descartó todo el etanol y se dejó secar el eppendorff® con el precipitado a temperatura ambiente por 2 horas y para el almacenamiento se resuspendió en 100 µl de buffer T.E. (Tris HCl 10 mM pH 7,5 y EDTA-Na 1mM), y se almacenó a una temperatura de -20°C.

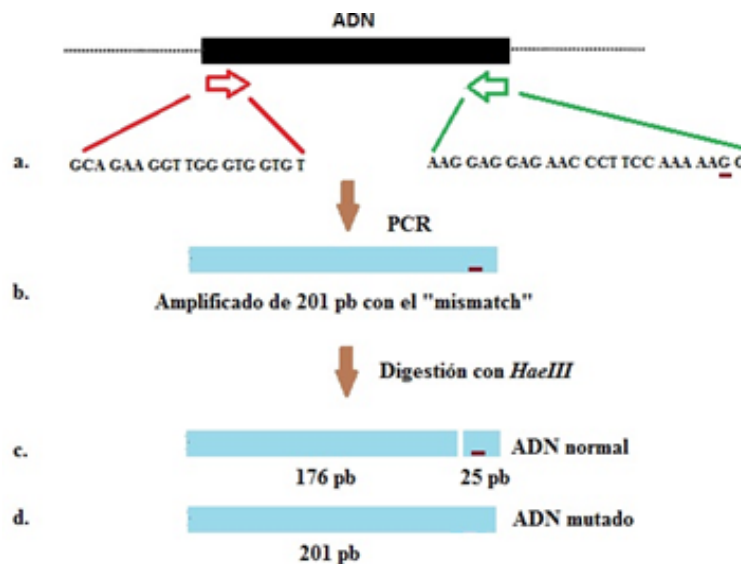
4.9.2 Cuantificación del ADN. Después de extraído el ADN por el método de fenol-cloroformo se cuantificó en un espectrofotómetro *Genesis 10 Spectronic®* mediante el siguiente procedimiento: las muestras se incubaron a 56°C por 20 minutos y se prepararon tubos *eppendorf®* de 1,5 ml marcados con el código correspondiente de la muestra, se les adicionó a éstos 990 µl de agua destilada y 10 µl del ADN previamente mezclado en vortex (1/100), se calibró el espectrofotómetro el cero de absorbancia con agua destilada, a continuación se pasó el volumen de cada muestra diluida a una cubeta de cuarzo y se introdujo en el espectrofotómetro para la cuantificación, se leyó el valor de la absorbancia a 260 nm. Para el cálculo de la concentración se empleó 5 como factor de dilución y aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de ADN en } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{Absorbancia a } 260 \text{ nm} \times 5$$

4.9.3 Determinación de los polimorfismos del gen GRK4. La secuencia genómica del gen GRK4, fue obtenida de la base de datos NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Los polimorfismos se verificaron en la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp>). Los primers empleados en el presente proyecto fueron desarrollados por Wang y cols, 2006, se sintetizaron en Integrated DNA Technologies (IDT), el primer 5'-/TTGCTTCTTATCCCTTTGC-3'(F), se marco con el fluorocromo 6FAM. (Anexo B. Tabla 1). Para detectar los polimorfismos 679C>T y 1711C>T, se utilizó la técnica de PCR mismatch que consiste en cambiar una base en uno de los primers 5'-AAGGAGGAGAACCCTTCCAAAAGG-3'(R) y 5'-GGTGTCCAGGTAGATCCCTTTCAGC-3'(R), respectivamente; de modo de que se genera un fragmento que difiere en una base respecto del ADN templado. Como consecuencia de lo anterior, el producto de PCR del alelo ancestral adquiere un sitio de restricción que no está presente en el alelo mutado (Figura 5)

Figura 5. Esquema de la técnica de PCR-mismatch aplicada a un segmento genómico que incluye el polimorfismo 679C>T.



En el punto (a) primers empleados, (_) indica el sitio en que se cambió una base nitrogenada; (b) tamaño del amplificado; (c) fragmentos obtenidos al digerir una muestra normal con la enzima de restricción *HaeIII*; (d) fragmento obtenido sin digerir con *HaeIII*, muestra con la mutación 679C>T.

4.9.4 Amplificación del ADN genómico. Para la amplificación del ADN genómico se empleó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), técnica de biología molecular desarrollada por Kary Mullis en 1986, la cual permite obtener de un fragmento de ADN un gran número de copias, partiendo de un mínimo (74). Las condiciones de la PCR y el protocolo de amplificación de cada uno de los tres polimorfismos se encuentran en el Anexo C. Tabla 2.

La PCR se realizó en un termociclador 2720 *Applied Biosystems*[®], empleando el protocolo de amplificación desarrollado por Wang y cols, 2006. (Anexo D Tabla 3)

El tamaño de los fragmentos amplificados fue de 485pb, 201pb y 185pb para cada uno de los polimorfismos 448G>T, 679C-T y 1711C-T, respectivamente. En cada una de las amplificaciones se utilizaron controles positivos y negativos (muestra secuenciadas después de estandarizar la PCR) para evaluar la calidad de la PCR.

4.9.5 Secuenciación. Después de realizada la estandarización de la PCR, se seleccionaron seis muestras de cada polimorfismo para ser secuenciadas con el kit big dye terminator (*Applied Biosystems*[®]) y las secuencias obtenidas de la amplificación se alinearon con el software Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) para confirmar la correspondencia con los fragmentos esperados. (Anexo G).

4.9.6 Digestión con enzimas de restricción y electroforesis La asignación de los alelos de cada polimorfismo R65L, A142V y A486V del gen GRK4 se realizó utilizando la metodología PCR-RFLP. Este método tiene como fundamento el reconocimiento en el producto amplificado de un sitio de corte específico por una enzima de restricción (ER), el cual si está presente o no genera fragmentos de diferentes tamaños que determinan las variantes alélicas y que posteriormente se

visualizan mediante electroforesis. Las enzimas de restricción (ER) reconocen secuencias nucleotídicas específicas dentro de la molécula de ADN y estas secuencias son de tipo palindrómico (75).

En cada uno de los tres polimorfismos se empleo una de enzima de restricción diferente y que se enumeran a continuación: En el polimorfismo 448G>T (R65L) se empleó la enzima *AatII* tomada de la bacteria ***Acetobacter aceti*** catalogo # R6545, en el polimorfismo 679C>T (A142V) se empleó la enzima *HaeIII* tomada de la bacteria ***Haemophilus aegyptius*** catalogo #R6171 ambas producidas por *Promega*® y para el polimorfismo 1711C>T(A486V) se utilizó la enzima *HhaI* tomada de la bacteria ***Haemophilus haemolyticus*** catalogo # R0139S, producida por *New England's Biolabs*®, los sitios de corte de las ER se verificaron empleando el software en línea (<http://www.restrictionmapper.org/>) y las condiciones de montaje con la ER para cada uno de los tres polimorfismos se encuentran en el anexo E. Tabla 4.

Para el Polimorfismo 448G>T (R65L), los productos de amplificación obtenidos fueron de 485pb, estos amplificados fueron sometidos a digestión y después corridos en electroforesis para visualizar las bandas y efectuar la tipificación de los individuos de acuerdo con lo observado; si la enzima no cortaba el tamaño de la banda no digerida era de 485pb correspondiente al genotipo homocigoto (TT) si la enzima de restricción (ER) encontraba su sitio de restricción cortaba el amplificado y se obtenían dos fragmentos de 410pb y 75pb, de estos solo se visualizó el de 410pb correspondiente al genotipo homocigoto (GG); y la presencia simultánea de las bandas de 485pb y 410pb evidenció el genotipo heterocigoto (GT).

Respecto al segundo polimorfismo 679C>T (A142V), los productos de amplificación obtenidos fueron de 201pb, estos amplificados fueron sometidos a digestión y después corridos en electroforesis para visualizar las bandas y efectuar

la tipificación de los individuos de acuerdo con lo observado; si la enzima no cortaba el tamaño de la banda no digerida era de 201pb correspondiente al genotipo homocigoto (TT) si la enzima de restricción (ER) encontraba su sitio de restricción cortaba el amplificado y se obtenían dos fragmentos de 176pb y 25pb, de estos solo se visualizó el de 176pb correspondiente al genotipo homocigoto (CC); y la presencia simultánea de las bandas de 201pb y 176pb evidenció el genotipo heterocigoto (CT).

En el tercer polimorfismo estudiado el 1711C>T (A486V), los productos de amplificación obtenidos fueron de 185pb, estos amplificados fueron sometidos a digestión y después corridos en electroforesis para visualizar las bandas y efectuar la tipificación de los individuos de acuerdo con lo observado; si la enzima no cortaba el tamaño de la banda no digerida era de 185pb correspondiente al genotipo homocigoto (TT) si la enzima de restricción (ER) encontraba su sitio de restricción cortaba el amplificado y se obtenían dos fragmentos de 185pb y 24pb, de estos solo se visualizó el de 185pb correspondiente al genotipo homocigoto (CC); y la presencia simultánea de las bandas de 185pb y 161pb evidenció el genotipo heterocigoto (CT).

La visualización de las bandas se realizó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 3% a la que se le adicionó 0,4 µl de bromuro de etidio; éste último se intercala entre las cadenas de ADN, posteriormente los geles se corrieron en una cámara de electroforesis Power Pac 300 (BioRad®) en buffer TBE 1X y se aplicó una tensión de 60 voltios por 80 minutos; al finalizar la corrida los geles se observaron en un equipo transiluminador (Fotodyne) que emite rayos UV. Los genotipos que se identificaron en los casos y en los controles para los tres polimorfismos analizados se encuentran codificados. (Anexo F. Tabla 5)

Para determinar el tamaño de los fragmentos obtenidos en las electroforesis de las muestras analizadas, se empleó un marcador de peso molecular de 50 a 500 pb con fragmentos de 50 en 50pb de *promega*® catalogo # G4521. Después de cada corrida electroforética se fotografió el gel con una cámara Sony®, y, posteriormente se realizó la identificación de la corrida y la codificación de cada una de las muestras con el software Picassa 3.6®.

4.9.7 Electroforesis capilar del polimorfismo 448G>T, R65L. Al 50% de las muestras del polimorfismo 448G>T (R65L), se les realizó electroforesis capilar en el equipo ABI PRISM 310 de *Applied Biosystems Genetic Analyzer*®, este es un método de detección automatizado de ADN que permite realizar la asignación de alelos mediante el empleo de primers marcados con un fluorocromo.

En el presente proyecto se empleó el primer 5'/TTGCTTCTTATCCCTTTGC-3' (F), marcado con el fluorocromo 6FAM. Para el montaje de la PCR se empleó el protocolo del numeral 5.9.4 y únicamente se reemplazó el primer F por el marcado, posteriormente al amplificado se le realizó el protocolo de digestión con la ER *AatII* expuesto en el numeral 5.9.6, por último se realizó el montaje de la electroforesis capilar empleando 1,3 µl de formamida (*Applied Biosystems*®), 0,2 µl de marcador interno *Gene Scan*TM Liz® 500 *size standard* y 0,6 µl del amplificado digerido. Las condiciones de corrida del equipo ABI PRISM 310 fueron: *run voltaje*: 15 kv, *temperatura*: 60°C, *injection duration*:7 seg, *laser power*: 9 mWatts, *size standart*: liz 500, *matrix* POP-4 (*Applied Biosystems*®) y un tiempo de corrida de 30 minutos.

Para la asignación de los genotipos del polimorfismo 448G>T (R65L) en la electroforesis capilar se realizó la lectura de los electroferogramas, se observaron los picos de fluorescencia después de cada corrida para hacer el análisis de la restricción. Si la enzima no cortaba el fragmento el pico de fluorescencia era a

485pb y correspondía al genotipo homocigoto TT, si la enzima restricción cortaba el amplificado, se producía un pico de fluorescencia a 75pb debido a que por esta metodología se detectaba el fragmento más pequeño que tenía unido el primer marcado; este fragmento correspondía al genotipo homocigoto GG y las muestras que exhibieron ambos picos de fluorescencia se clasificaron como heterocigotos GT, en cada una de las corridas electroforéticas se emplearon controles positivos, negativos y el marcador de peso molecular Liz 500 para la asignación del tamaño de los alelos.

4.10 PROCESAMIENTO DE LOS DATOS

Con las lecturas de las electroforesis se estableció el genotipo respectivo de cada una de las muestras y se construyeron dos bases de datos en Excel® Microsoft 2007; los datos obtenidos se validaron con la aplicación Data Compare del Software Epi Info versión 3.5 (76).

4.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.11.1 Cálculo de frecuencias genotípicas. Empleando el software de análisis genético poblacional GenAlex V6 (77), se realizó el cálculo de las frecuencias genotípicas y alélicas las cuales fueron comparadas mediante la prueba de χ^2 , con el fin de establecer diferencias significativas entre los casos y los controles en los tres polimorfismos.

4.11.2 Cálculo de frecuencias alélicas. Usando el software Arlequin 3.5 (78), fueron calculadas las frecuencias alélicas de los tres polimorfismos, las cuales fueron confrontadas mediante la prueba de χ^2 , con el fin de establecer

diferencias significativas entre los tres polimorfismos. El cálculo de las frecuencias genotípicas y alélicas fue realizado para resolver el primer objetivo de este proyecto.

4.11.3 Test de equilibrio “Hardy Weinberg” (EH-W). A partir de las frecuencias alélicas y genotípicas de los tres polimorfismos del gen de la quinasa 4 (GRK4), y utilizando los software Arlequín 3.5 (78), fue determinado el equilibrio de “Hardy-Weinberg”, este se cálculo realizó empleando la prueba de χ^2 ($p \leq 0,05$), a través de la comparación de las frecuencias alélicas observadas y las esperadas.

4.11.4 Coeficiente de Endogamia o Estadístico F_{st} . La evaluación de la estructura genética poblacional a partir de datos genotípicos de los polimórficos se realizó con el software Arlequín 3.5 (78), el cual permitió establecer el estimador F_{st} , que fue propuesto por Sewall Wright en 1951. Cuando existe subdivisión en la población, puede ser un efecto producido por la endogamia, haciendo referencia al exceso de homocigosidad y es medido por la disminución en la proporción de genotipos heterocigotos (79). En las tabla 5 se observa la interpretación de resultados.

La población bajo estudio se puede clasificar con estos valores y de acuerdo al F_{st} obtenido se puede conocer el grado de estructura presente, para que los resultados de un estudio de asociación sean altamente confiables es recomendable obtener valores menores o iguales a 0.005; con valores de F_{st} mayores o iguales a 0.25 se presenta muy alta diferenciación en la población y es probable que se obtengan falsas asociaciones (80).

Tabla 5. Interpretación de los valores para F_{st}

VALOR DE F_{st}	CANTIDAD DE ESTRUCTURA	INTERPRETACIÓN
1	Máxima	Se presenta la máxima estructura o diferenciación de la población y fijación de alelos
de 0 a 0.25	Muy alta	Se presenta muy alta diferenciación
de 0 a 0.15	Moderada	Se presenta moderada diferenciación
de 0 a 0.005	Poca	Se presenta poca diferenciación de la población

Fuente: Reich D, Goldstein D, Detecting association in a case-control study while correcting for population stratification. Genetic epidemiology 2000; 20: 4-16

En la tabla se puede observar los diferentes grados de sub-estructuración de una población de acuerdo a los valores de F_{ST}

4.11.5 Cálculo de las frecuencias haplotípicas. Usando el software Arlequín 3.5 (78), fueron calculadas las frecuencias de los haplotipos en los casos y controles, y posteriormente fueron comparadas mediante la prueba de χ^2 , con el fin de establecer si existían o no diferencias significativas entre los grupos. Este cálculo fue realizado para resolver el segundo objetivo de este proyecto.

4.11.6 Cálculo del estudio de asociación. Para realizar esta parte del estudio fue necesario observar las variables del estudio y su comportamiento dentro de los casos y controles. En el grupo de variables continuas como la edad, la PAS y PAD, se calcularon los promedios y las desviaciones estándar; para las variables nominales como el sexo, antecedentes personales y familiares de enfermedad crónica y factores de riesgo, se describieron utilizando las proporciones con sus respectivos intervalos de confianza del 95%, y el análisis de las frecuencias

genotípicas y alélicas de los diferentes polimorfismos del gen de la quinasa 4 (GRK4), en las que se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg (EH-W) en la población analizada.

Inicialmente se efectuó el análisis estadístico descriptivo para variables continuas y el cálculo de las frecuencias de cada una de las variables nominales, posteriormente se realizó el análisis bivariado donde se compararon las medias utilizando la prueba de χ^2 de Pearson, con sus respectivos valores de p , siendo significativos los valores de $p \leq 0.05$, así como los intervalos de confianza del estadístico, esta prueba compara las variables de manera individual mirando solo su estado de presencia o ausencia en el sujeto caso o en el control.

Para conocer el comportamiento de cada variable independiente en este diseño de casos y controles pareado por sexo y edad, y su efecto en el valor del estimado de la variable de salida, definida como hipertensión arterial esencial, se aplicó el análisis de regresión logística que definieron los valores de RRE con su intervalo de confianza (IC) y el valor de significancia (p) respectivo; también se hicieron los cálculos para las razones relativas de exposición con sus respectivos IC y valor de p en un modelo ajustado por sexo y edad. Para el análisis multivariado se utilizó la regresión logística condicional que calcula el logaritmo de la proporción de la prevalencia del evento ($\text{logit } p = p / (1-p)$), que corresponde a un valor de RRE, basándose en el análisis de las parejas discordantes (s/t), de la tabla de contingencia de dos por dos para casos y controles apareados. Este cálculo fue realizado para resolver el tercer objetivo de este proyecto.

