

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**“ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS I/D DE LA  
ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA Y  
MET235THR DEL ANGIOTENSINÓGENO EN  
PACIENTES MAYAS Y SU ASOCIACIÓN CON  
PREECLAMPSIA”**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**BIÓLOGO**

PRESENTA:

**MIGUEL ANGEL GUERRA LUPIÁN**

DIRECTOR DE TESIS: DR. RAMÓN M. CORAL VÁZQUEZ



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*Dedico mi tesis*

*A Erika*

*Por todo lo que significa en mi vida.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Ramón Coral Vázquez, por haberme proporcionado todo lo necesario para realizar esta investigación, por compartir sus conocimientos y por sus substanciales sugerencias durante la redacción de la Tesis. Así mismo por haberme brindado su apoyo y confianza para realizar este trabajo, por su amistad.

A la Dra. Haydeé Rosas Vargas por compartir sus conocimientos y experiencia, así como su predisposición permanente en aclarar mis dudas.

A mis padres Ramiro Guerra y Martha L. Lupián, a quienes debo y agradezco mis logros, por ser un ejemplo a seguir, por confiar en mí, por apoyarme y alentarme. Siempre estaré orgulloso de ustedes. Gracias ;

A mis hermanos Nancy, Erika, Karla, Ramiro y Nelyda, por haberme apoyado en todo momento y contribuir positivamente a lo largo de mi vida. A mis sobrinos Brad y Ángel por hacer mejores todos los momentos.

A mis revisores Dr. Diego Arenas Aranda, M. en C. Ramón Víctor Moreno Torres, M. en C. Elías Piedra Ibarra y M. en C. Irma Elena Dueñas García. Por el tiempo dedicado a revisar este trabajo y por todas las sugerencias y recomendaciones realizadas.

A Elvia por su apoyo, comprensión y todos los momentos compartidos.

A mis compañeros y amigos durante la carrera Damián A., Pedro G., Joel J., Israel V,  
Enrique B., Iván V., por los momentos compartidos.

A mis compañeros de laboratorio por hacer un ambiente agradable de trabajo.

Este proyecto fue apoyado por el FOSISIERRA (CONACyT Regional del Sureste).

## ÍNDICE

Abreviaturas usadas:	¡Error! Marcador no definido.
RESUMEN	¡Error! Marcador no definido.
1. INTRODUCCIÓN	¡Error! Marcador no definido.
1.1 PREECLAMPSIA	¡Error! Marcador no definido.
1.1.1 FACTORES DE RIESGO	¡Error! Marcador no definido.
1.1.2 ETIOPATOGENIA DE LA PREECLAMPSIA	¡Error! Marcador no definido.
1.1.2.1 PATOLOGÍA	¡Error! Marcador no definido.
1.1.2.2 ETIOLOGÍA	¡Error! Marcador no definido.
1.2 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA	¡Error! Marcador no definido.
1.3 ANGIOTENSINÓGENO	¡Error! Marcador no definido.
1.3.1 POLIMORFISMO M235T DEL GEN DEL ANGIOTENSINÓGENO Y SU ASOCIACIÓN CON PREECLAMPSIA	¡Error! Marcador no definido.
1.4 ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA-I	¡Error! Marcador no definido.
1.4.1 POLIMORFISMO I/D DEL GEN DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA Y SU ASOCIACIÓN CON PREECLAMPSIA	¡Error! Marcador no definido.
2. JUSTIFICACIÓN	¡Error! Marcador no definido.
3. OBJETIVOS	¡Error! Marcador no definido.
4. MATERIAL Y MÉTODOS	¡Error! Marcador no definido.
4.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS	¡Error! Marcador no definido.
4.2 EXTRACCIÓN DE ADN	¡Error! Marcador no definido.
4.3 ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO I/D DEL GEN DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA (ACE)	¡Error! Marcador no definido.
4.4 ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO MET235THR DEL GEN DEL ANGIOTENSINOGENO (AGT)	¡Error! Marcador no definido.
4.4.1 PCR EN TIEMPO REAL	¡Error! Marcador no definido.
4.4.2 DISCRIMINACIÓN ALÉLICA	¡Error! Marcador no definido.
4.4.3 SECUENCIACIÓN	¡Error! Marcador no definido.
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	¡Error! Marcador no definido.
6. RESULTADOS	¡Error! Marcador no definido.
7. DISCUSIÓN	¡Error! Marcador no definido.
8. CONCLUSIONES	¡Error! Marcador no definido.
9. REFERENCIAS	¡Error! Marcador no definido.

## RESUMEN

La preeclampsia es uno de los desórdenes más serios del embarazo que afecta al 4-5% de las mujeres en estado de gravidez. Se ha sugerido que los factores genéticos tales como polimorfismos de genes del sistema Renina-Angiotensina pueden desempeñar un papel importante en la regulación de la presión arterial en preeclampsia. En este trabajo se analizó la frecuencia de los polimorfismos ACE I/D y AGT M235T en poblaciones abiertas maya y mestiza. Así mismo se determinó si los polimorfismos ACE I/D, y AGT M235T son un factor de riesgo de preeclampsia en mujeres indígenas mayas embarazadas. El análisis del polimorfismo ACE I/D se realizó mediante PCR directo el cual nos permitió discernir entre el alelo de inserción de 597pb y de la delección de 319pb. El polimorfismo AGT M235T se analizó por discriminación alélica por PCR Tiempo Real utilizando sondas específicas para cada alelo marcadas con fluorocromos distintos. Las distribuciones genotípicas y alélicas se compararon por  $X^2$  y se probó el equilibrio de Hardy –Weinberg por análisis de  $X^2$  para las frecuencias de los genotipos ACE y AGT. Al analizar la frecuencia del polimorfismo ACE I/D en población abierta se observó un incremento en el alelo de inserción en la población maya respecto a la población mestiza. En relación con trabajos en que se han reportado estudios similares en diferentes poblaciones, las frecuencias alélicas y la distribución genotípica del polimorfismo ACE I/D que se reportan en este estudio, tanto en población mestiza como en población maya difieren de los presentados en los estudios realizados en poblaciones sanas: caucásica, china, polinesa y turca. Respecto a la frecuencia del alelo M235T del AGT en población abierta maya y mestiza no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas mientras que en las frecuencias genotípicas se observó una disminución de individuos homocigotos para el alelo MM en población maya respecto a la población mestiza. En relación con estudios similares