4.11.7 Análisis bivariado para los polimorfismos del gen de la quinasa 4 (GRK4). Para la construcción del modelo se incluyeron las variables que presentaban un valor de probabilidad para la prueba de χ^2 de los RRE de Mantel

y Haenszel menor o igual a 0.2 ($p \leq 0.2$) (81) y para evaluar si existían interacciones entre la exposición principal los polimorfismos del gen de la quinasa 4 y su efecto sobre la variable dependiente la HAE, fue necesario ajustar los análisis por posibles variables de confusión, y se emplearon modelos de regresión logística por su versatilidad, mediante el empleo del software stata(9). En el presente proyecto el modelo logístico se define por la ecuación:

$$\log[p/(1-p)] = \alpha + \beta G + \gamma Z$$

Donde, p es a la probabilidad de ser caso, G al polimorfismo (que codificará los diferentes genotipos: TT, TC, CC) y Z a una o más variables por las que se desea ajustar el modelo, α , β y γ son ~~los~~ ^{los} parámetros estimados (82). De acuerdo a lo anterior en los polimorfismos 448G>T, 679C>T y 1711C>T la variante del alelo T modifica el riesgo de desarrollar hipertensión debido a que cada individuo posee una pareja de alelos y el riesgo asociado con cada genotipo puede depender del número de copias del alelo T, lo anterior permite definir varios modelos de herencia posibles: codominante, dominante y recesivo.

4.11.7.1 Modelo codominante. Por ejemplo para el polimorfismo 679C>T, se supone que cada genotipo proporciona un riesgo de enfermedad diferente y no aditivo, se compara al alelo de riesgo T contra los otros dos grupos formados por el alelo de no riesgo CC y el genotipo heterocigoto que lleva los dos alelos CT.

4.11.7.2 Modelo dominante. Por ejemplo para el polimorfismo 679C>T, se supone que una única copia de T es suficiente para modificar el riesgo de desarrollar HAE y que ser portador de 2 copias lo modifica en igual magnitud; es decir, heterocigotos CT y homocigotos TT tienen el mismo riesgo, por lo cual, se puede comparar la combinación de estos 2 genotipos respecto a los homocigotos del alelo de no riesgo CC.

4.11.7.3 Modelo recesivo: Por ejemplo para el polimorfismo 679C>T, se supone que son necesarias 2 copias de T para modificar el riesgo para desarrollar HAE; por tanto, heterocigotos CT y homocigotos del alelo CC tienen el mismo riesgo, por lo cual se compara la combinación de ellos respecto a los homocigotos del alelo riesgo TT.

4.12 ASPECTOS ÉTICOS

La presente investigación y sus proyectos precedentes INEFAC (2005) y CARMEN (2001), fueron de "riesgo mínimo", según el numeral b del artículo 10 de la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud y contaron con la aprobación del Comité de Ética para la Investigación Científica (CEIC) de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander:

1. "Polimorfismos del gen de la quinasa 4 del receptor dopaminérgico Acoplado a la Proteína G y Riesgo de Hipertensión Esencial", aprobado según acta No 015 de 2007 (Anexo A).
2. "Incidencia de Enfermedades Cardiovasculares y de sus Factores de Riesgo en la Población de 20 a 70 años de estratos socioeconómicos 2 y 3 de Bucaramanga – INEFAC desarrollada por el Centro de Investigaciones Epidemiológicas de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander, aprobado el día 27 de junio 2005 (Anexo A)
3. "Prevalencia de Factores de Riesgo para Enfermedades Crónicas No Transmisibles en la Población de Bucaramanga. Encuesta basal CARMEN", desarrollada por el Centro de Investigaciones Epidemiológicas de la Facultad

de Salud e la Universidad Industrial de Santander, aprobada el día 21 de septiembre de 2001 (Anexo A).

Las graficas usadas en el presente estudio son del artículo publicado por *THE AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY* y tienen permiso para su uso aprobado por el editor Penny Ripka en Septiembre 22 de 2010 (40). 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814-3991.

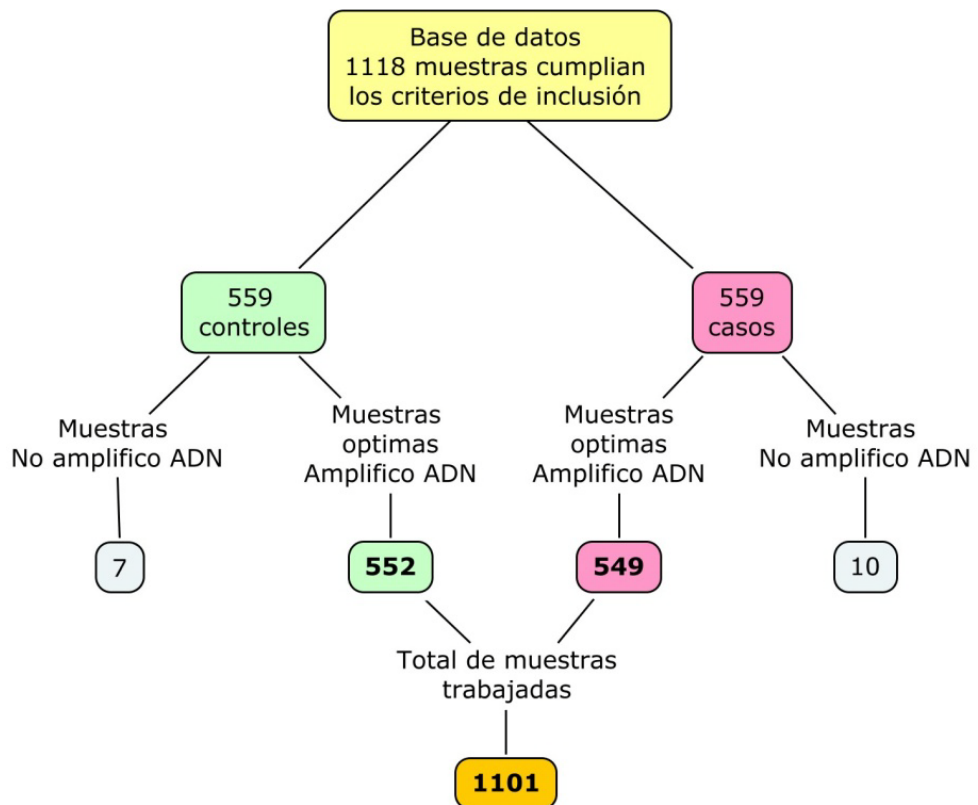
Los programas Arlequín V3.5 (78) y GenAlex V6 (77), tienen licencia de uso libre y el software Stata(9) esta licenciado por el grupo de Genética Humana de la Universidad Industrial de Santander.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN

Se obtuvieron perfiles para los polimorfismos del gen de la quinasa 4 (GRK4), de 1101 individuos, distribuidos en 549 casos y 552 controles. No fue posible realizar la tipificación de 17 muestras, probablemente porque el ADN estaba muy degradado, dadas las condiciones y el tiempo de almacenamiento. (Figura 6)

Figura 6. Total de muestras amplificadas



La población analizada estaba conformada por 667 mujeres y 434 hombres con edades entre los 15 a 69 años, con un promedio de 36.85 años (± 12.35), apareados por Índice de Masa Corporal (IMC), por edad y por sexo. El análisis de las características de la población se describe en la Tabla 6.

Tabla 6. Descripción de las características socio-demográficas de la población en estudio

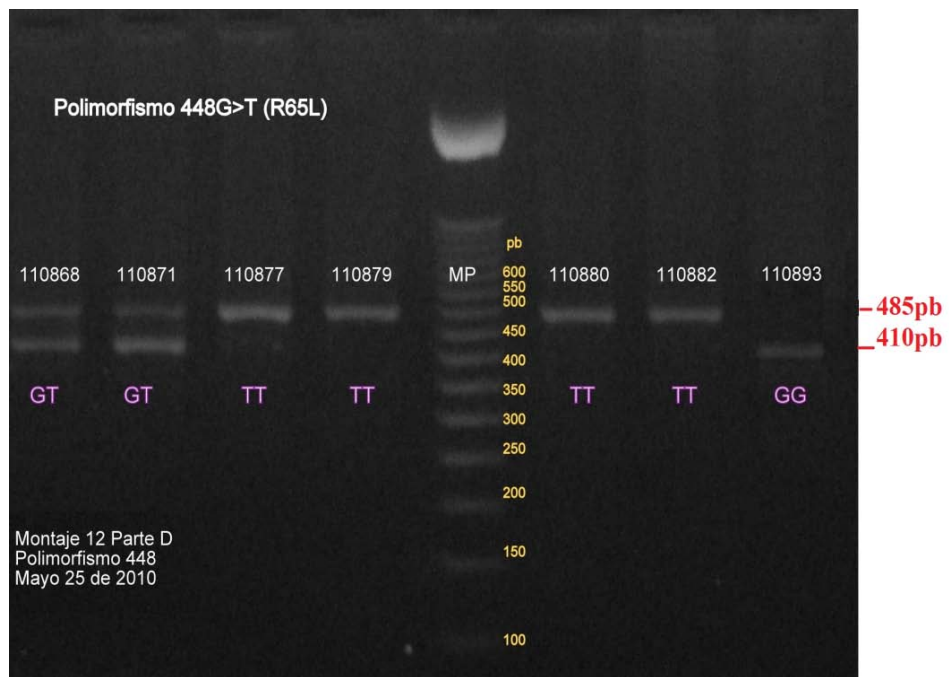
	CASOS	CONTROLES	n
SEXO			
Femenino	295 (53.7%)*	372 (67.3%)	667 (60%)
Masculino	254 (46.3%)	180 (32,7%)	434 (40%)
Total	549 (49.8%)	552 (50.2%)	1101

* Porcentaje de individuos en el grupo.

5.2 RESULTADOS DE LA TIPIFICACIÓN

Los polimorfismos fueron procesados mediante PCR-RFLP y las bandas resultantes de las electroforesis en gel de agarosa al 3% permitieron realizar la asignación alélica en cada una de las muestras para cada uno de los polimorfismos. Para el polimorfismo 448G>T (R65L), los productos obtenidos fueron una banda a 485pb corresponde al genotipo TT, una banda a 410pb corresponde al genotipo GG y cuando se presentaban bandas a 485 y 410 correspondían al genotipo heterocigoto GT. Los resultados pueden observarse en la figura 7.

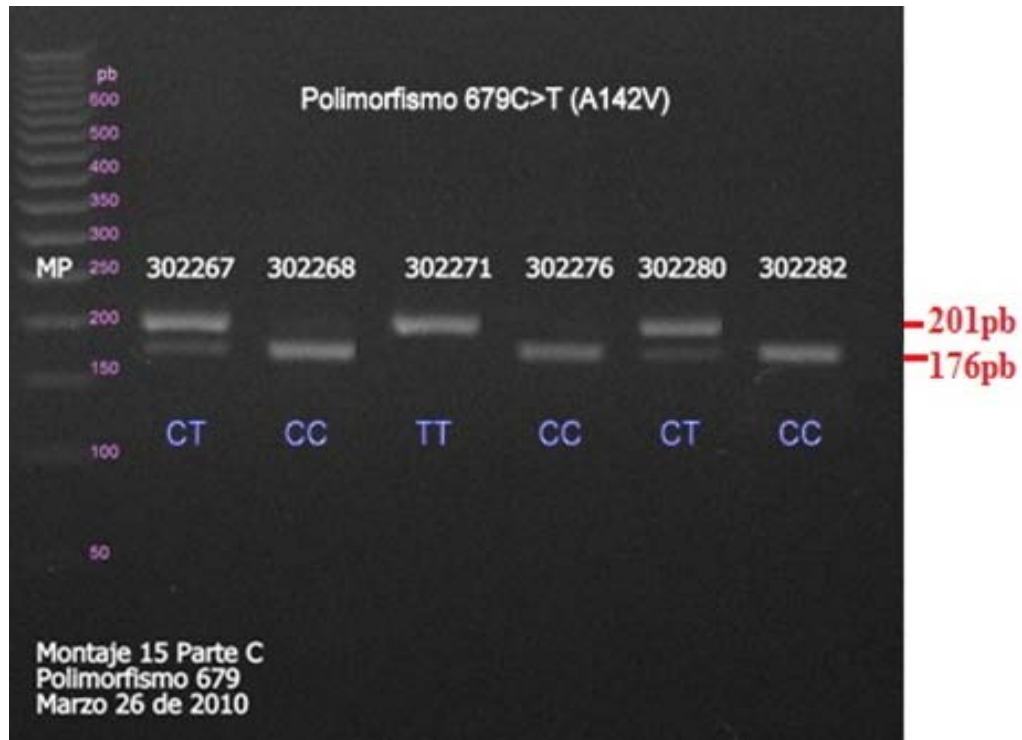
Figura 7. Electroforesis convencional del polimorfismo 448G>T (R65L).



Banda a 485pb corresponde al alelo T. Banda a 410pb corresponde al alelo G. MP: Marcador de peso molecular. (TT) Genotipo homocigoto. (GG) Genotipo homocigoto. (GT) Genotipo heterocigoto.

Para el polimorfismo 679C>T (A142V), los productos obtenidos fueron una banda a 201pb corresponde al genotipo TT, una banda a 176pb corresponde al genotipo CC y cuando se presentaban bandas a 201 y 176 correspondían al genotipo heterocigoto CT. Los resultados pueden observarse en la figura 8.

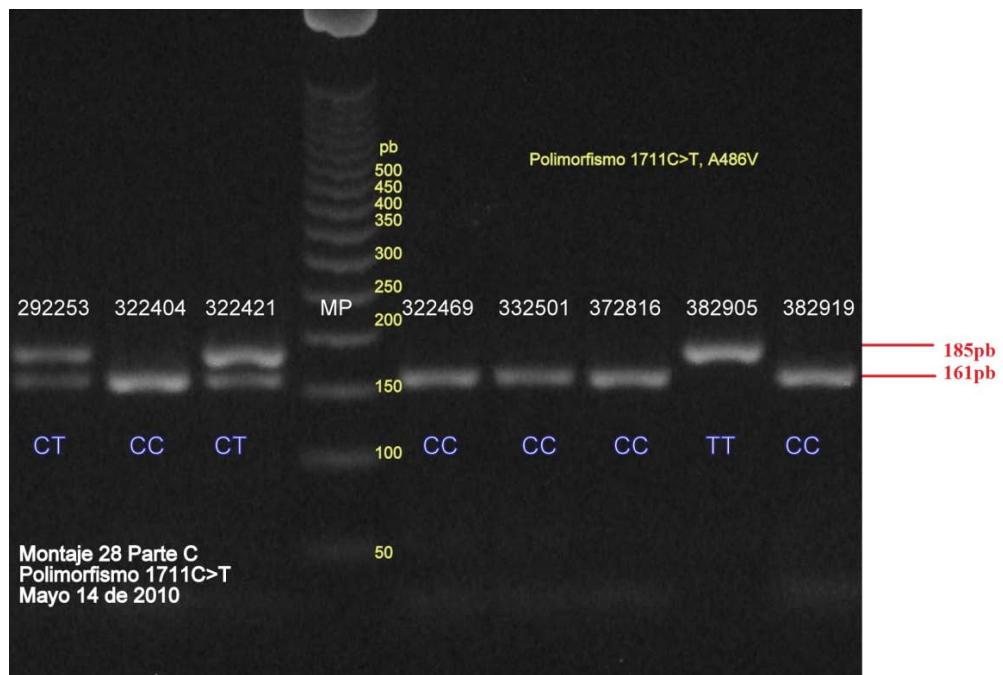
Figura 8. Electroforesis convencional del polimorfismo 679C>T (A142V).



Banda a 201pb corresponde al alelo T. Banda a 176pb corresponde al alelo G. MP: Marcador de peso molecular. (TT) Genotipo homocigoto. (CC) Genotipo homocigoto. (CT) Genotipo heterocigoto.

Para el polimorfismo 1711C>T (A486V), los productos obtenidos fueron una banda a 185 pb corresponde al genotipo TT, una banda a 161pb corresponde al genotipo CC y cuando se presentaban bandas a 185 y 161 correspondían al genotipo heterocigoto CT. Los resultados pueden observarse en la figura 9.

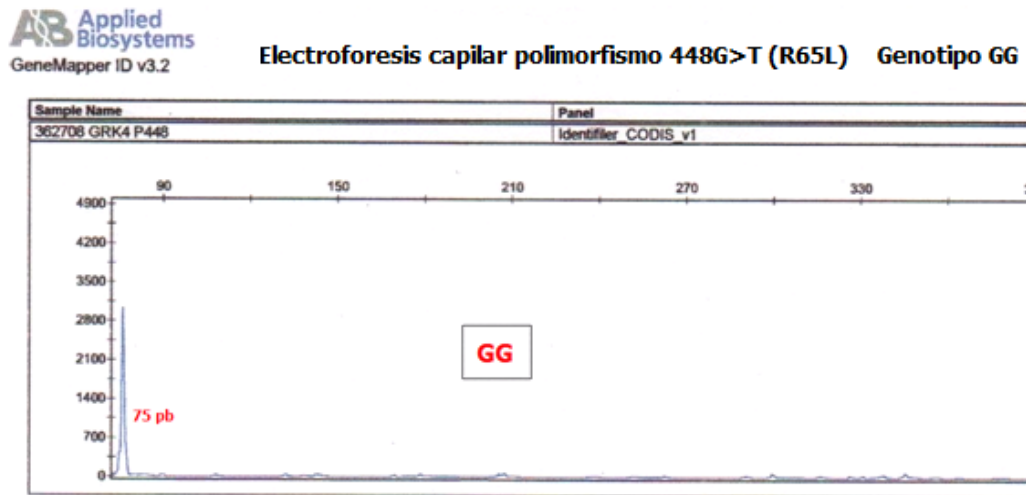
Figura 9. Electroforesis convencional del polimorfismo 1711C>T (A486V).