reportados en distintas poblaciones, las frecuencias alélicas y la distribución genotípica del polimorfismo M235T del AGT que se reportan en este estudio tanto en población mestiza como maya difieren de los presentados en los estudios realizados en poblaciones sanas caucásica, china y turca. En el presente estudio el alelo de Inserción de la Enzima Convertidora de Angiotensina se encontró asociado con el desarrollo de preeclampsia esto contrasta con lo reportado en población china, italiana y coreana donde el alelo de la delección se ha encontrado asociado a preeclampsia. En nuestros resultados, el alelo M235 del gen del Angiotensinógeno se encontró incrementado en las mujeres con preeclampsia mostrando diferencias significativas, sin embargo las frecuencias alélicas no muestran diferencias significativas.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 PREECLAMPSIA

La preeclampsia es considerada uno de los desórdenes más serios del embarazo, constituye una enfermedad sistémica con repercusión en múltiples órganos maternos, afectando el sistema cardiovascular, renal, hematológico y hepático; además de comprometer el flujo sanguíneo uteroplacentario (Sibai, 1996). Afecta al 4-5% de las mujeres en estado de gravidez a nivel mundial. Dicho síndrome representa la principal causa de morbilidad y mortalidad materna, fetal y neonatal.

En México, también es la complicación más frecuente del embarazo, la incidencia es de 47.3 por cada 1 000 nacimientos y es además, la primera causa de ingreso de pacientes embarazadas a las unidades de terapia intensiva (debido a hemorragia masiva, para recibir soporte hemodinámico) (Estrada *et al.*, 2002), según la Secretaría de Salud (2001) la mortalidad por complicaciones del embarazo ocupa el 15° lugar en la mortalidad hospitalaria en general. Además, la tasa de preeclampsia se ha incrementado 40% en el periodo entre 1990 y 1999 (Roberts *et al.*, 2003) y constituye hasta 40% de los partos prematuros iatrogénicos (Haddad, 2002).

Dentro de las características clínicas de la enfermedad se incluyen hipertensión y proteinuria, las que se revierten al momento del nacimiento (Roberts y Cooper, 2001). Por tal motivo, la preeclampsia se define por la presencia de una presión arterial diastólica de  $\geq 90$  mmHg y la sistólica de  $\geq 140$  mmHg, acompañada de proteinuria considerada como una excreción  $\geq 0.3$ g de proteínas en 24 horas, el equivalente a un valor  $\geq 30$ mg/dl ( $\geq 1+$  por tira reactiva) en una muestra al azar, pudiendo presentarse

además edema generalizado (National High Blood Pressure Education Working Group de 2000).

La hipertensión que sobreviene en la preeclampsia es causada por un aumento de la resistencia vascular periférica. El gasto cardiaco suele ser menor que en el embarazo sin hipertensión. El flujo renal y la tasa de filtración glomerular (GFR) descienden en la preeclampsia de un 62-84%. Una reducción de la GFR del 50% duplica la creatinina sérica. Un aumento de la creatinina sérica del 0.5-1 mg/dl o del nitrógeno ureico sérico (BUN) de 8-16 mg/dl representa una disminución de la GFR del 50%. El ácido úrico aumenta antes que haya una elevación medida de la creatinina o BUN. Como en la preeclampsia no hay aumento de la producción de ácido úrico la hiperuricemia indica una disminución de la depuración renal. La hiperuricemia (>5.5 mg/dl) es un marcador para diferenciar la preeclampsia de todas las demás causas de hipertensión durante el embarazo. Hay aumento súbito de peso con edema, sobre todo en cara y manos.

El aumento de la permeabilidad vascular a las proteínas podría ser secundario a la lesión de las células endoteliales de causa indeterminada. En la preeclampsia hay disfunción generalizada de las células endoteliales con caída en la síntesis de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), aumento de fibronectina celular plasmática y activación del factor de Von Willebrand. La sobreproducción de endotelina (vasoconstrictor y agregante plaquetario) ha sido considerada un posible factor en la preeclampsia. Los lípidos peroxidados circulantes inhiben selectivamente la enzima prostaglandina sintasa, desviando la vía de la ciclooxigenasa hacia la síntesis de tromboxano A<sub>2</sub>, un vasoconstrictor y agregante plaquetario (Pridjian y Puschett, parte II, 2002) (Haddad, 2002).

Respecto a la glucemia, la hiperglucemia reduce la síntesis de PGI<sub>2</sub> por las células endoteliales; la preeclampsia aumenta el antagonismo a la insulina observado en el embarazo normal. En la preeclampsia hay hiperlipidemia en niveles más altos respecto a las embarazadas normotensas, además en la preeclampsia severa la vitamina E está disminuida.

En la preeclampsia hay espasmo arterial en muchos tejidos, especialmente en riñones, cerebro e hígado.

El primer registro de la enfermedad se obtuvo de un papiro egipcio de hace 3000 años (Roberts y Cooper, 2001). Por medio de la compilación de estudios realizados en distintos países (Chelsey, 1978) se puso de manifiesto que la preeclampsia puede ocurrir en diversas condiciones ambientales. Esto llevó a postular que estos padecimientos no pueden ser ocasionados únicamente por factores ambientales, sino que también existen factores genéticos predisponentes.

### 1.1.1 FACTORES DE RIESGO

Preconcepcionales y/o Enfermedades Crónicas

-Factores relacionados con el cónyuge

Nuliparidad, cambio de pareja (primipaternidad) (Wilson *et al.*, 2003; Dekker, 1999), inseminación artificial, donación de ovocito, anticoncepción con métodos de barrera (protección), cónyuge que haya sido padre de un embarazo con preeclampsia con otra mujer (Dekker, 1999; Esplin *et al.*, 2001), cónyuge hijo de madre con preeclampsia (Roberts *et al.*, 2003; Esplin *et al.*, 2001).

- Factores no relacionados con el cónyuge

Historia previa de preeclampsia (Roberts *et al.*, 2003; Esplin *et al.*, 2001); edad materna (menores de 15 años, mayores de 40 años; el riesgo de preeclampsia en un segundo embarazo aumenta 1.3 veces por cada 5 años que aumenta la edad materna); intervalo entre embarazos, el riesgo aumenta 1.5 veces por cada 5 años de intervalo entre embarazos (Dekker, 1999; Skjærven *et al.*, 2002). Embarazos gemelares, anomalías congénitas estructurales, Hydrops fetalis, anomalías cromosómicas (trismomía 13, triploidía), Mola hidatidiforme, infección de vías urinarias (Dekker, 1999; Haddad, 2002).

-Presencia de enfermedades subyacentes

Hipertensión crónica, enfermedad renal, obesidad, resistencia a la insulina, bajo peso al nacer, diabetes gestacional, diabetes mellitus tipo 1, resistencia a la proteína C activada, deficiencia de proteína S, anticuerpos antifosfolípido, esferocitosis (Dekker, 1999; Pridjian y Puschett, parte I, 2002).

-Factores exógenos

Fumar (disminuye el riesgo), estrés (incluido laboral), exposición in utero a dietilestilbestrol (Dekker, 1999; Haddad, 2002).

-Historia familiar

-La incidencia de preeclampsia es más común en hermanas (36%) e hijas (26%) de mujeres preeclámpticas (Chesley y Cooper, 1986).

## 1.1.2 ETIOPATOGENIA DE LA PREECLAMPSIA

### 1.1.2.1 PATOLOGÍA

Dentro de la patología de la preeclampsia se ha propuesto el modelo de dos etapas: alteración de perfusión placentaria [etapa 1], y disfunción endotelial o síndrome materno [etapa 2] (Haddad, 2002; Roberts *et al.*, 2003).

La disfunción endotelial ha sido identificada como la vía final en la patogénesis de la preeclampsia (Myers y Baker 2002; Wilson *et al.*, 2003; Dekker, 1999), pero no parece ser causada por la hipertensión (Roberts *et al.*, 2003), sino por daño tóxico. La invasión deficiente del trofoblasto hacia las arterias espirales es responsable de la mal adaptada circulación útero/placentaria (Myers y Baker 2002; Wilson *et al.*, 2003; Pridjian y Puschett, parte II, 2002; Haddad, 2002; Roberts *et al.*, 2003)

La invasión del trofoblasto y la subsecuente remodelación de las arterias espirales resultan en diámetros de las arterias espirales de sólo 40% respecto a los hallados en embarazos normales (Wilson *et al.*, 2003; Pridjian y Puschett, parte II, 2002), normalmente, las arterias espirales son remodeladas por el trofoblasto mediante invasión de sus paredes causando pérdida de la capa muscular y la lámina elástica interna (Haddad, 2002; Roberts *et al.*, 2003) (estas y otras anormalidades de la placentación parecen ser características derivadas de genes paternos) (Wilson *et al.*, 2003; Pridjian y Puschett, parte II, 2002; Esplin *et al.*, 2001). Esto convierte al sistema placentario normal de alto flujo y baja resistencia en un sistema de bajo flujo y alta

resistencia que resulta en isquemia placentaria, que se cree es el desencadenante de este cuadro clínico, a través de sustancias liberadas por el útero o la placenta isquémica que afecta la función endotelial, ya sea por liberación de sustancias vasoconstrictoras o inhibición de las influencias vasodilatadoras (Haddad, 2002; Cotran y Collins, 2000). Las células endoteliales activadas o dañadas por radicales libres de oxígeno, peroxidación de lípidos, quimiotaxis de células inflamatorias y agentes vasopresores (desequilibrio prostaciclina/tromboxano  $A_2$ ) causa vasoconstricción y promueve la trombosis y fibrosis, la coagulación vascular diseminada, la hipertensión y la lesión de múltiples órganos (Cotran y Collins, 2000). El estrés oxidativo se ha propuesto como la liga entre las dos etapas del modelo de dos etapas de la preeclampsia.

Se ha demostrado que más de 160 sustancias aumentan durante la preeclampsia (Myers y Baker 2002), se han estudiado virtualmente todas las sustancias que tienen relación con la función endotelial y vascular (Pridjian y Puschett, parte II, 2002), las más estudiadas son la leptina, P-selectina, factor activador de plaquetas, angiotensinógeno, angiotensina II, óxido nítrico, endotelinas, prostaglandinas, péptido atrial natriurético, factor V de Leiden, metilentetrahidrofolato reductasa y epóxido hidroxilasa (Wilson *et al.*, 2003; Pridjian y Puschett, parte II, 2002). La neurocinina B, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), productos de peroxidación de lípidos y membranas de sincitiotrofoblastos también están muy aumentadas. La neurocinina B expresada por la placenta es un potente vasoconstrictor venoso, cuya expresión está destinada a incrementar el flujo sanguíneo hacia la placenta. El VEGF aumenta su expresión en la placenta en condiciones de hipoxia.