Banda a 185pb corresponde al alelo T. Banda a 161pb corresponde al alelo G. MP: Marcador de peso molecular. (TT) Genotipo homocigoto. (CC) Genotipo homocigoto. (CT) Genotipo heterocigoto

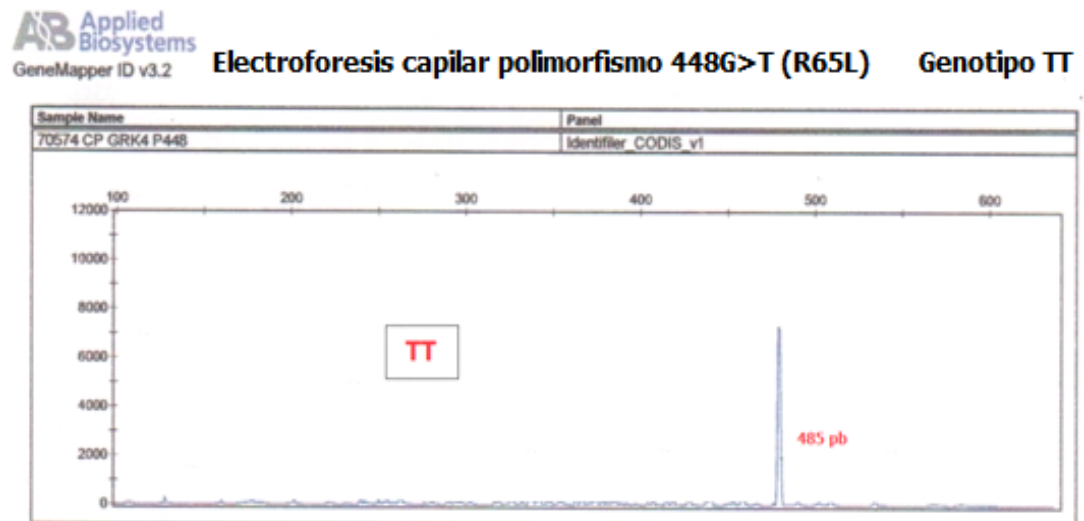
5.2.4 Electroforesis capilar del polimorfismo 448G>T, R65L. Los resultados obtenidos en la electroforesis capilar pueden observarse en las figuras 10, 11, 12 y 13.

Figura 10. Electroforesis capilar del polimorfismo 448G>T (R65L) Genotipo GG



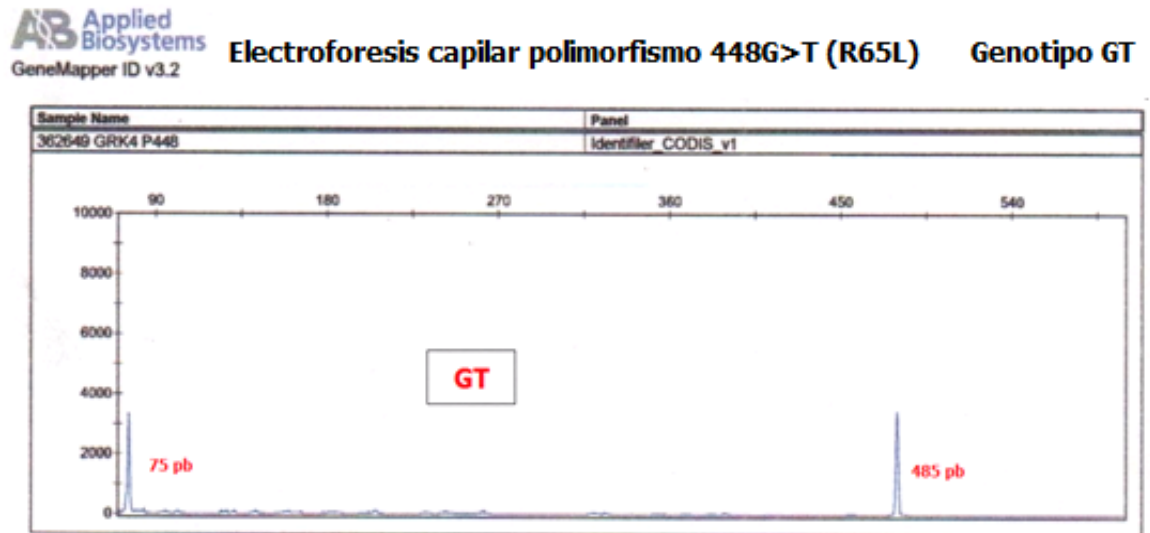
El pico de fluorescencia a 75pb corresponde al genotipo GG.

Figura 11. Electroforesis capilar del polimorfismo 448G>T (R65L). Genotipo TT



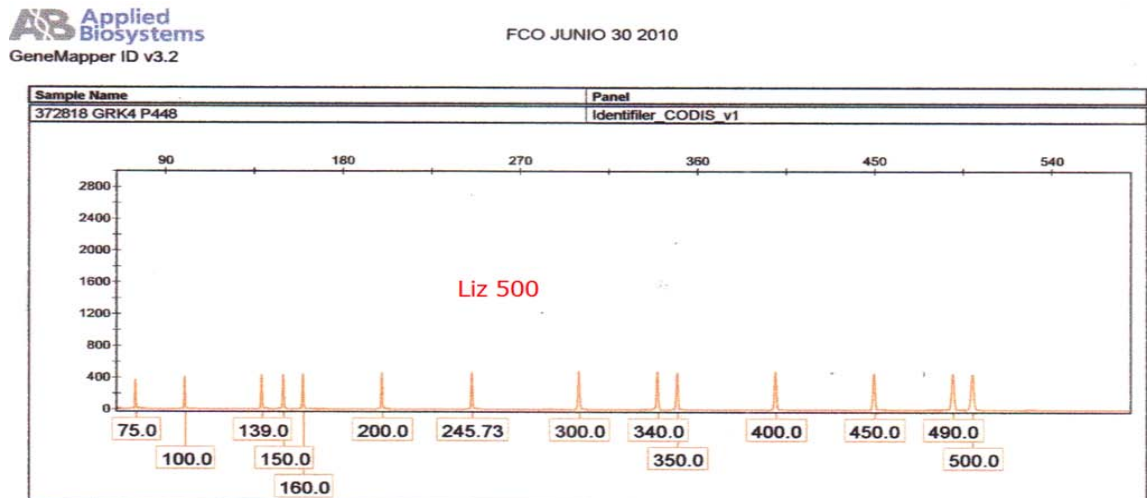
El pico de fluorescencia a 485pb corresponde al genotipo T T.

Figura 12. Electroforesis capilar del polimorfismo 448G>T (R65L). Genotipo GT



Muestras con picos de fluorescencia a 75pb y a 485pb correspondieron al genotipo heterocigoto GT.

Figura 13. Liz 500 Marcador de peso molecular en la electroforesis capilar



5.3 ANALISIS POBLACIONAL

5.3.1 Frecuencias genotípicas. Una vez se determinó el perfil de cada muestra para los polimorfismos 448G>T (R65L), 679C>T (A142V) y 1711C>T (A486V) del gen de la quinasa 4; se estimó la frecuencia de cada genotipo en la población con el software GenAlex6®. En el polimorfismo 448G>T el genotipo homocigoto GG fue el menos frecuente en los casos (24%) y en los controles (25%) y el genotipo heterocigoto GT fue el más frecuente tanto en casos (46%) como en controles (47%). En el polimorfismo 679C>T el genotipo homocigoto TT fue el menos frecuente en los casos (8%) y en los controles (10%) y el genotipo homocigoto CC fue el más frecuente tanto en casos (46%) como en controles (47%). Para el polimorfismo 1711C>T el genotipo homocigoto TT fue el menos frecuente en los ambos grupos con una frecuencia del 8%, mientras que el genotipo homocigoto CC fue el más frecuente tanto en casos (52%) como en controles (47%). Mediante una prueba de Chi^2 se compararon las frecuencias genotípicas de los polimorfismos de ambos grupos y no se hallaron diferencias significativas (Tabla 7).

Tabla 7. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos del gen de la quinasa 4 (GRK4).

POLIMORFISMO		FRECUENCIAS GENÓTIPICAS						χ^2 *	p **
448G>T (R65L)	n	GG		GT		TT			
Casos	549	133	(0,242)	254	(0,463)	162	(0,295)	0,996	0,608
Controles	552	140	(0,254)	264	(0,478)	148	(0,268)		
679C>T (A142V)	n	CC		CT		TT			
Casos	549	282	(0,514)	222	(0,404)	45	(0,082)	1,279	0,528
Controles	552	280	(0,507)	216	(0,391)	56	(0,101)		
1711C>T (A486V)	n	CC		CT		TT			
Casos	549	287	(0,523)	215	(0,392)	47	(0,086)	3,419	0,181
Controles	552	260	(0,471)	246	(0,446)	46	(0,083)		

* Prueba de χ^2 . ** Valor de $p \leq 0,05$

5.3.2 Frecuencias alélicas. Las frecuencias alélicas se calcularon a partir de las frecuencias genotípicas de los 3 polimorfismos estudiados. El cálculo de las frecuencias alélicas se obtuvo al sumar el número de individuos heterocigotos con el doble de los individuos homocigotos para cada alelo, y se dividió por el total de los individuos multiplicado por 2 (ya que cada individuo lleva dos alelos); para calcular la frecuencia del otro alelo (q) se restó de 1, es decir, $q=1-p$ (83). En el polimorfismo 448G>T se observó que el alelo G (47%) fue el de menor frecuencia y para los polimorfismo 679C>T y 1711C>T, el alelo T (28%) presentó la menor frecuencia en la población (Tabla 8). Se realizó una prueba de χ^2 para comparar

las frecuencias alélicas de cada polimorfismo entre los grupos (casos y controles) y no se encontraron diferencias significativas.

Tabla 8. Frecuencias alélicas de los polimorfismos del gen de la quinasa 4 (GRK4)

POLIMORFISMO		FRECUENCIAS ALÉLICAS			χ^2 *	p **	
448G>T (R65L)	n	G		T			
Casos	549	520	(0,47)	578	(0,53)	0,81	0,368
Controles	552	544	(0,49)	560	(0,51)		
679C>T (A142V)	n	C		T			
Casos	549	786	(0,72)	312	(0,28)	0,45	0,503
Controles	552	776	(0,70)	328	(0,30)		
1711C>T (A486V)	n	C		T			
Casos	549	789	(0,72)	309	(0,28)	1,62	0,202
Controles	552	766	(0,69)	338	(0,31)		

* Prueba de χ^2 . ** Valor de $p \leq 0,05$.

5.3.3 Test de Equilibrio de Hardy-Weinberg (EH-W) Después de calcular las frecuencias genotípicas y las alélicas en los polimorfismos del gen de la quinasa 4 (GRK4), se calculó el Equilibrio de Hardy-Weinberg (EH-W) tanto para los casos como para los controles para cada uno de los polimorfismos y se comprobó mediante la prueba de χ^2 ($p < 0,05$) (84), que todos los grupos analizados se encontraban en equilibrio de H-W. (Tabla 9).

Tabla 9. Equilibrio de Hardy-Weinberg de los polimorfismos del gen de la quinasa 4 (GRK4)

POLIMORFISMO	Genotipo	n=1101	CASOS (549)		p^*	CONTROLES (552)		p^*
			OBSER.	ESPER.		OBSER.	ESPER.	
448G>T (R65L)	GG	273	133	123	0,091	140	134	0,309
	GT	518	254	274		264	276	
	TT	310	162	152		148	142	
679C>T (A142V)	CC	262	282	281	0,888	280	273	0,138
	CT	438	222	223		216	231	
	TT	101	45	44		56	49	
1711C>T (A486V)	CC	547	287	283	0,457	260	266	0,250
	CT	461	215	222		246	235	
	TT	93	47	43		46	52	

Prueba de Chi² valor de $p \leq 0,05$

5.3.4. Estructura poblacional, prueba F_{st} . De acuerdo al análisis molecular de varianza realizado en el programa arlequín v3.5 (78), no hay evidencia de estructura genética (F_{st} -0,00007) en la muestra poblacional de Bucaramanga para los polimorfismos del gen de la quinasa 4; los valores observados están dentro del rango de 0 a 0.005 donde se considera que hay poca diferenciación genética (79) (85).

5.3.5 Análisis de haplotipos. Se combinaron los genotipos obtenidos en cada individuo para los tres polimorfismos estudiados, y se pudo observar que los ocho haplotipos posibles se encontraron en la población, tanto en los casos como

en los controles. El haplotipo de mayor frecuencia fue el GCC tanto en los casos (39%) como en los controles (40%) y el menos frecuente fue el GTT tanto en los casos (0,9%) como en los controles (1%). (Tabla 10). Al comparar las frecuencias haplotípicas entre los casos y los controles solo fue significativa la diferencia en el haplotipo TCC ($p=0.05$), al estar en límite de significancia se aplicó la corrección de Yates (86) para verificar la estabilidad del χ^2 , y se obtuvo un nuevo valor de significancia ($p=0,06$).

Tabla 10. Frecuencia de haplotipos de los polimorfismos del gen de la quinasa 4 (GRK4)

HAPLOTIPO		CASOS	CONTROLES	χ^2 *	P **
GCC	RAA [▫]	0,393	0,407	0,46076	0,50
TCC	LAA	0,226	0,192	3,81370	0,05
TTT	LVV	0,175	0,192	0,46076	0,50
TTC	LVA	0,071	0,066	0,20821	0,65
TCT	LAV	0,055	0,057	0,06115	0,80
GCT	RAV	0,043	0,047	0,00049	0,98
GTC	RVA	0,029	0,029	0,00049	0,98
GTT	RVV	0,009	0,010	0,04273	0,84

* Prueba de χ^2 ** valor de $p \leq 0,05$. ▫ Haplotipo representado por nucleótidos. ◻ Haplotipo representado por aminoácidos.

5.4 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE TENSIÓN ARTERIAL Y LOS POLIMORFISMOS R65L, A142V, A486V DEL GEN DE LA QUINASA 4 (GRK4).

Para estimar la asociación en el presente estudio se cuantificaron las frecuencias de los polimorfismos del gen de la quinasa 4 en los casos y en controles; en segunda instancia se calculó el riesgo relativo de exposición con los antecedentes familiares, personales y factores de riesgo con la enfermedad y finalmente se construyó el modelo de regresión logística.

5.4.1 Antecedentes familiares de enfermedad crónica. La hipertensión arterial tiene un componente genético por lo que en los individuos del estudio se consideraron los antecedentes de familiares, en primer grado de consanguinidad, para patologías como la hipertensión arterial, el infarto agudo del miocardio, enfermedad cerebrovascular, angina de pecho y diabetes (en madre, padre o hermano), estos datos fueron tomados de la base de datos proyecto del proyecto INEFAC (2006) realizado por el Centro de Investigaciones Epidemiológicas (CIE) de la Facultad de Salud UIS (Anexo H. Tabla 6). Posteriormente se compararon los casos y los controles para cada uno de estos antecedentes y se encontraron diferencias significativas entre los casos y los controles cuando se tenía el antecedente hipertensión arterial en la madre ($p=0,0351$), el padre ($p=0,0002$) o un hermano ($p=0,0001$), también cuando se tenían antecedentes de Infarto agudo del miocardio ($p=0,0001$) y de enfermedad cerebro vascular ($p=0,0162$); por el contrario no existieron diferencias significativas respecto a los antecedentes angina de pecho ($p=0,1725$) y diabetes ($0,1888$). (Anexo H. Tabla 6)

5.4.2 Antecedentes personales y factores de riesgo. Se revisaron los factores de riesgo consignados en la base de datos del proyecto INEFAC (2006),

específicamente la obesidad (IMC>30), los triglicéridos, el colesterol total y el colesterol-LDL. Los casos y los controles se compararon para cada uno de estos factores de riesgo y se hallaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en la obesidad ($p=0.0000$), los triglicéridos ($p=0.0000$), el colesterol total ($p=0.0000$) y el colesterol-LDL ($p=0.0000$) y no se hallaron diferencias significativas entre los casos y los controles respecto al colesterol-HDL ($p=1,0000$) y la diabetes ($P=0,1011$) no se observaron diferencias significativas en la población estudiada. (Anexo I. Tabla 7)

5.4.3 Análisis Bivariado. Para cuantificar la magnitud de la asociación de los polimorfismos 448G>T (R65L), 679C>T (A142V) y 1711C>T (A486V) con la HAE, se contrastó la hipótesis de asociación mediante un test de Chi² y se calcularon las odds ratios (OR) de las diferentes variables (antecedentes familiares, personales y los factores de riesgo). Las variables que no mostraron asociación significativa se excluyeron del análisis (en los antecedentes familiares en primer grado de consanguinidad fueron la angina de pecho y la diabetes y en los antecedentes personales fueron la diabetes y el colesterol HDL) (Anexo J. Tabla 8). Las covariables que presentaban un valor de probabilidad para la prueba de chi² de los riesgos relativos esperados (RRE) de Mantel y Haenszel menor o igual a 0.2 ($p \leq 0.2$) se incluyeron en el modelo de regresión logística. (81).

5.4.4 Análisis bivariado para los polimorfismos del gen de la quinasa 4 (GRK4). Para evaluar la asociación de los polimorfismos con la HAE se contrastó la hipótesis de asociación; se hizo un prueba de Chi² y se calcularon los odds ratios (OR) de cada genotipo respecto a HAE para cuantificar la magnitud de la asociación. En el presente estudio ninguno de los polimorfismos del gen de la quinasa 4 (GRK4) se encontró asociado con el riesgo de desarrollar HAE, por lo cual, se decidió trabajar con los distintos modelos de herencia (codominante, dominante y recesivo) y a tampoco se logro establecer asociación entre los

polimorfismos y la HAE. Para la construcción del modelo se incluyeron las variables que presentaban un valor de probabilidad menor o igual a 0.2 (0.2) para la prueba de χ^2 de los RRE de Mantel y Haenszel (81), (Anexo K. Tabla 9)

Finalmente se realizó el análisis multivariado mediante regresión logística y el modelo seleccionado fue: La variable dependiente, desarrollo de la HAE; las confusoras o covariables: antecedente de IAM en un familiar de primer grado de consanguinidad (iamrel) (OR=1.80; $p=0.001$; IC95% 1.29 - 2.52), tener antecedentes personales de historia médica de tensión arterial alta (palta) (OR=2.61; $p=0.000$; IC95% 1.79 - 3.81) e hipercolesterolemia (highcolt) (OR=1.60; $p=0.004$; IC95% 1.16 - 2.22) y se incluyeron los polimorfismos del gen de la quinasa 4 a pesar de no presentar asociación significativa. También se contrastó el modelo multivariado con los diferentes modelos de herencia (Codominante, Dominante y Recesivo) de los polimorfismos y se encontró que no existía asociación significativa entre los polimorfismos y la HAE (Anexo L Tabla 10)

5.4.5 Análisis de los haplotipos y su asociación con HAE. El modelo de asociación anterior se contrastó con los dos modelos de haplotipos generados por el software Arlequín V3.5 (78) y no se encontró asociación con ninguno de ellos (OR=0.99; $p=0.734$; IC95% 0.94 – 1.03).

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Considerando la literatura publicada a la fecha relacionada con la asociación de los polimorfismos 448G>T (R65L), 679C>T (A142V) y 1711C>T (A486V) del gen de la quinasa 4 (GRK4) con HAE, este estudio se convierte en el primero en población latinoamericana y específicamente con muestras de individuos de Bucaramanga, Santander, Colombia.