### 1.1.2.2 ETIOLOGÍA

Hay cuatro factores etiológicos principales (hipótesis etiopatogénicas): 1) maladaptación inmunológica, (Myers y Baker 2002; Wilson *et al.*, 2003) 2) isquemia placentaria (Myers y Baker 2002; Wilson *et al.*, 2003; Burrow *et al.*, 1996), 3) estrés oxidativo (Wilson *et al.*, 2003) y 4) susceptibilidad genética (Myers y Baker 2002; Wilson *et al.*, 2003; Dekker, 1999).

#### **Mala adaptación inmunológica**

Se han reportado fenómenos inmunológicos que ocurren en la preeclampsia como son: anticuerpos contra células endoteliales, aumento de complejos inmunes circulantes, activación del complemento, depósito de complejos inmunes y complemento en arterias espirales, placenta, hígado, riñón y piel.

Se ha postulado que la actividad de las células inmunes de la decidua puede liberar mediadores que actúan sobre las células endoteliales como el TNF $\alpha$  e IL-1 (Wilson *et al.*, 2003; Pridjian y Puschett, parte II, 2002).

Asociación de la preeclampsia con moléculas HLA específicas: HLA-G (expresada sólo en trofoblasto) (Wilson *et al.*, 2003; Pridjian y Puschett, parte I, 2002). HLA-DR4 y HLA-A23/29, B44 y DR7 (Wilson *et al.*, 2003).

#### **Isquemia placentaria**

La isquemia placentaria se debe a la falta de relajación (dilatación) de las arterias espirales. La exportación incrementada de membranas de microvellosidades del sincitiotrofoblasto (STBM) en mujeres preeclámplicas daña al endotelio e inhibe su

proliferación. (Wilson et. al., 2003) La isquemia placentaria además causa un estrés oxidativo importante sobre el endotelio vascular.

Los argumentos que apoyan la placentación anormal y la consecuente isquemia como el evento desencadenante de la preeclampsia son (Myers y Baker 2002; Wilson *et al.*, 2003; Pridjian y Puschett, parte II, 2002):

La hipertensión en el embarazo es más común en pacientes con gestaciones múltiples (es decir, múltiples placentas).

Ocurre durante embarazos molares (trofoblasto excesivo) y es aliviado con la expulsión de la placenta.

Ocurre en pacientes con embarazo abdominal, lo que excluye la importancia de factores deciduales.

La placentación anormal debida a fallo del trofoblasto también tiene una gran implicación, incluidas mutaciones específicas, como en los genes que codifican para metaloproteinasas que degradan matriz extracelular (Myers y Baker 2002; Wilson *et al.*, 2003; Dekker, 1999). Se cree que el origen de la preeclampsia podría ser la placentación anormal, que llevaría a isquemia placentaria y, posteriormente, a daño endotelial.

El factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-2) es un homólogo de la insulina con acción mitógena, está presente en altos niveles en el citotrofoblasto invasor pero está ausente en el sincitiotrofoblasto. Por mecanismo de impronta genómica, el IGF-2 es expresado solamente por el alelo paterno en muchos tejidos adultos y fetales, incluidos la placenta. En modelos fetales de ratón la inactivación de la copia paterna del gen para IGF-2 resulta en restricción severa del crecimiento, hipótesis que sustenta el papel de este factor de crecimiento en la placentación (Dekker, 1999).

## **Estrés oxidativo**

Hay muchas sustancias y mediadores capaces de generar radicales libres de oxígeno y otras sustancias capaces de dañar al endotelio. En la preeclampsia hay una fuerte interacción entre agentes oxidantes aunada a deficiencia de alguno de los mecanismos encargados de hacer frente a este estrés. Hay alteraciones en enzimas como la superóxido dismutasa, óxido nítrico sintetasa, homocisteína, alteraciones que condicionan hiperhomocisteinemia (mutación en 5, 10-metilentetrahidrofolato reducatasa, cistation  $\beta$ -sintasa etc.), epóxido hidroxilasa, etc. La homocisteína elevada causa generación excesiva de peróxido de hidrógeno, inhibe la detoxificación mediada por óxido nítrico, mantiene la actividad del factor V, incrementa la activación de protrombina e inhibe la expresión de trombomodulina (Dekker, 1999). Todo esto, aunado a anomalías en la expresión del Factor V de Leiden y el daño endotelial son factores protrombóticos que acentúan el daño tisular. Además, la dislipidemia marcada durante la preeclampsia debido también a alteraciones genéticas, a la disminución de la capacidad de la albúmina para prevenir la toxicidad por ácidos grasos libres y copar radicales libres; aunado a daño tisular llevan a la acumulación de LDL en el subendotelio.

## **Genética**

Hay descritas múltiples alteraciones genéticas que se han tratado de ligar a la presencia de preeclampsia, están involucrados al menos 26 genes diferentes, pero la gran mayoría de los datos obtenidos hasta el momento no son concluyentes. Están involucrados tanto

genes maternos como fetales (paternos) (Myers y Baker 2002; Wilson *et al.*, 2003; Pridjian y Puschett, parte I y II, 2002; Esplin *et al.*, 2001; Roberts *et al.*, 2003). Los genes que participan en la preeclampsia pueden ser agrupados de acuerdo al papel que juegan en la etiología de la preeclampsia de acuerdo a las hipótesis mencionadas; se pueden clasificar en aquellos que regulan la placentación, reguladores de la presión arterial, genes involucrados en la isquemia placentaria y genes que intervienen en el daño/remodelación del endotelio vascular. Las más importantes alteraciones y mejor definidas son las mutaciones en el factor V de Leiden, en la metilentetrahidrofolato reductasa, genes del angiotensinógeno (alelo T235) y mutaciones relacionadas con el TNF $\alpha$  (Myers y Baker 2002; Wilson *et al.*, 2003; Dekker, 1999).

El modelo más sencillo de herencia que explica mejor la frecuencia de la preeclampsia en poblaciones de bajo riesgo (3-6%) es la presencia de homocigotidad tanto en la madre como en el feto para un mismo gen recesivo (Pridjian y Puschett, parte II, 2002; Dekker, 1999). También es muy probable la teoría de impronta genómica como la explicación sobre el modo de herencia de la preeclampsia (Pridjian y Puschett, parte II, 2002). Además, se ha demostrado que mutaciones específicas en el factor V de Leiden y de la cadena larga de la enzima 3-hidroxiacil-coenzima A (LCHAD, deficiencia de) se asocian con riesgo elevado de síndrome de HELLP (Wilson *et al.*, 2003; Pridjian y Puschett, parte II, 2002).

### **Otros aspectos etiopatogénicos**

El aumento de la resistencia vascular periférica y elevación de la presión arterial pueden deberse a un desequilibrio en la síntesis de prostaglandinas de acción contrapuesta. En

la preeclampsia hay caída de los metabolitos urinarios de la PGI<sub>2</sub> con aumento de la excreción urinaria de metabolitos del tromboxano.

Con el inicio de la preeclampsia desaparecen la insensibilidad a la angiotensina y la noradrenalina durante el embarazo. También se ha demostrado una menor síntesis de PGI<sub>2</sub> que precede la aparición de hipertensión y coincide con el aumento de sensibilidad a la angiotensina II. La menor síntesis de PGI<sub>2</sub> podría provocar caída en la producción de renina y aldosterona.

En el embarazo hay compresión de la vena cava inferior con reducción del volumen minuto cardíaco durante el decúbito dorsal, la consiguiente caída del flujo sanguíneo renal aumenta la secreción de renina y sirve como prueba endógena de sensibilidad a la angiotensina.

La preeclampsia se asocia a depósitos de fibrina en el riñón y el hígado, la trombocitopenia con anemia hemolítica microangiopática y, en la preeclampsia fulminante, con coagulopatía por consumo, la coagulación intravascular diseminada desempeña un papel importante en esta entidad. Estas alteraciones están determinadas por la disfunción celular endotelial (Pridjian y Puschett, parte I, 2002). Una disminución en la síntesis de PGI<sub>2</sub> en las células endoteliales sin reducción concomitante de la síntesis de tromboxano en las plaquetas podría predisponer a la agregación plaquetaria generalizada y a la coagulación intravascular.

## 1.2 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

El sistema Renina-Angiotensina (RA) (fig.1) ha sido sugerido para desempeñar un papel en la fisiopatología de la preeclampsia. Los datos que apoyan esto incluyen 1)

niveles más bajos de todos los componentes circulantes del sistema RA, y la activación de los componentes celulares y del tejido del sistema RA al mismo tiempo, y 2) hipertensión asociada a embarazo debido a la sensibilidad aumentada de los receptores de angiotensina II (AII) en una amplia variedad de tejidos (Roberts y Cooper, 2001; Roberts y Lain, 2002)

Se ha sugerido que los factores genéticos tales como polimorfismos de genes del sistema RA pueden desempeñar un papel importante en la regulación de la presión arterial en preeclampsia (Chou *et al.*, 2004).

### 1.3 ANGIOTENSINÓGENO

El angiotensinógeno (ASIfa 2 globulina) es una glicoproteína que contiene en su extremo amino el decapeptido angiotensina I, es producido en el hígado, es el precursor de la hormona vasoactiva angiotensina II, la cual juega un papel muy importante en la regulación de la presión sanguínea, del volumen de los fluidos corporales y en la remodelación vascular (Campbell, 1987; Powell *et al.*, 1989) (fig. 1).

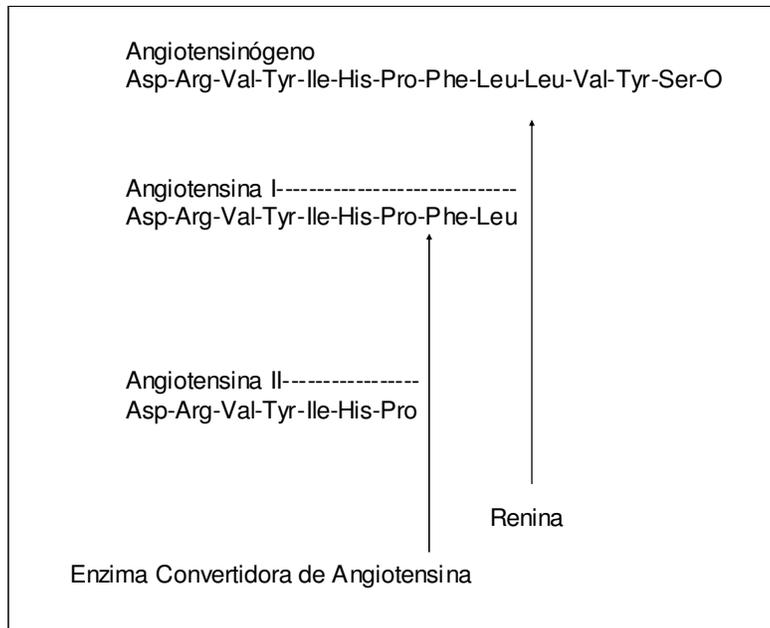


Figura 1. Sistema renina-angiotensina. En el camino clásico del sistema renina angiotensina, la renina es secretada por el aparato yuxtaglomerular del riñón y funciona transformando el sustrato de la renina (angiotensinógeno) en angiotensina I. La renina rompe la unión leucil-leucil y provoca la liberación de un decapeptido denominado angiotensina I (AI). Está demostrado que la angiotensina I es básicamente inactiva y que su actividad biológica es el resultado de su conversión en angiotensina II (AII) por la Enzima Convertidora de Angiotensina, que es el presor más potente elaborado en el organismo.