Respecto al comportamiento de las frecuencias genotípicas en la población estudiada, el polimorfismo 448G>T fue el *más diverso*, con un porcentaje de heterocigotos (GT) del 48% en controles y 46% en los casos, y este polimorfismo fue el más diverso en Ghaneses con un porcentaje del 49% en los controles y 52% en los casos (68), por el contrario la diversidad reportada fue muy diferente en otros estudios donde el polimorfismo 1711C>T fue más diverso en Australianos con un porcentaje de heterocigotos (CT) del 54% en los controles y 58% en los casos (87); en los Italianos con un porcentaje del 43% en los controles y 48% en los casos (60) y en Chinos con un frecuencia del 46% en los controles y 43% en los casos (62).

Por otra parte el genotipo de *mayor frecuencia* en el polimorfismo 448G>T fue GT en la población estudiada con una frecuencia de 48% en los controles y 46% en los casos, similar a lo reportado en la población Australiana con un frecuencia del 53% en los controles y 48% en los casos (87); y en la Ghanesa con una frecuencia de 49% en los controles y 52% en los casos (68), por el contrario el genotipo GG fue el de mayor frecuencia en otras poblaciones como lo reportado en la Italiana con una frecuencia del 47% en los controles y del 40% en los casos (60), y en la China con una frecuencia del 76% en los controles y 80% en los casos (62).

Por otra parte el genotipo de mayor frecuencia en el polimorfismo 679C>T fue CC en la población estudiada con una frecuencia de 51% en los controles y 51% en los casos, similar a lo reportado en la población Italiana con un frecuencia del 47% en los controles y 45% en los casos (60); y en la China con una frecuencia de 63% en los controles y 68% en los casos (62), por el contrario el genotipo CT fue el de mayor frecuencia en otras poblaciones como lo reportado en la Australiana con una frecuencia del 49% en los controles y del 50% en los casos (87), y en la Ghanesa con una frecuencia del 45% en los controles y 50% en los casos (68).

En relación al genotipo de mayor frecuencia para el polimorfismo 1711C>T fue CC en la población estudiada con una frecuencia de 47% en los controles y 52% en los casos, similar a lo reportado en la población Ghanesa pero con una mayor frecuencia del 82% en los controles y 80% en los casos (68), por el contrario el genotipo CT fue el de mayor frecuencia en otras poblaciones como lo reportado en la Italiana con una frecuencia del 43% en los controles y del 48% en los casos (60), en la Australiana con una frecuencia del 54% en los controles y del 58% en los casos (87), y en la China con una frecuencia de 46% en los controles y 43% en los casos (62).

De acuerdo con los valores obtenidos para las frecuencias alélicas en la población de Bucaramanga, en el polimorfismo 448G>T (R65L) alelo T (mutado), presentó una frecuencia del 52%, la frecuencia de este alelo fue similar a la reportada en poblaciones como: la Ghanesa del 51% (68) y Afroamericana de Washington DC del 47% (29); por el contrario, la frecuencia hallada para este alelo fue muy diferente en los estudios realizados en la población Taiwanesa del 7% (29); China del 12% (62); hispana del sur de California (US) del 25% (29); Estadounidense del 35% (29); Italiana del 37% (87); y en Australiana (38%) (60).

Respecto a las frecuencias alélicas en la población de Bucaramanga para el polimorfismo 679C>T (A142V), el alelo T (mutado), presentó una frecuencia del 29% igual a la reportada en población la hispana del sur de California del 29% (29), por el contrario, la frecuencia hallada para este alelo fue muy diferente en los estudios realizados en la población China del 19% (62); Taiwanesa del 20% (29); Italiana del 35% (87); Australiana del 37% (60); Estadounidense del 40% y Afroamericana de Washington DC del 60% (29); y en la población Ghanesa del 66% (68).

En relación a las frecuencias alélicas en la población de Bucaramanga para el polimorfismo 1711C>T (A486V), el alelo T (mutado), presentó una frecuencia del 29% igual a la reportada en población la hispana del sur de California (29%) (29), por el contrario, la frecuencia hallada para este alelo fue muy diferente en los estudios realizados en la población Ghanesa (10%) (68); Afroamericana de Washington DC del 19% y Estadounidense del 40% (29); Italiana del 44% (87); Australiana del 45% (60); Taiwanesa del 47%) (29) y en la población China del 51% (62).

Los polimorfismos 448G>T (R65L), 679C>T (A142V) y 1711C>T (A486V) del gen de la quinasa 4 (GRK4) se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) lo que indica que la población de los casos y de los controles estaba conformada por individuos que se mezclan al azar y que los resultados obtenidos del análisis de asociación de estos polimorfismos con la HAE fuesen confiables, porque si una población no se encuentra en EH-W los casos y los controles no serían comparables porque la población podría estar afectada por fuerzas evolutivas (consanguinidad, selección, migración, mutación, deriva genética) y esto podría generar sesgos al interpretar los resultados, porque sería más fácil detectar un genotipo hipertenso que uno normotenso (82), de igual forma, podría generar pérdida del poder estadístico que se deriva de una menor diferencia en las

frecuencias esperadas (67); estos resultados concuerdan con la mayoría de los trabajos publicados (60) (68) (87) (31) donde se reportaron que las poblaciones estudiadas también estaban en EH-W.

Adicionalmente se realizó un análisis molecular de varianza (78), y no se detectó efecto de estructura genética (F_{ST} : -0,00007), en la muestra poblacional analizada de Bucaramanga y el 96,96% de la variación fue debida a todos los individuos dentro de los grupos, lo cual permite reafirmar que los controles si son comparables con los casos y se comportan como la misma unidad genética reproductiva, coincidiendo con los estudios realizados por Hincapié y cols (2009), donde se encontró una alta variabilidad entre los individuos de la ciudad de Bucaramanga, acorde con el bajo valor de F_{ST} entre distintos grupos y determinado por el análisis molecular de varianza con base en frecuencias alélicas observadas para 19 marcadores autosómicos analizados (Short Tandem Repeat): STRs (D3S1358, HUMTH01, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, HUMvWA, D8S1179, HUMTPOX, FGA, LPL, F13B, FESFPS, F13A01, PENTA D y PENTA E). (88)

Para el estudio de asociación, el modelo metodológico que siguió el presente estudio parearon 1101 individuos entre casos y controles (edad, sexo e IMC). Aspecto importante y considerado en el séptimo reporte para el manejo de la hipertensión (69), donde se relaciona el IMC como un factor de riesgo que incide en el desarrollo de la ECV (69), es importante aclarar que al comparar otros estudios donde los autores encontraron asociación de estos polimorfismos del gen de la quinasa 4 (GRK4) como factores de riesgo para HAE, no explican si la variable IMC está incluida o no en el modelo de asociación; la inclusión del IMC en este estudio, le confirió al modelo de regresión logística una mayor rigurosidad para establecer si los polimorfismos 448G>T (R65L), 679C>T (A142V) y 1711C>T (A486V) del gen de la quinasa 4 (GRK4) eran factores de riesgo independientes

para HAE. Bengra, y col (2002), reportan la asociación pero no establecen en el modelo cuales variables fueron utilizadas, adicionalmente ese estudio empleó un tamaño de muestra pequeño (60 HT y 60 NT), igual que Speirs, y cols (2004), con una muestra de 312 NT y 168HT frente al tamaño de muestra contemplado en el presente estudio (1101 individuos). Dentro de la tabla de caracterización de los participantes del estudio de Speirs y cols (2004); al comparar el IMC ($p=0,02$) fue significativa la diferencia entre los HT y NT, encontrándose asociación significativa con los obesos hipertensos AA ($n=10$), 163 ± 17 mmHg AV ($n=38$), 167 ± 24 mmHg y VV ($n=12$), 194 ± 25 mmHg. Así mismo, en el trabajo de casos y controles desarrollado en asiáticos (62), también fue determinada asociación con el modelo de regresión logística para los loci, donde el IMC con IMC (OR=1.16; $p<0.0001$; IC95% 1.11-1.20), este estudio hace un aporte importante sobre la asociación del polimorfismo A486V y la HAE. Otros estudios con distintos abordajes, donde fueron evaluaron los mismos polimorfismos determinados en la población de Bucaramanga, mostraron asociación significativa de los polimorfismos con el HAE, pero incluyendo en el modelo de regresión la variable IMC (89)

En el presente estudio, no se encontró asociación de ninguno de los tres polimorfismos estudiados con el fenotipo hipertenso (HAE); contrario a los hallazgos en otros estudios donde el polimorfismo 1711C>T (A486V) mostró asociación con la HAE. El trabajo realizado por Bengra y cols en el 2002, halló una asociación significativa ($p=0.034$) del alelo V del polimorfismo A486V, en pacientes Italianos medianamente hipertensos; esta asociación también fue observada en otras poblaciones caucásicas como la de Australianos, en estudio realizado por Speirs y cols en el 2004, donde encontraron que el alelo V del polimorfismo A486V (OR=1,4; IC95% 1,1 - 1,9) mostró asociación significativa con hipertensión (HT) ($p=0,02$) y el genotipo VV se asoció con la presión arterial

sistólica (PAS) elevada ($p < 0,002$); AA ($n=21$), 160 ± 22 mmHg, AV ($n=70$), 171 ± 25 mmHg y VV ($n=22$), 188 ± 26 mmHg. Este mismo genotipo también presentó una asociación significativa en los obesos hipertensos AA ($n=10$), 163 ± 17 mmHg AV ($n=38$), 167 ± 24 mmHg y VV ($n=12$), 194 ± 25 mmHg; contrario a los valores de presión arterial sistólica en los genotipos de individuos normotensos (NT), donde éste presentó los niveles más bajos AA ($n=79$), 122 ± 11 mmHg, AV ($n=134$), 118 ± 10 mmHg, VV ($n=35$), 118 ± 10 mmHg. En relación con los polimorfismos R65L y A142V, para los alelos L65 y V142 fue observada elevación de la presión arterial diastólica (PAD) sólo en varones HT ($p=0,009$, $p=0,002$, respectivamente), después de realizada la corrección de Bonferroni ($p=0,06$).

Estudios similares realizados por Wang y cols 2006, en la población del norte de China Han, encontraron que el alelo A486 mostró una asociación significativa con HTA ($p < 0,001$), después de la corrección de Bonferroni ($p < 0,001$). Los niveles de PAS fueron proporcionales al número de alelos A en el polimorfismo A486V, es decir, individuos homocigotos (AA) presentaron mayor nivel PAS ($p < 0,001$), y una tendencia similar fue observada en los niveles de PAD ($p=0,0013$), al ajustar con otros factores de riesgo como el IMC (OR=1.16; $p < 0,0001$; IC95% 1.11-1.20) y la glicemia (OR=1.12; $p=0,0108$; IC95% 1.03-1.22) los individuos con el genotipo AA tenían tres veces mayor riesgo de ser hipertensos que los portadores VV. Es importante resaltar que el polimorfismo A486V no estaba en equilibrio de Hardy-Weinberg en los 503 individuos hipertensos del estudio, aspecto que puede generar sesgos en los resultados (82) (67). Respecto a los polimorfismos R65L y A142V, no fue hallada ninguna asociación de estas dos variantes con el desarrollo de HAE.

En el presente estudio fueron determinadas las ocho posibles combinaciones respecto al análisis de los haplotipos. En cuanto a las frecuencias de los haplotipos entre casos y controles sólo se encontró diferencias significativas

($p=0.05$) en el haplotipo TCC (LAA); con corrección de Yates ($p=0.06$), contrario a los hallazgos en Australianos (87) donde se encontraron diferencias en las frecuencias para el haplotipo RVV entre los casos y controles. No se observó asociación entre la HAE y los haplotipos (OR=0.99; $p=0.734$; IC95% 0.94 – 1.03), ajustados con los factores de riesgo antecedente de IAM en un familiar de primer grado de consanguinidad (iamrel) (OR=1.79; $p=0.001$; IC95% 1.28 - 2.51), antecedentes personal de historia médica de tensión arterial alta (palta) (OR=2.55; $p=0.000$; IC95% 1.75 - 3.73) e hipercolesterolemia (highcolt) (OR=1.67; $p=0.002$; IC95% 1.20 - 2.32), Respecto a las prevalencias de los haplotipos, el LVA y la RAA presentó mayor frecuencia en el grupo HT ($p=0,001$), y los haplotipos RAV; RVV y LVV se presentaron con mayor frecuencia en el grupo NT ($p<0,001$, $p=0,003$, $p=0,008$, respectivamente). Después de analizar todos los haplotipos por regresión logística; Wang y cols (2006) observaron que haplotipos LVA (OR=5.71; $p=0.0005$; IC95% 1.66 – 19.68), RAA (OR=1.39; $p<0.0001$; IC95% 1.14 – 1.69) y RVV (OR=0.29; $p=0.0276$; IC95% 0.10 – 0.87), estaban significativamente asociados con la hipertensión después de ajustar con otros factores de riesgo como el IMC (OR=1.16; $p<0.0001$; IC95% 1.11 – 1.20) y la glicemia (OR=1.12; $p=0.0081$; IC95% 1.03 – 1.22), en particular, el haplotipo LVA presentó seis veces más riesgo de hipertensión que los que portaban el haplotipo RAV.

En el presente estudio fueron planteados tres modelos de herencia (codominante, dominante y recesivo) y no se encontró asociación significativa con el desarrollo de HAE en ninguno de los tres polimorfismos, ni en el análisis univariado ni en el multivariado, contrario a los hallazgos de Gu y cols en el 2006, donde realizó un estudio de asociación de 33 SNPs en 11 genes candidatos para hipertensión en Chinos; los genes candidatos fueron seleccionados para evaluar su efecto individual y multilocus sobre las diferentes vías bioquímicas que están implicadas en el desarrollo y progreso de la hipertensión, encontrándose que tres

polimorfismos el TH, ADRB2 y GRK4 , estaban asociados con el desarrollo de la hipertensión. Respecto a los polimorfismos del gen de la quinasa 4, sólo el polimorfismo A486V presentó asociación en el análisis univariado con el desarrollo de hipertensión al aplicar los diferentes modelos de herencia: aditivo (OR=1.59; $p < 0.0001$; IC95% 1.34 – 1.89), dominante (OR=1.74; $p < 0.0001$; IC95% 1.32 – 2.30), y recesivo (OR=2.08; $p < 0.0001$; IC95% 1.55 – 2.77), pero al ejecutar el análisis multivariado, sólo el modelo recesivo 486V mostró asociación (OR: 2.05; $p = 5.10 \times 10^{-6}$; IC 95% 1,50 - 2,79) después de la corrección de Bonferroni.

Finalmente, los resultados del estudio de asociación en la muestra poblacional de Bucaramanga de los polimorfismos 448G>T (R65L), 679C>T (A142V) y 1711C>T (A486V) del gen de la quinasa 4 (GRK4), mostraron grandes diferencias con los hallazgos encontrados en poblaciones caucásicas (Italianos, Australianos) y Chinos en los cuales sólo fue determinada la variante A486V asociada significativamente con la HTA, lo anterior puede estar influenciado por los diferentes tamaño de muestra que puede contribuir a los resultados discrepantes entre estos estudios, como en el estudio realizado por Bengra donde fueron incluidos 60 HT y 60 NT (60), en el estudio Speirs 168 HT y 60 NT (Speirs y cols. 2004) y el estudio de Wang incluyó 503 HT y 490 NT (Wang y cols. 2006).

7. ANÁLISIS CRÍTICO DE LOS RESULTADOS

POSIBLES SEGOS DEL ESTUDIO

Sesgo de selección: Las muestras seleccionadas para este estudio fueron tomadas del proyecto INEFAC en el cual se realizó un muestreo aleatorio de la población de Bucaramanga, adicionalmente se evitó este sesgo al tomar todos los casos y los controles de la misma base de datos del proyecto y mediante el uso del software stata 9®

Sesgo de clasificación: Los errores de clasificación fueron controlados, en primer lugar utilizando técnicas estandarizadas en el laboratorio de genética de la Universidad Industrial de Santander el cual posee una trayectoria de mas de 15 años en la realización de pruebas moleculares, en segundo lugar porque cuenta con personal altamente calificado y con entrenamiento en técnicas moleculares, que capacitaron y asesoraron al estudiante de maestría, durante todo el proceso metodológico de esta investigación; en tercer lugar por trabajar con reactivos de calidad y por disponer de controles positivos y negativos que permitieron disminuir interpretaciones erróneas de las genotipificaciones; en cuarto lugar porque se secuenciaron muestras de cada uno de los genotipos posibles de cada uno de los polimorfismos y finalmente los análisis de todas las muestras fueron efectuados en forma enmascarada para evitar sesgos y el 10% de las muestras se procesaron por duplicado como control de calidad.

Sesgo de confusión: Para evitarlo se parearon los casos y los controles por sexo, edad e IMC $>30\text{kg/m}^2$ y al momento de realizar el análisis de asociación se seleccionaron las variables que mejor se ajustaban al modelo.

8. CONCLUSIONES

- El genotipo de mayor frecuencia en los polimorfismos estudiados fue:
 - P448: **GT** controles (47,8%) y casos (46,3%).
 - P679: **CC** controles (50,7%) y casos (51,4%).
 - P1711: **CC** controles (47,1%) y casos (52,3%)
- El alelo de mayor frecuencia en cada polimorfismo estudiado fue:
 - P448: **T** controles (51%) y casos (53%).
 - P679: **C** controles (70%) y casos (72%).
 - P1711: **C** controles (69%) y casos (72%)
- El polimorfismo más diverso fue el 448G>T (R65L) con una frecuencia de heterocigotos del 47,8%, entre los polimorfismos estudiados en la población de Bucaramanga.
- Los polimorfismos 448G>T (R65L), 679C>T (A142V) y 1711C>T se encontraron en Equilibrio de Hardy-Weinberg (HE-W), tanto en los casos como en los controles.
- El Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) en la muestra poblacional de Bucaramanga mostró una baja diferenciación (96,96%) entre los individuos evidenciando que la población se comporta como una misma unidad genética reproductiva (F_{ST} : -0,00007)

El haplotipo de mayor frecuencia tanto en los casos como en los controles fue el **GCC (RAA)** (40,7%) y el menos frecuente fue el **GTT (RVV)** (0,9%) en ambos grupos.