Comentario [I1]:

### 1.3.1 POLIMORFISMO M235T DEL GEN DEL ANGIOTENSINÓGENO Y SU ASOCIACIÓN CON PREECLAMPSIA

El gen de angiotensinógeno de humano consta de 5 exones y 4 intrones, mide aproximadamente 12 kb y se encuentra en el cromosoma 1q 42.3. En el gen del

angiotensinógeno (AGT), se conocen muchas variantes pero fundamentalmente dos han sido asociadas a hipertensión arterial, aquellas que presentan metionina o treonina (M/T) en los codones 174 ó 235 (Staessen *et al.*, 1999). El polimorfismo M235T se trata de un cambio 704 T/C en el exón 2 (Brand *et al.*, 2002) (fig.2). Se ha demostrado que el alelo T de este polimorfismo se asocia a mayores niveles circulantes de angiotensinógeno (Staessen *et al.*, 1999). Los incrementos de los niveles plasmáticos de angiotensinógeno, el sustrato proteínico sobre el que actúa la renina para generar angiotensina I han sido reportados en sujetos hipertensos y en niños de familiares hipertensos (Gareth *et al.*, 2001).

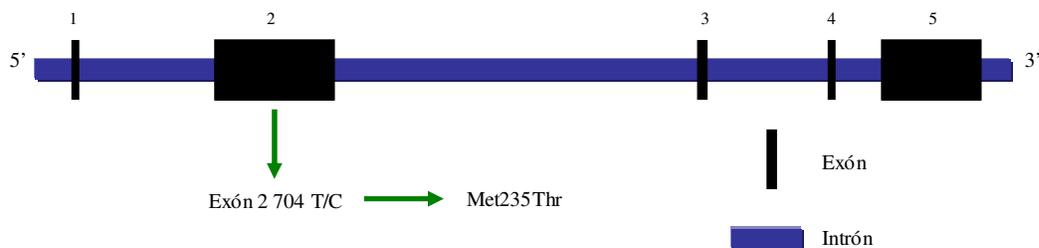


Figura 2. Estructura del gen AGT humano. En la figura se muestra el gen del AGT que contiene 5 exones, el polimorfismo Met235Thr es causado por una sustitución T/C en la base 704 en el exón 2 del gen.

Varios estudios han descrito la existencia de asociación entre polimorfismos del AGT y preeclampsia, con resultados contradictorios. En uno de ellos se encontró que hay asociación principalmente entre PE y la variante (M235T), donde se produce la sustitución de una metionina por una treonina en la posición 235 y que inicialmente se asoció con hipertensión (Ward, 1993). En otro estudio realizado en pacientes caucásicas, el 20% de las mujeres con el polimorfismo (M235T) desarrollaron PE,

comparado con menos del 1% en pacientes que presentaban el genotipo normal o “protector” (Arngrimsson *et al.*, 1993), este trabajo fue replicado en población japonesa (Kobashi, 1995) confirmando la asociación entre el polimorfismo M235T y preeclampsia. En concordancia con estos hallazgos, un trabajo reciente concluyó que el ser portador homocigoto para esta variante es un potente factor de riesgo independiente para preeclampsia, (Kobashi, 2001). Sin embargo, otros estudios realizados en población china y australiana, (Guo 1997), japonesa (Suzuki, 1999) e hispánica (Morgan, 1995) no han reportado asociación con ninguna variante de este gen. Bashford *et al.*, (2001) determinaron que el polimorfismo del exon 2 del AGT no se encontraba asociado con el desarrollo de preeclampsia.

#### 1.4 ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA

La Enzima Convertidora de Angiotensina (ACE) actúa en dos importantes sistemas reguladores cardiovasculares: el sistema renina-angiotensina y el sistema calicerina-cinina que intervienen en la homeostasis vascular (Rigat *et al.*, 1990). Tiene como principales funciones convertir la angiotensina I en el péptido vasoactivo angiotensina II, a la vez que convierte a la bradicinina en fragmentos inactivos (Berglund, 1998) (Fig.1). La bradicinina tiene múltiples acciones benéficas dependientes de su interacción con un receptor membranal específico (receptor BK), que estimula la liberación de óxido nítrico, junto con la prostaciclina. Ambos agentes humorales son vasodilatadores antiagregantes plaquetarios y antiproliferativos (Sun *et al.*, 1995). La angiotensina I y la bradiquinina forman parte del sistema renina-angiotensina-aldosterona, el cual es estimulado cuando el riñón detecta una disminución del flujo sanguíneo. ACE se

encuentra como una enzima unida a membrana en células endoteliales y diferentes tipos de células epiteliales y neuroepiteliales, así como en forma circulante en fluidos biológicos como plasma y líquidos amnióticos o seminales.

#### 1.4.1 POLIMORFISMO I/D DEL GEN DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA Y SU ASOCIACIÓN CON PREECLAMPSIA

El gen que codifica a ACE tiene 21 Kb, contiene 26 exones, está localizado en el brazo largo del cromosoma 17 (17q23) y codifica para las dos formas enzimáticas, la unida a membrana y la circulante. La forma unida a membrana (de mayor tamaño) se expresa en células endoteliales y en el borde en cepillo de células epiteliales, mientras que la forma circulante se expresa sólo en células germinales. Se ha identificado un polimorfismo de inserción/delección (I/D) de un fragmento de 287 pb que contiene una secuencia de repeticiones *Alu* en el intrón 16 del gen que codifica a ACE (fig. 3).

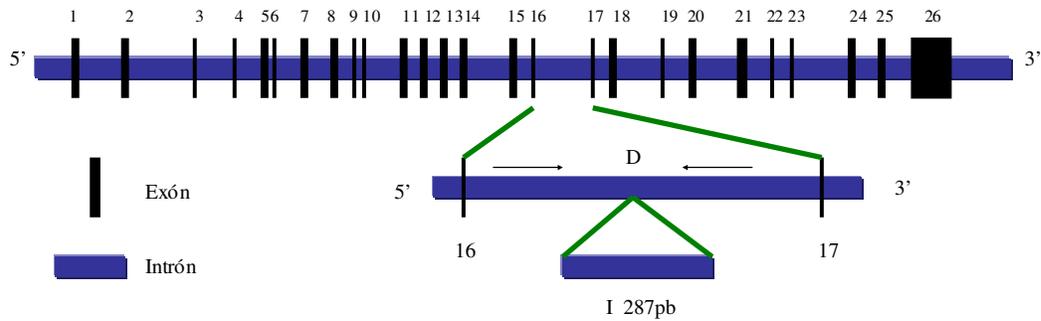


Figura 3. Estructura del gen ACE humano. En la figura se muestra el gen de la ACE el cual contiene 26 exones, la posición del polimorfismo ACE I/D se encuentra en el intrón 16 del gen ACE, se trata de una inserción/deleción de 287pb.

Los niveles de ACE en plasma permanecen estables en un individuo, pero se observan amplias variaciones entre diferentes sujetos (Rigat *et al.*, 1990). El alelo de deleción para ACE está asociado con mayores niveles de ACE circulante (Rigat *et al.*, 1990; Nakai *et al.*, 1994), es significativamente más frecuente en pacientes con infarto al miocardio (Cambien, 1992), en los que tienen historia parental de infarto al miocardio (Tiret, 1993), en pacientes con cardiomiopatías (Raynolds *et al.*, 1993), está asociado con un elevado riesgo de hipertrofia ventricular izquierda (Schunkert *et al.*, 1994), con enfermedad de arterias coronarias en algunas poblaciones y con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Van Suylen y col, 1999.)

Con respecto a la asociación de ACE con preeclampsia, Rasmussen *et al.*, (1983), encontraron que las actividades de ACE en suero eran más bajas en pacientes con preeclampsia que en mujeres con embarazo normal. Otros estudios muestran que una inserción en el intrón 16 fue mas frecuente en mujeres chinas, italianas y coreanas con la enfermedad (Zhou *et al.*, 1999; Mello *et al.*, 2003; Chou *et al.*, 2004). Sin embargo,

este polimorfismo no se asoció con el riesgo de sufrir preeclampsia en mujeres finlandesas (Heiskanen *et al.*, 1999).

El equilibrio de Hardy-Weinberg es un modelo teórico para genética de poblaciones. El modelo de Hardy-Weinberg se utiliza para calcular las frecuencias genotípicas a partir de las frecuencias alélicas. Siendo las frecuencias alélicas iguales para ambos sexos. Estas frecuencias se mantienen constantes de generación en generación. El equilibrio de Hardy-Weinberg, es también conocido como equilibrio panmítico, fue estudiado a principios del siglo 20 por diferentes autores, pero fueron Hardy, un matemático y Weinberg, un físico quienes lo establecieron. El concepto de equilibrio en el modelo de Hardy-Weinberg se basa en las siguientes hipótesis:

1. La población es panmítica (todos los individuos tienen la misma probabilidad de aparearse y el apareamiento es al azar, (panmixia).
2. La población es suficientemente grande (para minimizar las diferencias existentes entre los individuos).
3. La población no está sometida a migración, mutación o selección (no hay pérdida ni ganancia de alelos).
4. Las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de generación en generación.

Bajo estas circunstancias las poblaciones genéticas se mantienen en equilibrio.

En una población con un número infinito de individuos (por ejemplo una población suficientemente grande), panmítica (sus habitantes eligen pareja al azar) y en la que no hay ni mutación ni selección, las frecuencias genotípicas pueden calcularse a partir de las frecuencias alélicas (Kalmes y Huret, 2002).

Hay varias maneras de determinar si una población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg para un determinado locus, sin embargo, cuando se dispone de una única muestra de una población, que representa una única generación se pueden comparar las frecuencias genotípicas observadas, con las frecuencias genotípicas esperadas (las frecuencias genotípicas esperadas  $p^2 + 2pq + q^2$  se obtienen a partir de las frecuencias alélicas denominadas  $p$  y  $q$ ) utilizando la prueba estadística de  $X^2$ . El resultado de la prueba nos indica si las diferencias que se observan entre frecuencias observadas y esperadas son tan pequeñas que se pueden atribuir al azar, o lo suficientemente grandes como para indicar que la población no se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg (Tamarin, 1996).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Existe controversia entre los diferentes estudios realizados, entre las explicaciones posibles a esa falta de consenso están; la heterogeneidad fenotípica propia de las enfermedades multifactoriales, en las que los factores fisiológicos, patológicos, genéticos y ambientales están comprometidos. Las diferencias étnicas contribuyen probablemente a las frecuencias variables de los genes del sistema RA, que pueden manifestarse como diferencias en la incidencia de estos desórdenes en los grupos de la población (Kim *et al.*, 1997; Johanning *et al.*, 1995), de hecho las características raciales juegan un rol importante por la diferente distribución de los genes de la ACE y el AGT (Wenzel, 1997; Sheu, 1999), debido a ello es importante la realización de estos estudios en diferentes poblaciones.