No se encontró asociación entre los polimorfismos 448GT (R65L), 679C>T (A142V) y 1711C>T (A486V) del gen de la quinasa 4 (GRK4) del receptor dopaminérgico acoplado a la proteína G y la HAE en la muestra poblacional analizada.

No se encontró asociación significativa entre los haplotipos gen de la quinasa 4 y la HAE en la muestra poblacional analizada.

CITAS BIBLIOGRAFICAS

1. **WHO, World Health Organization.** Cardiovascular disease. Fact sheet N°317. WHO Media centre. [Online] February 2007. [Cited: Noviembre 15, 2008.] [http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/..](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/)
2. **MURRAY, J. C.** *Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study.* 1997. pp. pp. 1269-1276.
3. **GAZIANO, Thomas A; SRINATH REDDY, K; PACCAUD, Fred; HORTON, Susan; CHATURVEDI, Vivek.** *Disease Control Priorities in Developing Countries.* 2. New York : Press, Oxford University, 2006. DOI: 10.1596/978-0-82-36179-5/.
4. **OPS.** *Salud en las Américas 2007.* [ed.] US : PAHO. Washington : s.n., 2007. Vol. II.
5. **GOBERNACIÓN DE SANTANDER.** Observatorio de Salud Pública. *Indicadores de morbilidad. Basados en registros Individuales de Prestación de servicio en Salud (RIPS).* [Online] Marzo 27, 2006. [Cited: Noviembre 20, 2008.] <http://www.observatorio.saludsantander.gov.co/noticias.php?idnews=14>.
6. **BAUTISTA, LE; VERA-CALA, LM; VILLAMIL, L; SILVA, S; PEÑA, I; LUNA, L.** *Factores de riesgo asociados con hipertensión arterial en adultos de Bucaramanga.* 2002. pp. 399-405. Vol. 44.
7. **WHITWORTH, JA; WHO, World Health Organization; ISH, International Society of Hypertension.** *World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension.* Australia : Lippicontt Will, 2003. pp. 1983-92. Vol. 21(11).

8. **Ayman, David.** *Essential hypertension.* 1942. pp. 147-148. Vol. 120.
9. **MIRANDA, B; OLIET, A.** *Fisiopatología de la hipertensión arterial esencial.* [ed.] IDEPSA. 1990. pp. 14-21.
10. **LUFT, Friedrich C.** *Hypertension Highlights Geneticism of Essential Hypertension.* [ed.] American Heart Association. 2004. pp. 1155–1159. Vol. 43.
11. **JENNINGS, David; NETSKY, Martin G.** *Essential hypertension: a sign in search of a disease.* 1994. pp. 973-979. Vol. 144.
12. **MOORE, JH; WILLIAMS, SM.** *New strategies for identifying gene-gene interactions in hypertension.* 2002. pp. 88-95. Vol. 34(2).
13. **STAMLER, Jeremiah; ROSE, Geoffrey; STAMLER, Rose; ELLIOTT, Paul; DYER, Alan; MARMOT, Michael.** *INTERSALT Study Findings. Public Health and Medical Care Implications.* 1989. pp. 570-577. Vol. 14.
14. **DAHL, LK; HEINE, M.** *Primary role of renal homografts in setting chronic blood pressure levels in rats.* 1975. pp. 692-6. Vol. 36(6):.
15. **AKITA, S; SACKS, FM; SVETKEY, LP; COLIN, PR; KIMURA, G.** *Effects of the dietary approaches to stop hypertension (DASH) diet on the pressure-natriuresis relationship.* 2003. pp. 8-13. Vol. 48.
16. **FELDER, RA.; JOSE, PA.** *Mechanisms of disease: the role of GRK4 in the etiology of essential hypertension and salt sensitivity.* 2006. pp. 637-50. Vol. 2(11).
17. **VARGAS ALARCÓN, Gilberto.** *Fisiopatogenia de la hipertensión.* México : s.n., 2006. pp. 157-160. Vol. 76, Medigrafa Artemisa en Línea.

18. **HERNÁNDEZ-AVILA, Mauricio; GARRIDO-LATORRE, Francisco; LÓPEZ-MORENO, Sergio.** *Diseño de estudios epidemiológicos.* 2000. pp. 144-154. Vol. 42.
19. **CORDELL, Heather J; CLAYTON, David G.** *Genetic association studies.* *Genetic Epidemiology* 3. 2005. pp. 1121–31.
20. **YANG, Woosung; NAKAYA, Jun.** *Statistical applications for SNPs analysis.* 2006. pp. 55-58. Vol. 6.
21. **MULLER, RF; YOUNG, ID.** *Emery's elements of medical genetics.* [ed.] Elsevier. Londres : Churchill Livingstone, 1998.
22. **KLUG, William S.; CUMMINGS, Michael R.; SPENCER, Charlotte A.** *Conceptos de genética.* Madrid : Pearson Educación, S.A, 2006.
23. **PRIETO SOLLA, Lourdes.** *Estudio de polimorfismos de ADN en restos humanos antiguos y muestras forenses críticas: Valoración de estrategias y resultados.* Madrid : Universidad Complutense de Madrid, 2002. pp. 79-92. Memoria para optar al grado de Doctor. 84-669-1714-4.
24. **COLLINS, Francis S.; BROOKS, Lisa D.; ARAVINDA, Chakravarti.** *A DNA Polymorphism Discovery Resource for Research on Human Genetic Variation.* 1998. pp. 1229-1231. Vol. 8.
25. **KWOK, Pui-Yan.** *Methods for Genotyping Single nucleotide polymorphisms.* 2001. pp. 235–58. Vol. 2.
26. **DOMINICZAK, Anna F.; NEGRIN, Domingo C.; CLARK, James S.; BROSAN, M. Julia; MCBRIDE, Martin W.; ALEXANDER, M. Yvonne.** *Genes*

and Hypertension From Gene Mapping in Experimental Models to Vascular Gene Transfer Strategies. 2000. pp. 164-172.

27. **GAVRAS, I; MANOLIS, A; GAVRAS, H.** *Genetic epidemiology of essential hypertension*. 1999. pp. 225-229. Vol. 13.

28. **BAUDIN, Bruno.** *Angiotensin II receptor polymorphisms in hypertension, Pharmacogenomic considerations*. s.l. : Ashley Publications Ltd, 2002. pp. 65-73. Vol. 3. ISSN 1462-2416..

29. **LOHMUELLER, KE.; WONG, JC.; MAUNEY, MM.; JIANG, L.; FELDER, RA.** *Patterns of Genetic Variation in the Hypertension Candidate Gene GRK4: Ethnic Variation and Haplotype Structure*. University College London : s.n., 2005. pp. 27–41.

30. **VARGAS C, Clara I.** *Polimorfismos genéticos del sistema renina angiotensina aldosterona como factores de riesgo para hipertensión arterial esencial en una población de los estratos dos y tres de Bucaramanga*. Bucaramanga : Universidad Industrial de Santander, 2006. Tesis de Grado.

31. **DONGFENG, Gu; SHAOYONG, Su; DONGLIANG, Ge; SHUFENG, Chen; JIANFENG, Huang; BIAO, Li; RUNSHENG, Chen; BOQIN, Qiang.** *Association Study With 33 Single-Nucleotide Polymorphisms in 11 Candidate Genes for Hypertension in Chinese*. 2006. pp. 1147-1154.

32. **SANDER, M; CHAVOSHAN, B; VICTOR, RC.** *A large blood pressure-raising effect of nitric oxide synthase inhibition in humans*. 1999. pp. 937-42.

33. **FORTE, P; COPLAN, M; SMILTH, LM; MILENE, E; SUTHERLAND, J; BENJAMÍN, N.** *Basal nitric oxide síntesis in essential hypertension*. 1997. pp. 837-42.

34. **JOSE, Pedro A; GILBERT, Eisner M.; Felder, RA.** *Dopamine and the kidney: a role in hypertension?* 2003. pp. 189–194. Vol. 12.
35. **BOCKAERT, J; PIN, JP.** *Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success.* 1999. pp. 1723–1729. Vol. 18.
36. **JACOB, Claire; BUNNETT, Nigel W.** *Transmembrane Signaling by G Protein-Coupled Receptors.* [ed.] Leonard R Johnson. Fourth Edition. San Francisco : Academic Press, 2006. pp. 63-85.
37. **PALCZEWSKI, K; HOFMANN, KP; BAEHR, W.** *Rhodopsin – advances and perspectives.* 2006. pp. 4425–6.
38. **NIV, MY; SKRABANEK, L; FILIZOLA, M; WEINSTEIN, H.** *Modeling activated states of GPCRs: the rhodopsin template.* 2006. pp. 437–48.
39. **MINNEMAN, K.** *Heterodimerization and surface localization of G protein coupled receptors.* 2007. pp. 1043–50.
40. **ZENG, Chunyu; SANADA, Hironobu; WATANABE, Hidetsuna; EISNER, Gilbert M.; FELDER, Robin A.; JOSE, Pedro A.** *Functional genomics of the dopaminergic system in hypertension.* 2004. pp. 233-246. Vol. 19, doi:10.1152/physiolgenomics.00127.2004.
41. **JOSE, Pedro A.; EISNER, Gilbert M.; FELDER, Robin A.** *Renal Dopamine and Sodium Homeostasis.* 2000. pp. 174-183. 1522–6417.
42. **MONSMA FJ, FJ Jr; MAHAN, LC; McVITTIE, LD.** *Molecular cloning and expression of aD1 dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation.* 1990. pp. 6723–7.

43. **AMENTA, F; BARILI, P; BRONZETTI, E; RICCI, A.** *Dopamine D1-like receptor subtypes in the rat kidney: a microanatomical study.* 1999. pp. 17-23. Vol. 21.
44. **BRISMAR, H; ASGHAR, M; CAREY, RM; GREENGARD, P; APERIA, A.** *Dopamine-induced recruitment of dopamine D1 receptors to the plasma membrane.* 1998. pp. 5573–5578. USA.
45. **O'CONNELL, DP; BOTKIN, SJ; RAMOS, SI; SIBLEY, DR; ARIANO, MA; FELDER RA, RA; CAREY, RM.** *Localization of dopamine D1A receptor protein in rat kidneys.* 1995. pp. 1185-1197. Vol. I.
46. **OZONO, R; O'CONNELL, DP; WANG, ZQ; MOORE, AF; SANADA, H; FELDER, RA; CAREY, RM.** *Localization of the dopamine D1 receptor protein in the human heart and kidney.* 1997. pp. 725–729.
47. **NEER, EJ.** *Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals.* 1995. pp. 249–257. Vol. 80.
48. **KOHUOUT, Trudy A.; LEFRKOWITZ., ROBERT J.** *Regulation of Protein-Coupled Receptor Kinases and Arrestinas During Receptor Desensitization.* 2003. pp. 9-18.
49. **OLSEN, NV.** *Effects of dopamine on renal haemodynamics tubular function and sodium excretion in normal humans.* 1998. pp. 282-297. Vol. 3.
50. **IZZO, Joshep L; BLACK, Henry.** *Hypertension Primer.* 1999. pp. 3-6.
51. **PREMONT, Richard T.; MACRAE, Alexander D.; STOFFEL, Robert H.; CHUNG, Namjin; PITCHER, Julie A.; AMBROSE, Christine; INGLESE, James; MACDONALD, Marcy E.; LEFKOWITZ, Robert J.** *Characterization of the G*

Protein-coupled Receptor Kinase GRK4. Identification Of Four Splice Variants. 1996. pp. 6403–6410. Vol. 271.

52. **STOFFEL, RH; RANDALL, RR; PREMONT, RT; LEFKOWITZ, RJ; INGLESE, J.** *Palmitoylation of G protein-coupled receptor kinase, GRK6. Lipid modification diversity in the GRK family.* 1994. pp. 27791–27794. Vol. 269.

53. **INGLESE, J; KOCH, W J; CARON, M G; LEFKOWITZ, RJ.** *Isoprenylation in regulation of signal transduction by G-protein-coupled receptor kinases.* Lond : s.n., 1992, Vol. 359, pp. 147–150.

54. **HISATOMI, O; MATSUDA, S; SATOH, T; KOTAKA, S; IMANISHOI, Y; TOKUNAGA, FA.** *novel subtype of G-protein-coupled receptor kinase, GRK7, in teleost cone photoreceptors.* 1998. pp. 159–164. Vol. 424.

55. **WEISS, ER; RAMAN, D; SHIRAKAWA, S; DUCCESCHI, MH; BERTRAM, PT; WONG, F; KRAFT, TW; OSAWA, S.** *The cloning of GRK7, a candidate cone opsin kinase, from cone- and rod- dominant mammalian retinas.* 1998. p. 27. Vol. 4.

56. **PITCHER, JA; FREDERICKS, ZL; STONE, WC; PREMONT, RT; STOFFEL, RH; KOCH, WJ; LEFKOWITZ, RJ.** *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)-enhanced G protein-coupled receptor kinase (GRK) activity. Location, structure and regulation of the PIP₂ binding site distinguishes the GRK subfamilies.* 1996. pp. 24907–24913. Vol. 271.

57. **WATANABE, H; Xu, J; BENGRA, C; JOSE, PA; FELDER, RA.** *Desensitization of human renal D1 dopamine receptors by G protein-coupled receptor kinase 4.* 2002. pp. 790 –798.

58. **PERRY, SJ; BAILLIE, GS; KOHOUT, TA; MCPHEE, I; MAGIERA, MM; ANG, KL; MILLER, WE; MCLEAN, AJ; CONTI, M; HOUSLAY, MD.** *Targeting of cyclic AMP degradation to B2-adrenergic receptors by B-arrestins.* Wash DC : s.n., 2002. pp. 834–836. Vol. 298.
59. **ALBRECHT, FE; DRAGO, J; FELDER, RA; PRINTZ, MP; EISNER, GM; ROBILLARD, JE; SIBLEY, DR; WESTPHAL, HJ; ALBRECHT, FE; PRINTZ, MP.** *Role of the D1A dopamine receptor in the pathogenesis of genetic hypertension.* 1996. pp. 2283–2288.
60. **BENGR, C; MIFFLIN, TE; KHRIPIN, Y; MANUNTA, P; WILLIAMS, SM; JOSE, PA; FELDER, RA.** *Genotyping of Essential Hypertension Single-Nucleotide Polymorphisms by a Homogeneous PCR Method with Universal Energy Transfer Primers.* 2002. pp. 2131–2140. Vol. 48.
61. **ZENG, Chunyu; VILLAR, Van Anthony M.; EISNER, Gilbert M.; WILLIAMS, Scott M.; FELDER, Robin A.; JOSE, Pedro A.** *G Protein–Coupled Receptor Kinase 4. Role in Blood Pressure Regulation.* Dallas. TX : American Heart Association, 2008. pp. 1524-4563.
62. **WANG, Y; LI, B; ZHAO, W; LIU, P; ZHAO, Q; CHEN, S; LI, H; GU, D.** *Association study of G protein-coupled Receptor Kinase 4 gene variants with essential hypertension in Northern Han Chinese.* 2006. pp. 1-6. Vol. 70.
63. **FELDER, RA; SANADA, H; XU, J; YU, PY; WANG, Z; WATANABE, H; ASICO, LD; WANG, W; ZHENG, S; YAMAGUCHI, I; WILLIAMS, S; GAINER, J; BROWN, NJ; HAZEN-MARTIN, D; Wong, LJ; ROBILLARD, JE; CAREY, RM; EISNER, GM; Jose, PA.** *G protein-coupled receptor kinase 4 gene variants in human essential hypertension.* 2002. pp. 3872–3877.

64. **OROSTEGUI, M; VERA, LM; VELANDIA, L; LÓPEZ, N; BAUTISTA, LE.** *Prevalencia de factores de Riesgo para enfermedad Cardiovascular en la Población de 18 y más años de Bucaramanga.* Bucaramanga : s.n., 2006. CIE. Sin publicar.

65. **BAUTISTA, LE; ORÓSTEGUI, M; VERA, LM; PRADA, GE; OROZCO, LC; HERRÁN, OF.** *Prevalence and impact of cardiovascular risk factors in Bucaramanga, Colombia.* 2006. Vol. 13, results from the Countrywide Integrated Noncommunicable Disease Intervention Programme (CINDI/CARMEN) baseline survey.

66. **OPS-OMS.** *EPIDAT 3.1 Análisis Epidemiológico de Datos Tabulados.* Barcelona : s.n., 2006.

67. **RODRÍGUEZ ESPARRAGÓN, F; RODRÍGUEZ PÉREZ, JC.; GARCÍA BELLO, MA.** *Guía práctica a los estudios de asociación genética. Consideraciones sobre su utilidad clínica.* 2009. pp. 582-588. Vol. 29, Órgano Oficial de la Sociedad Española de Nefrología.

68. **WILLIAMS, SM; RITCHIE, MD; PHILLIPS, JA; DAWSON, E; PRINCE, M; DZHURA, E; WILLIS, A; SEMENYA, A; SUMMAR, M; WHITE, BC; ADDY, JH; KPODONU, J; WONG, L-E; FELDER, RA; JOSE, PA; MOORE, JH.** *Multilocus Analysis of Hypertension: A Hierarchical Approach.* 2004. pp. 28–38. Vol. 57, DOI: 10.1159/000077387.

69. **CHOBANIAN, AV; BAKRIS, GL; BLACK, HR; CUSHMAN, WC; GREEN, LA; IZZO, JL Jr; JONES, DW; MATERSON, BJ; OPARIL, S; WRIGHT, JT Jr.; ROCCELLA, EJ.** *National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The seventh report of the Joint National Committee on Prevention,*

Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. Hypertension. 2003. pp. 1206–1252.

70. **PROGRAM NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION.** *Third Report of the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III).* National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health. . September 2002.

71. **GRUNDY SM, CLEEMAN JI, BAIREY CN.** *Implications of Recent Clinical Trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines.* 2004. pp. 227-39. Vol. 110.

72. **AMERICAN DIABETES ASSOCIATION.** *Screening for Type 2 Diabetes.* 2004. pp. S11-14. Vol. 27.

73. **VALVERDE, E; CABRERO, C; CAO, R; RODRÍGUEZ-CALVO, MS; DÉZ, A; BARROS, F; ALEMANY J; CARRACEDO, C.** *Population genetics of three VNTR polymorphisms in two different Spanish populations.* 1993. Vol. 105.

74. **SAIKI, RK; GELFAND, DH; STOFFEL, S; SCHARF, SJ; HIGUCH, R; HORN, GT; MULLIS, KB.** *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.* 1988. pp. 487–491.

75. **WILLIAMS, Raymond J.** *Restriction Endonucleases. classification, Propieties, and Applications.* s.l. : Humama Press. Inc., 2003. pp. 225-243. Vol. 23.

76. **DEAN, AG; ARNER, TG; SUNKI, GG; FRIEDMAN, R; LANTINGA, M; SANGAM, S; ZUBIETA, JC; SULLIVAN, KM; BRENDSELL, KA; GAO, Z; FONTAINE, N; Shu, M; Fuller, G; Smith, DC; Nitschke, DA; Fagan, RF.** *Epi Inf version 3.5.1, a database and statistics program for public health professionals.* Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, Georgia, USA : s.n., 2007.

77. **PEAKALL, R; SMOUSE, PE.** *GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research.* 2006. pp. 288-295. Vol. 6.
78. **EXCOFFIER, L; LAVAL, G; SCHNEIDER, S.** *Arlequin ver. 3.5: Anintegrated software package for population genetics data analysis.* 2005. pp. 47-50. Vol. 1.
79. **HARTL, D; CLARK, AC.** [ed.] Publishers Sunderland. 3^a . Massachusetts : Sinauer associates, 1997. pp. 71-109.
80. **FALUSH, D; STEPHENS, M; PRITCHARD, J.** *Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies.* 2003. pp. 1567-1587.
81. **HOSMER, D; TABER, S; LEMESHOW, S.** *The importance of assessing the fit of logistic regression models: A case study.* 1991. pp. 1630-1635. Vol. 81.
82. **INIESTA, R; GUINÓ, E; MORENO, V.** *Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos.* 2005. pp. 333-41. Vol. 19.
83. **MENSUA Fernández, J L.** *Genética.* Madrid : Pearson Education S.A, 2003.
84. **GUO, S; THOMPSON, E.** *Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles.* 1992. pp. 361-372. Vol. 48.
85. **WEIR, B; COCKERHAM, C.** *Estimating F-statistics for the analysis of population structure.* 1984. pp. 1358-1370. Vol. 6.
86. **NORMAN, Geoffrey R.** *Bioestadística.* Madrid : Mosby, 1996. pp. 150-160.
87. **SPEIRS, HJ; K, KATYK; KUMAR, NN; BENJAFIELD, AV; WANG, WY; MORRIS, BJ.** *Association of G-protein-coupled receptor kinase 4 haplotypes, but*

not HSD3B1 or PTP1B polymorphisms, with essential hypertension. 2004. pp. 931-936. Vol. 22.

88. **HINCAPIÉ, ML; GIL, AM; PICO, AL; GUSMÃO, L; RONDON, Fernando; CASTILLO, A.** *Análisis de la estructura genética en una muestra poblacional de Bucaramanga, departamento de Santander.* 2009. pp. 361-372. Vol. 40.

89. **ZHU, H; LU, Y; WANG, X; TREIBER, FA; HARSHFIELD, GA; SNEIDER, H; Dong, Y.** *The G Protein–Coupled Receptor Kinase 4 Gene Affects Blood Pressure in Young Normotensive Twins.* 2006. pp. 61-66. Vol. 19.

BIBLIOGRAFÍA

ALBRECHT, FE; DRAGO, J; FELDER, RA; PRINTZ, MP; EISNER, GM; ROBILLARD, JE; SIBLEY, DR; WESTPHAL, HJ; ALBRECHT, FE; PRINTZ, MP. *Role of the D1A dopamine receptor in the pathogenesis of genetic hypertension.* 1996. pp. 2283–2288.

BAUTISTA, LE; ORÓSTEGUI, M; VERA, LM; PRADA, GE; OROZCO, LC; HERRÁN, OF. *Prevalence and impact of cardiovascular risk factors in Bucaramanga, Colombia.* 2006. Vol. 13, results from the Countrywide Integrated Noncommunicable Disease Intervention Programme (CINDI/CARMEN) baseline survey.

BAUTISTA, LE; VERA-CALA, LM; VILLAMIL, L; SILVA, S; PEÑA, I; LUNA, L. *Factores de riesgo asociados con hipertensión arterial en adultos de Bucaramanga.* 2002. pp. 399-405. Vol. 44.

BENGRÁ, C; MIFFLIN, TE; KHRIPIN, Y; MANUNTA, P; WILLIAMS, SM; JOSE, PA; FELDER, RA. *Genotyping of Essential Hypertension Single-Nucleotide Polymorphisms by a Homogeneous PCR Method with Universal Energy Transfer Primers.* 2002. pp. 2131–2140. Vol. 48.

CHOBANIAN, AV; BAKRIS, GL; BLACK, HR; CUSHMAN, WC; GREEN, LA; IZZO, JL Jr; JONES, DW; MATERSON, BJ; OPARIL, S; WRIGHT, JT Jr.; ROCCELLA, EJ. *National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. Hypertension.* 2003. pp. 1206–1252.

DEAN, AG; ARNER, TG; SUNKI, GG; FRIEDMAN, R; LANTINGA, M; SANGAM, S; ZUBIETA, JC; SULLIVAN, KM; BRENDDEL, KA; GAO, Z; FONTAINE, N; SHU, M; FULLER, G; SMITH, DC; NITSCHKE, DA; FAGAN, RF. Epi Inf version 3.5.1, a database and statistics program for public health professionals. *Centers for Disease Control and Prevention*. Atlanta, Georgia, USA : s.n., 2007.

DONGFENG, Gu; SHAOYONG, Su; DONGLIANG, Ge; SHUFENG, Chen; JIANFENG, Huang; BIAO, Li; RUNSHENG, Chen; BOQIN, Qiang. *Association Study With 33 Single-Nucleotide Polymorphisms in 11 Candidate Genes for Hypertension in Chinese*. 2006. pp. 1147-1154.

EXCOFFIER, L; LAVAL, G; SCHNEIDER, S. *Arlequin ver. 3.5: Anintegrated software package for population genetics data analysis*. 2005. pp. 47-50. Vol. 1.

FELDER, RA; SANADA, H; XU, J; YU, PY; WANG, Z; WATANABE, H; ASICO, LD; WANG, W; ZHENG, S; YAMAGUCHI, I; WILLIAMS, S; GAINER, J; BROWN, NJ; HAZEN-KOHUOUT, Trudy A.; LEFRKOWITZ, Robert J. *Regulation of Protein-Coupled Receptor Kinases and Arrestinas During Receptor Desensitization*. 2003. pp. 9-18.

GAVRAS, I; MANOLIS, A; GAVRAS, H. *Genetic epidemiology of essential hypertension*. 1999. pp. 225-229. Vol. 13.

GOBERNACIÓN DE SANTANDER. Observatorio de Salud Pública. *Indicadores de morbilidad. Basados en registros Individuales de Prestación de servicio en Salud (RIPS)*. [Online] Marzo 27, 2006. [Cited: Noviembre 20, 2008.] <http://www.observatorio.saludsantander.gov.co/noticias.php?idnews=14>.

GUO, S; THOMPSON, E. *Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles*. 1992. pp. 361-372. Vol. 48.

HARTL, D; CLARK, AC. [ed.] Publishers Sunderland. 3^a . Massachusetts : Sinauer associates, 1997. pp. 71-109.

HINCAPIÉ, ML; GIL, AM; PICO, AL; GUSMÃO, L; RONDON, Fernando; CASTILLO, A. *Análisis de la estructura genética en una muestra poblacional de Bucaramanga, departamento de Santander.* 2009. pp. 361-372. Vol. 40.

INIESTA, R; GUINÓ, E; MORENO, V. *Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos.* 2005. pp. 333-41. Vol. 19.

JOSE, Pedro A.; EISNER, Gilbert M.; FELDER, Robin A. *Renal Dopamine and Sodium Homeostasis.* 2000. pp. 174-183. 1522–6417.

LOHMUELLER, KE.; WONG, JC.; MAUNEY, MM.; JIANG, L.; FELDER, RA. *Patterns of Genetic Variation in the Hypertension Candidate Gene GRK4: Ethnic Variation and Haplotype Structure.* University College London : s.n., 2005. pp. 27–41.

MARTIN, D; WONG, LJ; ROBILLARD, JE; CAREY, RM; EISNER, GM; JOSE, PA. *G protein-coupled receptor kinase 4 gene variants in human essential hypertension.* 2002. pp. 3872–3877.

MONSMA FJ, FJ Jr; MAHAN, LC; MCVITTIE, LD. *Molecular cloning and expression of aD1 dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation.* 1990. pp. 6723–7.

MURRAY, J. C. *Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study.* 1997. pp. 1269-1276.

OPS-OMS. *EPIDAT 3.1 Análisis Epidemiológico de Datos Tabulados.* Barcelona : s.n., 2006.

OZONO, R; O'CONNELL, DP; WANG, ZQ; MOORE, AF; SANADA, H; FELDER, RA; CAREY, RM. *Localization of the dopamine D1 receptor protein in the human heart and kidney.* 1997. pp. 725–729.

PEAKALL, R; SMOUSE, PE. *GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research.* 2006. pp. 288-295. Vol. 6.

PREMONT, Richard T.; MACRAE, Alexander D.; STOFFEL, Robert H.; CHUNG, Namjin; PITCHER, Julie A.; AMBROSE, Christine; INGLESE, James; MACDONALD, Marcy E.; LEFKOWITZ, Robert J. *Characterization of the G Protein-coupled Receptor Kinase GRK4. Identification Of Four Splice Variants.* 1996. pp. 6403–6410. Vol. 271.

PRIETO SOLLA, Lourdes. *Estudio de polimorfismos de ADN en restos humanos antiguos y muestras forenses críticas: Valoración de estrategias y resultados.* Madrid : Universidad Complutense de Madrid, 2002. pp. 79-92. Memoria para optar al grado de Doctor. 84-669-1714-4.

RODRÍGUEZ ESPARRAGÓN, F; RODRÍGUEZ PÉREZ, JC.; GARCÍA BELLO, MA. *Guía práctica a los estudios de asociación genética. Consideraciones sobre su utilidad clínica.* 2009. pp. 582-588. Vol. 29, Órgano Oficial de la Sociedad Española de Nefrología.

SPEIRS, HJ; K, Katyk; KUMAR, NN; BENJAFIELD, AV; WANG, WY; MORRIS, BJ. *Association of G-protein-coupled receptor kinase 4 haplotypes, but not HSD3B1 or PTP1B polymorphisms, with essential hypertension.* 2004. pp. 931-936. Vol. 22.

VALVERDE, E; CABRERO, C; CAO, R; RODRÍGUEZ-CALVO, MS; DÉZ, A; BARROS, F; Alemany J, CARRACEDO, C. *Population genetics of three VNTR polymorphisms in two different Spanish populations.* 1993. Vol. 105.

VARGAS C, Clara I. *Polimorfismos genéticos del sistema renina angiotensina aldosterona como factores de riesgo para hipertensión arterial esencial en una población de los estratos dos y tres de Bucaramanga.* Bucaramanga : Universidad Industrial de Santander, 2006. Tesis de Grado.

WANG, Y; Li, B; ZHAO, W; LIU, P; ZHAO, Q; CHEN, S; LI, H; GU, D. *Association study of G protein-coupled Receptor Kinase 4 gene variants with essential hypertension in Northern Han Chinese.* 2006. pp. 1-6. Vol. 70.

WHITWORTH, JA; WHO, World Health Organization; ISH, International Society of Hypertension. *World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension.* Australia : Lippincott Will, 2003. pp. 1983-92. Vol. 21(11).

WHO, World Health Organization. Cardiovascular disease. Fact sheet N°317. WHO Media centre. [Online] February 2007. [Cited: Noviembre 15, 2008.] [http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/..](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/)

WILLIAMS, Raymond J. *Restriction Endonucleases. classification, Propieties, and Applications.* s.l. : Humama Press. Inc., 2003. pp. 225-243. Vol. 23.


WILLIAMS, SM; RITCHIE, MD; PHILLIPS, JA; DAWSONE, E; PRINCE, M; DZHURA, E; WILLIS, A; SEMENYA, A; SUMMAR, M; WHITE, BC; ADDY, JH; KPODONU, J; WONG, L-E; FELDER, RA; JOSE, PA; MOORE, JH. *Multilocus Analysis of Hypertension: A Hierarchical Approach.* 2004. pp. 28–38. Vol. 57, DOI: 10.1159/000077387.

ZENG, Chunyu; SANADA, Hironobu; WATANABE, Hidetsuna; EISNER, Gilbert M.; FELDER, Robin A.; JOSE, Pedro A. *Functional genomics of the dopaminergic system in hypertension.* 2004. pp. 233-246. Vol. 19, doi:10.1152/physiolgenomics.00127.2004.

ZHU, H; LU, Y; WANG, X; TREIBER, FA; HARSHFIELD, GA; SNEIDER, H; DONG, Y. *The G Protein–Coupled Receptor Kinase 4 Gene Affects Blood Pressure in Young Normotensive Twins.* 2006. pp. 61-66. Vol. 19.

ANEXOS

Anexo A. Consentimiento informado.

 UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

REUNIÓN
COMITÉ DE ÉTICA PARA LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA – CEIC
DE LA FACULTAD DE SALUD - UIS

ACTA No 015 de 2007

Fecha: 27 de agosto de 2007	Hora: 7:00 a 9:00 A.M.	Lugar: Sala de reuniones de la DIEF
-----------------------------	------------------------	-------------------------------------

Asistentes: Esperanza Cruz Solano, Coordinadora Comité
Claudia Cristina Ortiz López, Representante Facultad de Salud
Alexander Pinzon Amado, Representante Facultad de Salud
Julio Cesar Mantilla Hernández, Representante Facultad de Salud
Rafael Enrique Serrano Vásquez, Representante Facultad de Salud

Orden del Día

- Verificación del quórum y Lectura del acta anterior
- Asuntos Proyectos de Investigación

Desarrollo del Orden del Día:

Verificación del Quórum

Asistieron cinco miembros del Comité. Pendiente lectura del acta anterior.

Asuntos proyectos de Investigación

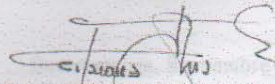
Se revisaron los siguientes proyectos de investigación presentados a la Convocatoria para la presentación de proyectos de investigación en ciencias de la salud - año 2007 (Modalidad Recuperación Contingente) - 408 de COLCIENCIAS

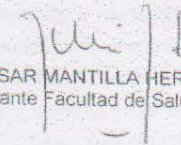
- "Caracterización molecular de las cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes en el Hospital Universitario de Santander", investigador principal: Luis Miguel Sosa Avila. **APROBADO**
- "Síntesis y evaluación de nuevos y promisorios agentes anti-Leishmania y anti-*Trypanosoma cruzi* derivados de la Tetrahidro-1-benzoazepina y Dibenzo[c,t]iazolo[3,2-a]azepina", investigador principal: Alirio Palma Rodríguez. **APROBADO**

Ciudad Universitaria - Carrera 27 calle 9
PBX: (7)634 4000 - FAX: (7)636 1946 - A. A. 678 - www.uis.edu.co
Bucaramanga - Colombia


- ♦ "Eficacia de la estrategia de comunicación y participación comunitaria para la adherencia y el empoderamiento con las medidas de control del dengue en la comuna norte de Bucaramanga", investigador principal: Flor de María Cáceres Manrique. APROBADO.
- ♦ "Evaluación de los sesgos cognoscitivos en población con trastornos por estrés postraumático como consecuencia de la violencia sexual", investigador principal: Marta Isabel Dallos Arenales. APROBADO.
- ♦ "Validación del Índice Tobillo Brazo por Método Oscilométrico como Tamizaje de Enfermedad Arterial Periférica", investigador principal: Myriam Oróstegui Arenas. APROBADO.
- ♦ "Exposición a Mercurio e Hipertensión Arterial", investigador principal: Germán Gamarra Hernández. APROBADO.
- ♦ "Mapeo genómico de alta resolución en regiones candidatas asociadas con desarrollo de cardiomiopatía chagásica", investigador principal: Clara Isabel González Rugeles. APROBADO.
- ♦ "Nuevas Direcciones en la Búsqueda de Agentes Activos sobre el SNC. Síntesis y Evaluación de Efectos de Tipo Ansiolítico y Sedante de Nuevas Series de Derivados de la Dihidrodibenzo[b,e]azepina, Tetrahidrodibenzo[b,f]azocina y Tetrahidro-1-benzoazepina", investigador principal: Alirio Palma Rodríguez. APROBADO.
- ♦ "Terapia genética e inmunoterapia para el tratamiento de tumores hematológicos", investigador principal: Herman José Arteaga N. APROBADO.
- ♦ "Rol de las poblaciones de *Rhodnius prolixus* de palmas en la transmisión de *Trypanosoma cruzi* en zonas intervenidas en los llanos orientales de Colombia", investigador principal: Victor Manuel Angulo Silva. APROBADO.
- ♦ "Poliformismos del gen de ola quinasa 4 del receptor Dopaminérgico acoplado a la proteína G y del Gen de la Sintasa de Oxido Nítrico y Riesgo de Hipertensión Esencial", investigador principal: Adriana Castillo. APROBADO.
- ♦ "Actividad paromomicina y miltefosina liposomal en Leishmaniasis cutánea", investigador principal: Patricia Escobar Rivero. APROBADO.
- ♦ "Evaluación de la función autonómica cardíaca endotelial y función ventricular izquierda en pacientes hipertensos con depresión mayor (proyecto DELFOS)", investigador principal: Marta Isabel Dallos Arenales. APROBADO.
- ♦ "Estudio in vitro de la actividad fototóxica sobre la Leishmania con fotosensibilizadores bioconjugados", investigador principal: Fernando Martínez Ortega. APROBADO.
- ♦ "Detección de péptidos derivados del péptido Natriurético pro B como predictores de mortalidad en pacientes con infarto del miocardio", investigador principal: Gerardo Muñoz. APROBADO.

En constancia firman,


ESPERANZA CRUZ SOLANO
Coordinadora Comité


JULIO CESAR MANTILLA HERNANDEZ
Representante Facultad de Salud


ALEXANDER PINZON AMADO
Representante Facultad de Salud


CLAUDIA CRISTINA ORTIZ LÓPEZ
Representante Facultad de Salud

Investigador principal

Dr. David Segura

Asesor principal



RAFAEL ENRIQUE SERRANO VASQUEZ
Representante Facultad de Salud

Coordinadora Comité de Ética

MARÍA VICTORIA ORTIZ CARRERA
Coordinadora Comité de Ética



UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

ENCUESTA DE FACTORES DE RIESGO PARA ENFERMEDADES CRÓNICAS NO TRANSMISIBLES EN LA POBLACION DE BUCARAMANGA

Código de barras

FORMA E: Consentimiento informado individual

La Universidad Industrial de Santander, las Secretarías Departamental y municipal de salud y la Organización Mundial de la Salud están haciendo un estudio sobre problemas de salud en Bucaramanga. El objetivo del estudio es conocer la cantidad de personas afectadas por enfermedades crónicas, como las enfermedades del corazón, diabetes, hipertensión y la cantidad de personas que tienen factores que las hacen más susceptibles a adquirir este tipo de enfermedades. Esta información se usará para desarrollar un programa de prevención llamado CARMEN. La finalidad del programa CARMEN es reducir los casos y las muertes por enfermedades crónicas en la población de Bucaramanga y posteriormente en todo el país.

COMITÉ DE ETICA
FACULTAD DE SALUD

PREVALENCIA DE FACTORES DE RIESGO PARA ENFERMEDADES CRÓNICAS NO TRANSMISIBLES EN LA POBLACION DE BUCARAMANGA ENCUESTA BASAL BASAL CARMEN

Investigador principal: Dr. Leonelo Bautista
Enf. Myrian Oróstegui
Departamento de Salud Pública

Al analizar este protocolo de investigación se informa lo siguiente:

Contiene un apartado que contempla en forma minuciosa el manejo ético del estudio, el cual concuerda con la Resolución 008430 de 1993 en su Capítulo II referido a las investigaciones en comunidades.

Presenta copia del instrumento con el cual se obtendra el consentimiento informado. Considero que éste debe ser revisado en algunos terminos de difícil comprensión para las personas.

MARIA VICTORIA OROZCO VARGAS
Coordinadora Comité de Etica

Anexo Protocolo de investigación

GOBERNACIÓN DE SANTANDER
ALCALDIA DE BUCARAMANGA
ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD
MINISTERIO DE SALUD
Universidad Industrial de Santander
PROGRAMA CARMEN

CÓDIGO DE BARRAS
ENCUESTA DE FACTORES DE RIESGO PARA ENFERMEDADES CRÓNICAS NO
TRANSMISIBLES EN LA POBLACIÓN DE BUCARAMANGA

FORMA 5: Consentimiento Informado Individual

La Universidad Industrial de Santander, las Secretarías Departamental y municipal de salud y la Organización Panamericana de la Salud, OPS están haciendo un estudio sobre problemas de salud en Bucaramanga. El objetivo del estudio es conocer la cantidad de personas afectadas por enfermedades crónicas, como las enfermedades del corazón y el cáncer por ejemplo, y la cantidad de personas que tienen factores que las hacen más susceptibles a adquirir este tipo de enfermedades. Esta información se usará para desarrollar un programa de prevención de estas enfermedades llamado **CARMEN**. La finalidad del programa **CARMEN** es reducir los casos y las muertes por enfermedades crónicas en la población de Bucaramanga y posteriormente en todo el país.

Su familia ha sido seleccionada al azar (por lotería) para participar en este estudio y Ud. ha sido seleccionado al azar dentro de las personas de su familia que están entre 15 y 64 años de edad. Si Ud. decide participar en el estudio le haremos una entrevista hablada; en esta entrevista le preguntaremos sobre algunas enfermedades que Ud. podría haber padecido, sobre algunos comportamientos como hacer ejercicio, fumar y tomar alcohol, y sobre sus hábitos alimenticios.

Además, si Ud. acepta participar, le invitaremos a asistir a una evaluación médica en un local cercano a su vivienda. En esa evaluación le tomaremos la presión arterial, lo pesaremos y le mediremos la cintura y la cadera. También le tomaremos una muestra de aproximadamente cuatro cucharadas de sangre (40 ml), en varios tubos. Ese día Ud. tendría que asistir en ayunas (sin tomar nada diferente al agua desde la noche anterior) para tomarse la muestra de sangre. La muestra se tomará con agujas nuevas y con equipo estéril para su seguridad. La toma de la muestra de sangre le puede ocasionar un dolor leve. En algunas personas se puede formar un hematoma (morado) en el lugar de la punción, que desaparece en

el transcurso de una semana. La muestra de sangre se usará ahora para medir su nivel de azúcar y colesterol. Estas se guardarán y en un futuro, podrían usarse para otras investigaciones incluyendo estudios genéticos. En tal caso, dichos estudios tendrían que ser autorizados por un comité de ética en investigación.

Todos los datos recolectados en esta encuesta, incluyendo los resultados de pruebas usadas en futuros estudios serán confidenciales y sólo se usarán para los propósitos del mismo. En ningún caso los participantes será identificados de forma individual.

Es bueno que Ud. tenga presente que aún si decide participar en el estudio, Ud. tiene el derecho de negarse a contestar cualquier pregunta o hacerse cualquiera de las mediciones que se harán en el estudio.

Los riesgos derivados de su participación en este estudio son mínimos. Sin embargo, Ud. podría beneficiarse directa e indirectamente. Si Ud. participa en el estudio los resultados de sus pruebas (de Colesterol y Glicemia), le serán entregados a fin de que puedan serles útiles en su cuidado médico regular. Además, si alguna de sus pruebas es anormal, Ud. recibiría consejería sobre dónde y cuándo buscar asistencia. Por otra parte, los resultados del estudio servirán para desarrollar un programa de prevención de enfermedades crónicas que será de beneficio para toda la comunidad.

Si Ud. tiene alguna pregunta adicional sobre este estudio, Ud. puede contactar a las doctoras: Myriam Orostegui Arenas y Rocío del Pilar Palmera Suárez, en el Centro de Investigaciones Epidemiológicas de la Universidad Industrial de Santander, al teléfono 6345781 y la doctora Maria Enoris Arango, de la Secretaria Departamental de Salud de Santander, al teléfono 6336233 extensión 245.

Acepta Ud. participar en este estudio? ____ Si ____ No

▪ * Nombre del participante _____ Firma _____ C.C.

▪ * Nombre del padre, madre o tutor _____ Firma _____ C.C.

(Si es menor de 18 años)

Nombre encuestador _____ Firma _____

Fecha __ __/día __ __/mes __ __/año

022-67

Código del Participante 00000000



UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

INEFAC 21

INCIDENCIA DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES Y DE SUS FACTORES DE RIESGO EN LA POBLACIÓN DE 19 A 70 AÑOS DE ESTRATOS SOCIOECONÓMICOS 2 Y 3 DE BUCARAMANGA - INEFAC

Bucaramanga, junio 27 de 2005 **INFORMADO INDIVIDUAL**

Justificación y Propósito del estudio

La Universidad Industrial de Santander a través del Centro de Investigaciones Epidemiológicas está realizando un estudio sobre problemas de salud en Bucaramanga. El objetivo principal del estudio es conocer la cantidad de personas afectadas por enfermedades como las del corazón y la cantidad de personas que tienen características que las hacen más o menos susceptibles a adquirir este tipo de enfermedades. Esta información será usada para identificar nuevos casos de enfermedad y medir los

FACULTAD DE SALUD

COMITÉ DE ÉTICA

Título Proyecto de INCIDENCIA DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES Y DE SUS FACTORES DE RIESGO EN LA POBLACIÓN DE 19 A 69 AÑOS DE ESTRATOS SOCIOECONÓMICOS 2 Y 3 DE BUCARAMANGA

Ud. fue seleccionado para participar en el estudio INEFAC ya que hace Ud. participó en un estudio similar y este es un primer seguimiento.

MYRIAM BROSTEGUI ARENAS

Si decide participar nuevamente, lo invitaremos a asistir a una evaluación El Comité de Ética de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander, en reunión del día de hoy, consideró este protocolo de investigación y se aprobó por cumplir con las normas vigentes

En el día tendrá que asistir en ayunas (sin tomar nada diferente al agua desde la noche anterior) para tomarse la muestra de sangre. Las muestras se tomarán mediante una punción venosa y se usarán agujas nuevas y equipo estéril para su seguridad. Las muestras se usarán ahora para medir su nivel de azúcar, colesterol, triglicéridos, HDL y LDL y creatinina. Además, una parte de las muestras se guardarán y

Flor de María Caceres
FLOR DE MARÍA CACERES para hacer otras investigaciones incluyendo medición de sustancias en la sangre) y Facultad de Salud - UIS obtener predisposiciones genéticas para las enfermedades y factores de riesgo). En tal caso, dichos estudios tendrían que ser autorizados por un comité de ética en investigación. También le entregaremos antes de su cita, un frasco para recolectar una muestra de orina en la cual se determinará la presencia o ausencia de proteínas en su orina.

Oficina Universitaria - Carrera 27 calle 5
Pbx. (57) 4000 - FAX (71625 1946 - A A 676 - www.uis.edu.co
Bucaramanga Colombia



Código del Participante



INCIDENCIA DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES Y DE SUS FACTORES DE RIESGO EN LA POBLACIÓN DE 20 A 70 AÑOS DE ESTRATOS SOCIOECONÓMICOS 2 Y 3 DE BUCARAMANGA - INEFAC

CONSENTIMIENTO INFORMADO INDIVIDUAL

1. Introducción y Propósito del estudio

La Universidad Industrial de Santander, a través del Centro de Investigaciones Epidemiológicas, está haciendo un estudio sobre problemas de salud en Bucaramanga. El objetivo del estudio es conocer la cantidad de personas afectadas por enfermedades como las del corazón y la cantidad de personas que tienen características que las hacen más o menos susceptibles a adquirir este tipo de enfermedades. Esta información será usada para identificar nuevos casos de enfermedad y medir los cambios en los factores de riesgo.

2. Por qué ha sido usted seleccionado

Ud. fue seleccionado para participar en el estudio INEFAC ya que hace más o menos 6 años Ud. participó en un estudio similar y este es un primer seguimiento.

3. Procedimientos del estudio

Si decide participar nuevamente, lo invitaremos a asistir a una evaluación médica en la que le tomaremos la presión arterial, mediremos su peso, su talla y los perímetros de su cintura y cadera. También le tomaremos una muestra de sangre de aproximadamente 20 cc. (4 cucharadas) en varios tubos pequeños. Ese día tendrá que asistir en ayunas (sin tomar nada diferente al agua desde la noche anterior) para tomarse la muestra de sangre. Las muestras se tomarán mediante una punción venosa y se usarán agujas nuevas y equipo estéril para su seguridad. Las muestras se usarán ahora para medir su nivel de azúcar, colesterol, triglicéridos, HDL y LDL y creatinina en sangre. Además, una parte de las muestras se guardarán y en un futuro, podrían usarse para hacer otras investigaciones incluyendo pruebas bioquímicas (es decir, medición de sustancias en la sangre) y genéticas (para establecer predisposiciones genéticas para las enfermedades y factores de riesgo). En tal caso, dichos estudios tendrían que ser autorizados por un comité de ética en investigación. También le entregaremos antes de su cita, un frasco para recolectar una muestra de orina en la cual se determinará la presencia o ausencia de proteínas en su orina.



Código del Participante



Una vez terminado el examen médico, le haremos una encuesta en la que le preguntaremos sobre algunas enfermedades que Ud. o sus familiares podrían haber padecido, sobre algunos comportamientos como hacer ejercicio, fumar y tomar alcohol, sobre sus hábitos alimenticios, sobre su estado de ánimo y la calidad del sueño.

Es probable que este estudio se repita dentro de cinco años, para conocer la evolución de estas condiciones en las personas que participen.

4. Confidencialidad o a abandonar el estudio

Nosotros haremos todos los esfuerzos razonables para proteger su privacidad. A usted se le asignará un número de código y su nombre no aparecerá en los formatos utilizados para la recolección de datos. Sólo los investigadores tendrán acceso al archivo en el cual se vincula su nombre con su número de código. Los datos obtenidos en este estudio serán usados sólo para los fines del estudio. Los resultados del estudio se presentarán en la forma de promedios y porcentajes y usted no será identificado de forma individual en ningún caso.

Si su muestra de sangre almacenada es usada para futuras pruebas, estas pruebas serán anónimas y tendrán que ser aprobadas por un Comité de Ética en Investigación en Sujetos Humanos.

5. Riesgos y beneficios

Los riesgos derivados de su participación en este estudio son mínimos. Sin embargo, Ud. podría beneficiarse directa e indirectamente. Si participa en el estudio los resultados de las pruebas de sangre y orina que se van a hacer actualmente y los datos de su presión arterial le serán entregados a fin de que pueda utilizarlos en su cuidado médico regular. Además, si alguna de sus pruebas es anormal, Ud. recibirá consejería médica sobre dónde y cuándo buscar asistencia. Por otra parte, los resultados del estudio podrán servir para desarrollar programas de prevención de enfermedades cardiovasculares que serán de beneficio para toda la comunidad.

Tomar una muestra de sangre resulta en dolor ligero y transitorio, algunas personas pueden desarrollar un hematoma o morado (una pequeña cantidad de sangre debajo de la piel) que desaparece en una semana aproximadamente, y hay también una pequeña probabilidad de infección. Sin embargo, como los resultados de este estudio nos podrían ayudar a entender mejor y a prevenir el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares, usted y personas como usted podrían beneficiarse de su participación.



Código del Participante



En el caso de futuros estudios en los cuales se hagan otras pruebas bioquímicas o genéticas que tengan implicaciones directas para su salud, usted tendrá la opción de decidir que le enviemos o no los resultados.

6. Costos y compensación

Usted no recibirá pago alguno por su participación en este estudio, pero todas las pruebas se le harán de forma gratuita.

7. Derecho a rehusar o a abandonar el estudio

Usted debe estar consciente de que su participación en este estudio es completamente voluntaria. Aún después de dar su aceptación para participar, usted tendrá derecho a retirarse del estudio, de negarse a contestar una pregunta o de proveer una muestra de sangre en el momento en que usted así lo desee. Más aún, si usted decide no participar en el estudio o si usted se niega a seguir participando, usted recibirá la misma atención y los mismos beneficios que usted hubiese recibido si nunca se le hubiese invitado a participar.

8. Preguntas

Por favor, siéntase en la libertad de hacerme cualquier pregunta si hay algo que no haya entendido. Si tiene alguna pregunta adicional acerca del estudio más adelante, usted puede contactar a las doctoras: Myriam Oróstegui Arenas, Lina María Vera Cala, Laura Isabel Valencia Ángel o Isis Rey Moreno en el Centro de Investigaciones Epidemiológicas de la Universidad Industrial de Santander, al teléfono 6345781, en el Departamento de Salud Pública al teléfono 6454726 o en la Sede Bucarica de la Universidad Industrial de Santander al teléfono 6708901.

9. Declaración del participante

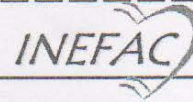
Nosotros le entregaremos una copia de este formato. Al firmar esta forma, usted está aceptando que entiende la información que se le ha dado y que está de acuerdo en participar como un sujeto de investigación en este estudio. Usted está de acuerdo en:

- Contestar a las preguntas de una entrevista verbal Sí No
- Dejar que le tomen la presión arterial, el peso, la talla, los perímetros de cintura y cadera Sí No
- Dar una muestra de sangre Sí No

Consentimiento Informado Página 2 de 4



Código del Participante



- Permitir que su muestra de sangre sea almacenada y usada en estudios futuros, incluyendo la realización de pruebas genéticas.
 Sí No
- Permitir ser contactado para estudios posteriores Sí No

¿Acepta usted participar en este estudio voluntariamente? Sí No

¿Desea usted conocer los resultados de sus pruebas realizadas en estudios futuros? Sí No

Si usted ha aceptado participar, por favor escriba su nombre y firme en el espacio de más abajo.

Nombre del participante: _____

Firma del participante: _____ Cédula _____

Fecha: Día ___ Mes ___ Año _____

Nombre del testigo 1: _____

Firma del testigo 1: _____ Cédula _____

Fecha: Día ___ Mes ___ Año _____

Nombre del testigo 2: _____

Firma del testigo 2: _____ Cédula _____

Fecha: Día ___ Mes ___ Año _____

10. Declaración del investigador

Certifico que yo o algún miembro de mi grupo de investigación le ha explicado a la persona de más arriba sobre esta investigación, y que esta persona entiende la naturaleza y propósito del estudio y los posibles riesgos y beneficios asociados con su participación en el mismo. Todas las preguntas que esta persona ha hecho le han sido contestadas.

Nombre del Investigador / Encuestador: _____

Firma del Investigador / Encuestador: _____

Fecha: Día ___ Mes ___ Año _____

Anexo B. Tabla 1. Especificaciones técnicas de Primers

SNP*	Polimorfismos	Secuencias de Primers	Tm °C†	% GC‡
rs2960306	448G-T, R65L	5'-6FAM/TTGCTTCTTATCCCTTTGC-3' (F)*	50,4	42,1
		5'-TTTGAGACGGAGTCTTGCT-3'(R)***	56,3	47,3
rs1024323	679C-T, A142V	5'-GCAGAAGGTTGGGTGGTGT-3' (F)	58,0	57,8
		5'-AAGGAGGAGAACCCTTCCAAAAAGG-3'(R)-	58,9	48
rs1801058	1711C-T, A486V	5'-AGAGTGGCGGTGTTTATGCG-3' (F)	58,0	55
		5'-GGTGTCCAGGTAGATCCCTTTTCAGC-3'(R)-	60,8	56

*SNPs. **F, primer Forward. ***R, primer Reverse, - Primers mismatched. †TM, Temperatura de Melting. ‡ %GC Porcentaje de Guaninas y citosinas

Anexo C. Tabla 2. Protocolo de amplificación condiciones PCR

Reactivo	[] inicial	Volumen de muestra	[] final
H ₂ O bidestilada		2,3 µl	
Buffer	5X	2 µl	1X
Pimer Foward	5 µM	1 µl	0,5 µM
Primer Reverse	5 µM	1 µl	0,5 µM
MgCl ₂	25 mM	1,4 µl	3,5 mM
dNTPs	10 mM	0,8 µl	0,8 mM
Taq Polimerasa	5 U/µl	0,2 µl	1 U/uL
ADN genómico	30 ng	1,3 µl	4 ng
Volumen final		10 µl	

Anexo D. Tabla 3. Protocolo de amplificación PCR

Denaturación Paso Inicial	Hibridación: 38 ciclos			Paso final
	Denaturación	Anillamiento	Extensión	
94°C 5 m	94°C 15 s	60°C 15 s	72°C 30s	72°C 7 m

Fuente. WANG, Y, y otros. «Association study of G protein-coupled Receptor Kinasa 4 gene variants with essential hypertension in Northern Han Chinese.» Ann H Genet 70 (2006): 1-6.

Anexo E. Tabla 4. Protocolo de digestión

Reactivo / Polimorfismo	[] inicial	Volumen	[] final
Buffer 10X	10X	1 µl	1X
BSA Acetylated	10 µg/µl	0,1 µl	0,1 µl
Enzima de restricción*	5 U/µl	0,25 µl	1U
Amplificado	4 ng	6 µl	2,4 ng
Volumen final		10 µl	10 µl
Incubación a 37°C por 10 horas			

*Enzimas AatII, HaeIII y HhaI

Anexo F. Tabla 5. Enzimas de restricción y tamaños del producto de la restricción

Polimorfismo	Tamaño del Amplificado (pb)	Enzima Restricción	Secuencia de reconocimiento	Genotipo*	Tamaño del Producto de Restricción (pb)
448G>T	485	AatII	5- GACGT [^] C- 3 3- C [^] TGCAG- 5	TT	485
				GG	410 / 75
				TG	485 - 410 / 75
679C>T	201	HaeIII	5- GG [^] CC- 3 3- CC [^] GG- 5	TT	201
				CC	176 / 25
				TC	201 - 176 / 25
1711C>T	185	HhaI	5- GCG [^] C- 3 3- C [^] GCG- 5	TT	185
				CC	161 / 24
				TC	185 - 161 / 24

*Genotipo homocigoto (TT), Heterocigoto (GT), Genotipo homocigoto (TT). Pares de bases (pb)

Anexo G. Secuenciación de los polimorfismos 448G>T, 679C>T y 1711C>T

Alignment Report of 448 polimorfismo alignment.meg ClustalW (Slow/Accurate, IUB)
Monday, August 09, 2010 4:28 PM

Page 1

TTGCTTCTTATCCCTTTGCTTCACCCGRRRANGGNTATAGCAGTCTTTTGTGCAAGCAACCGATAGGAGAGCTCTCTTCAGGCAGTTCCTGTGACACC		Majority
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100		
1	TTGCTTCTTATCCCTTTGCTTCACCCGRRRANGGNTATAGCAGTCTTTTGTGCAAGCAACCGATAGGAGAGCTCTCTTCAGGCAGTTCCTGTGACACC	Polimorfismo 448 GT.seq
1	# 1 polymorphism 448 merged.seq
1	# 2 polymorphism 448 merged.seq
1	# 3 polymorphism 448 merged.seq
1	# 4 polymorphism 448 merged.seq
1	# 5 polymorphism 448 merged.seq
1	# 6 polymorphism 448 merged.seq

AACCCACCTTAARAGGGCCACTTGAATCTTGGAGCGGTGGTGGGCGT77ATCTCCATATGAGCAGCCGCCAATCTTATGCTTTGAAAGGTAA		Majority
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200		
101	AACCCACCTTAARAGGGCCACTTGAATCTTGGAGCGGTGGTGGGCGT77ATCTCCATATGAGCAGCCGCCAATCTTATGCTTTGAAAGGTAA	Polimorfismo 448 GT.seq
101	# 1 polymorphism 448 merged.seq
101	# 2 polymorphism 448 merged.seq
101	# 3 polymorphism 448 merged.seq
101	# 4 polymorphism 448 merged.seq
101	# 5 polymorphism 448 merged.seq
101	# 6 polymorphism 448 merged.seq

AACTTGGCCAGGCGCACTACTCATCTGTRATCCGACATTTGGAGGCTGAGGGCGGGGATGCA7GAGGTCAGGAGATCGAGACCATCCCTGACCCAC		Majority
210 220 230 240 250 260 270 280 290 300		
201	AACTTGGCCAGGCGCACTACTCATCTGTRATCCGACATTTGGAGGCTGAGGGCGGGGATGCA7GAGGTCAGGAGATCGAGACCATCCCTGACCCAC	Polimorfismo 448 GT.seq
201	# 1 polymorphism 448 merged.seq
201	# 2 polymorphism 448 merged.seq
201	# 3 polymorphism 448 merged.seq
201	# 4 polymorphism 448 merged.seq
201	# 5 polymorphism 448 merged.seq
201	# 6 polymorphism 448 merged.seq

ACAGTGAAGCCGCTCTCTACTTAAATACGAAAGATTAGCCGGGCTGGTGGCGGDTGCTTAGTCCGACTACTTGGGAGGCTGAGGCAGGGGATCCAC		Majority
310 320 330 340 350 360 370 380 390 400		
301	ACAGTGAAGCCGCTCTCTACTTAAATACGAAAGATTAGCCGGGCTGGTGGCGGDTGCTTAGTCCGACTACTTGGGAGGCTGAGGCAGGGGATCCAC	Polimorfismo 448 GT.seq
301	# 1 polymorphism 448 merged.seq
301	# 2 polymorphism 448 merged.seq
301	# 3 polymorphism 448 merged.seq
301	# 4 polymorphism 448 merged.seq
301	# 5 polymorphism 448 merged.seq
301	# 6 polymorphism 448 merged.seq

Alignment Report of 448 polimorfismo alignment.meg ClustalW (Slow/Accurate, IUB)
Monday, August 09, 2010 4:28 PM

Page 2

TTGACAGGAGGCGAGGTTCCAGTGAAGCCGAGATGCAACACTGCTTCCAGGC1999GACAGAGCMGACTCCG7TCCMA		Majority
410 420 430 440 450 460 470 480		
401	TTGACAGGAGGCGAGGTTCCAGTGAAGCCGAGATGCAACACTGCTTCCAGGC1999GACAGAGCMGACTCCG7TCCMA	Polimorfismo 448 GT.seq
401	# 1 polymorphism 448 merged.seq
401	# 2 polymorphism 448 merged.seq
401	# 3 polymorphism 448 merged.seq
401	# 4 polymorphism 448 merged.seq
401	# 5 polymorphism 448 merged.seq
401	# 6 polymorphism 448 merged.seq

Decoration '#1': Hide (as ',') residues that match Polimorfismo 448 GT.seq exactly.

Decoration '#Polimorfismo 448G - T, R65L': Box residues that match the Consensus exactly.

```

AAGGAGGAGGAGACCTTCCAAAAGGCGCTTGGAGGATGTACTAGSTRAGTGGTTCGTGCTGAGCCCTGCAATATATTTCTATGACTAACC Majority
      10      20      30      40      50      60      70      80      90
1 ..... 679 polymorphism sequence.seq
1 ..... # 7 679 merged.seq
1 ..... # 8 679 merged.seq
1 ..... # 9 679 merged.seq
1 ..... # 10 679 merged.seq
1 ..... # 11 679 merged.seq
1 ..... # 12 679 merged.seq

CGAAACAGACAGCTTTCAGGAGGTTTCTCTGCATAGAGCAAGTTCCTAGAGTSTAGTGGACCTTGACACACCTGAGGCTTAGGGACGC Majority
      100     110     120     130     140     150     160     170     180
91 ..... 679 polymorphism sequence.seq
91 ..... # 7 679 merged.seq
91 ..... # 8 679 merged.seq
91 ..... # 9 679 merged.seq
91 ..... # 10 679 merged.seq
91 ..... # 11 679 merged.seq
91 ..... # 12 679 merged.seq

TGACAGCAGCCAGCCTTCGCG Majority
      190     200
181 ..... 679 polymorphism sequence.seq
181 ..... # 7 679 merged.seq
181 ..... # 8 679 merged.seq
181 ..... # 9 679 merged.seq
181 ..... # 10 679 merged.seq
181 ..... # 11 679 merged.seq
181 ..... # 12 679 merged.seq

Decoration 'Polymorphism 679 C>T Alignment Report': Hide (as '.') residues that match the Consensus exactly.
Decoration 'Decoration #2': Hide (as '.') residues that match 679 polymorphism sequence.seq exactly.
```

```

AGAGTGGGGTGTATTATGAGTGCAGTTTACTGGGCGTTTCATCTCTGGGAACTGAGGGAGCTGAGGATTCCTGTAGTCAAC Majority
      10      20      30      40      50      60      70      80
1 ..... Polymorphism 1711 sequence.seq
1 ..... # 1 1711 merged.seq
1 ..... # 2 1711 merged.seq
1 ..... # 3 1711 merged.seq
1 ..... # 4 1711 merged.seq
1 ..... # 5 1711 merged.seq
1 ..... # 6 1711 merged.seq

TCAGAGGCTGCCCCGTGTTCTGCTAGACAGCTCAGGCCGTTTACTGTAGGAGCGTCTGGATATGAGCACTTCTCGGCT Majority
      90      100     110     120     130     140     150     160
81 ..... Polymorphism 1711 sequence.seq
81 ..... # 1 1711 merged.seq
81 ..... # 2 1711 merged.seq
81 ..... # 3 1711 merged.seq
81 ..... # 4 1711 merged.seq
81 ..... # 5 1711 merged.seq
81 ..... # 6 1711 merged.seq

GCTGAAAGGGATCTACCTGGACCC Majority
      170     180
161 ..... Polymorphism 1711 sequence.seq
161 ..... # 1 1711 merged.seq
161 ..... # 2 1711 merged.seq
161 ..... # 3 1711 merged.seq
161 ..... # 4 1711 merged.seq
161 ..... # 5 1711 merged.seq
161 ..... # 6 1711 merged.seq

Decoration 'Decoration #1': Hide (as '.') residues that match Polymorphism 1711 sequence.seq exactly.
```

Anexo H. Tabla 6. Características de los antecedentes familiares de los casos y los controles

ANTECEDENTES FAMILIARES	n= 1118	CASOS	CONTROLES	p*
HIPERTENSION (HTA)				
Madre hta	480 (1116)	257 (54)**	223 (46)	0.0351
Padre hta	376 (1116)	217 (57)	159 (43)	0.0002
Hermano hta	215 (1102)	133 (62)	82 (38)	0.0001
INFARTO AGUDO MIOCARDIO	1105	548	557	
Si	198 (17.9)	124 (22.6)	74 (13.3)	0.0001
No	907 (82.1)	424 (77.4)	483 (86.7)	
ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR	1104	547	557	
Si	165 (14.9)	96 (17.6)	69 (12.4)	0.0162
No	939 (85.1)	451 (82.4)	488 (87.6)	
ANGINA DE PECHO	1100	543	557	
Si	106 (9.6)	59 (10.9)	47 (8.4)	0.1725
No	994 (90.4)	484 (89.1)	510 (91.6)	
DIABETES	1096	540	556	
Si	297 (27.1)	156 (28.9)	141 (25.4)	0.1888
No	799 (72.9)	384 (71.1)	415 (74.6)	

* Valor de p prueba del Chi². ** Porcentaje de individuos en el grupo.

Anexo I. Tabla 7. Características de los antecedentes personales de los casos y los controles.

ANTECEDENTES PERSONALES	n= 1118	CASOS	CONTROLES	p*
PAS mmHg	1116	559 126.84 (\pm 11.88)***	557 106.61 (\pm 7.30)	
PAD mmHg	1116	559 82.11(\pm 7.92)	557 70.21 (\pm 6.0)	
HISTORIA DE HTA	1004	506	498	
Si	154 (15.3)	108 (21.3)**	46 (9.2)	0.0000
No	850 (84.7)	398 (78.7)	452 (90.8)	
GLICEMIA >126 mg/dl)	1116	558	558	
Si	31 (2.8)	20 (3.6)	11 (2.0)	0.1011
No	1085 (97.2)	538 (96.4)	547 (98.0)	
OBESIDAD (IMC>30 kg/m²)	1118	559	559	
Si	178 (15.9)	115 (20.6)	63 (11.3)	0.0000
No	940 (84.1)	444 (79.4)	496 (88.7)	
TRIGLICERIDOS (<150 mg/dl)	1116	558	558	
Si	248 (22.2)	164 (29.4)	84 (15.1)	0.0000
No	868 (77.8)	394 (70.6)	474 (84.9)	
COLESTEROL- TOTAL (<200 mg/dl)	1116	558	558	
Si	598 (53.6)	342 (61.3)	256 (45.9)	0.0000
No	518 (46.4)	216 (38.7)	302 (54.1)	
COLESTEROL- LDL (<130 mg/dl)	1116	558	558	
Si	612 (54.8)	347 (62.2)	265 (47.5)	0.0000
No	504 (45.2)	211 (37.8)	293 (52.5)	
COLESTEROL- HDL (\geq 35 mg/dl)	1116	558	558	
Si	220 (19.7)	110 (19.7)	110 (19.7)	1.0000
No	896 (80.3)	448 (80.3)	448 (80.3)	
HIPERCOLESTEROLEMIA	1118	559	559	
Si	218(19.5)	134 (24.0)	84 (15.0)	0.0002
No	900(80.5)	425(76.0)	475 (85.0)	
ACTIVIDAD FISICA	1118	559	559	
No	325 (29.1)	144 (25.8)	181 (32.4)	0.0148
Sí	793 (70.9)	415 (74.2)	378 (67.6)	

PAS: Presión arterial sistólica. PAD: Presión arterial Diastólica. * Valor de p prueba del Chi². ** Porcentaje de individuos en el grupo. ***Media, Desviación estándar.

Anexo J. Tabla 8. Antecedentes familiares. Valores de los OR del modelo pareado en HAE y polimorfismos del Gen GRK4.

CARACTERÍSTICAS	OR	IC 95%*	p**
SEXO			
Femenino	1.80	1.40 - 2.31	0.0000
Masculino			
ANTECEDENTES FAMILIARES			
HIPERTENSION (HTA)			
Madre hta	1.29	1.01 - 1.64	0.0351
Padre hta	1.60	1.24 - 2.07	0.0002
Hermano hta	1.86	1.36 - 2.57	0.0001
INFARTO AGUDO MIOCARDIO			
Si	1.90	1.37 - 2.65	0.0001
No	1.0		
ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR			
Si	1.50	1.06 - 2.13	0.0162
No	1.0		
ANGINA DE PECHO			
Si	1.32	0.86 - 2.02	0.1725
No	1.0		
DIABETES			
Si	1.19	0.90 - 1.57	0.1888
No	1.0		
COLESTEROL- HDL (≥ 35 mg/dl)			
Si	1.0	0.73 - 1.35	1.0000
No	1.0		
HIPERCOLESTEROLEMIA			
Si	1.78	1.30 - 2.44	0.0002
No	1.0		
ACTIVIDAD FISICA			
No	0.72	0.55 - 0.94	0.0148
Sí	1.0		

*IC95%: Intervalo de confianza 95%. ** Valor de probabilidad χ^2 de los OR.

Anexo J. Tabla 9. Antecedentes personales. Valores de los OR del modelo pareado en HAE y polimorfismos del Gen GRK4.

CARACTERÍSTICAS ANTECEDENTES PERSONALES	OR	IC 95%*	p**
HISTORIA DE HTA			
Si	2.66	1.81 - 3.94	0.0000
No			
GLICEMIA >126 mg/dl)			
Si	1.84	0.83 - 4.31	0.1011
No	1.0		
OBESIDAD (IMC>30 kg/m ²)			
Si	2.03	1.44 - 2.89	0.0000
No	1.0		
TRIGLICERIDOS (<150 mg/dl)			
Si	2.34	1.73 - 3.19	0.0000
No	1.0		
COLESTEROL- TOTAL (<200 mg/dl)			
Si	1.86	1.46 - 2.38	0.0000
No	1.0		

*IC95%: Intervalo de confianza 95%. ** Valor de probabilidad χ^2 de los OR.

Anexo K. Tabla 10. Modelos de herencia Codominante, dominante y recesivo para los polimorfismos del gen GRK4.

POLIMORFISMO	MODELO	GENOTIPO	RRE	IC 95%*	p**
448G>T (R65L)	Co	TT	1		
		GT	0.87	0.66 - 1.16	0.36
		CC	0.86	0.62 - 1.21	0.39
	Do	GG	1		
		TT-GT	1.06	0.80 - 1.39	0.662
	Re	GG-GT	1		
TT		1.14	0.87 - 1.48	0.32	
POLIMORFISMO	MODELO	GENOTIPO	RRE	IC 95%*	p**
679C>T (A142V)	Co	CC	1		
		CT	1.02	0.79 - 1.31	0.87
		TT	0.79	0.52 - 1.22	0.29
	Do	CC	1		
		CT-TT	0.97	0.76 - 1.23	0.831
	Re	CC-CT	1		
TT		0.79	0.52 - 1.19	0.263	
POLIMORFISMO	MODELO	GENOTIPO	OR	IC 95%*	p**
1711C>T (A486V)	Co	CC	1		
		CT	0.79	0.61 - 1.01	0.06
		TT	0.92	0.59 - 1.43	0.73
	Do	CC	1		
		CT-TT	0.81	0.64 - 1.03	0.086
	Re	CC-CT	1		
TT		1.02	0.67 - 1.57	0.892	

*IC95%: Intervalo de confianza 95%. ** Valor de probabilidad chi2 de lo riesgo relativo esperado (RRE).

Anexo L. Tabla 11. Estudio de asociación ajuste de los polimorfismos del gen GRK4 con HAE

POLIMORFISMO	OR	IC 95%*	<i>p</i> **
448G>T (R65L)	1.11	0.97 - 1.27	0.119
679C>T (A142V)	0.95	0.89 - 1.02	0.243
1711C>T (A486V)	0.97	0.92 - 1.01	0.195
Haplotipos	0.99	0.94 - 1.03	0.734

*OR (Odds Ratio) Ajustado por edad, sexo, índice de masa corporal, historia familiar en primer grado de infarto agudo miocardio, historia médica de presión arterial, hipercolesterolemia. IC 95% Intervalo de Confianza. $p \leq 0,05$