En México no se han realizado estudios para estos polimorfismos en relación con el desarrollo de preeclampsia.

### **3. OBJETIVOS**

#### ***Objetivo General:***

Analizar los polimorfismos ACE I/D y AGT Met235Thr en población abierta maya y mestiza.

Determinar la asociación de los polimorfismos ACE I/D y AGT Met235Thr con el desarrollo de preeclampsia en pacientes mayas.

#### ***Objetivos Particulares***

Crear un banco de ADN de población abierta maya.

Crear un banco de ADN de población abierta mestiza.

Analizar polimorfismos en los genes que codifican para las proteínas AGT y ACE, en población mexicana maya y mestiza para conocer la frecuencia dentro de ambas poblaciones.

Analizar polimorfismos en los genes que codifican para las proteínas AGT y ACE, en población mexicana maya con y sin preeclampsia para ver su posible asociación con la enfermedad.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de pacientes con preeclampsia, paralelamente, se obtuvieron muestras sanguíneas de embarazadas sin preeclampsia y que no contaran con antecedentes de ésta patología, ambos grupos se tomaron de pacientes que acuden a consulta al Centro de Investigaciones Regionales Hydeyo Noguchi-Universidad Autónoma de Yucatán. Previa autorización por escrito de los mismos, a los cuales se les realizó un estudio antropológico para corroborar su ascendencia maya (Centro de Inv. Regionales Hydeyo Noguchi-Univ. Autónoma de Yucatán). En la tabla 1 se agrupan los datos de los pacientes estudiados comparados con valores normales.

Para el polimorfismo I/D del gen de la ACE se analizaron un total de 63 muestras de pacientes con preeclampsia y 100 controles con embarazo. Para el polimorfismo M/T del gen del AGT se analizaron un total de 56 muestras de pacientes con preeclampsia y 91 controles con embarazo.

Adicionalmente se obtuvieron muestras de sangre periférica de población abierta maya en el Centro de Inv. Regionales Hydeyo Noguchi-Univ. Autónoma de Yucatán, así como mestiza en el Centro Médico Nacional Siglo XXI para comparar las frecuencias de los polimorfismos entre ambas poblaciones.

Para el polimorfismo I/D del gen de la ACE se estudiaron un total de 53 individuos de población abierta maya y 101 de población abierta de mestizos. Para el polimorfismo

M/T del gen del AGT se estudiaron un total de 97 muestras de población abierta maya y 57 de población abierta de mestizos.

#### 4.2 EXTRACCIÓN DE ADN

Las muestras sanguíneas se colectaron en tubos Vacutainer™ K3 EDTA de 5ml para evitar la coagulación. Los tubos con las muestras se centrifugaron a 2500krpm durante 15 minutos, tras lo cual se separó la interfase de leucocitos. Posteriormente, se lisaron los eritrocitos restantes mediante 2-3 lavados con solución RCLB (del inglés: Red Cell Lysis Buffer; TRIS 10 mM pH 7.6, MgCl<sub>2</sub> 5mM y NaCl 10 mM). Una vez limpia la pastilla, las células se homogenizaron con 60 µl de NaCl 5mM. Se agregaron 30 µl de SDS al 10%, mezclando con micropipeta. Tras una incubación durante 5 min a temperatura ambiente, se agregaron 205.3µl de NaCl saturado, incubando nuevamente durante 5 min a temperatura ambiente. Enseguida se centrifugó durante 15 min a 12000 rpm a temperatura ambiente y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo. Para precipitar el ADN, se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente sin movimiento y posteriormente se eliminó el sobrenadante por absorción con una micropipeta. Para eliminar las sales del precipitado, se lavó 2-3 veces con 1 ml de etanol al 75%, centrifugando en cada ocasión durante 5 min a 12 krpm. Finalmente, el ADN se resuspendió con 50 µl de agua desionizada. El ADN obtenido se cuantificó por espectrofotometría midiendo la longitud de onda de 260 y 280. La longitud de onda de 260 se multiplica por el factor 2500 que se obtiene a partir de la multiplicación de la dilución por la constante de la densidad óptica igual a 50ng de ADN, con la relación 260/280 se determinó la pureza de la muestra, sus

condiciones óptimas son de 1.8 a 2.0, los valores inferiores indican contaminación con proteínas mientras que los valores superiores contaminación por ARN. Se corroboró su integridad mediante corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Posteriormente las muestras se llevaron a una concentración de 100ng/ml.

#### 4.3 ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO I/D DEL GEN DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA (ACE)

Para amplificar el fragmento del intrón 16 del gen de la ACE, se utilizaron los oligonucleótidos hace3s 5'-GCCCCTGCAGGTGTCTGCAGCATGT-3' (cadena sentido) y hace3as 5'-GGATGGCTCTCCCCGCCTTGTCTC-3' (cadena antisentido) (Lindpaintnter *et al.*, 1995). La reacción de PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 95°C/5min de desnaturalización inicial, 95°C-30seg / 72°C-60seg durante 30 ciclos, 4°C temperatura de mantenimiento. Los productos de PCR se resolvieron electroforéticamente en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio. En caso de heterocigocidad, se observó la amplificación de un fragmento de 319pb correspondiente al alelo con la delección y un fragmento de 597pb correspondiente al alelo con la inserción. Los casos de homocigocidad, se observó un solo tamaño de fragmento, respectivamente. Para cada ensayo se utilizó como control negativo una reacción sin ADN (Fig.4)

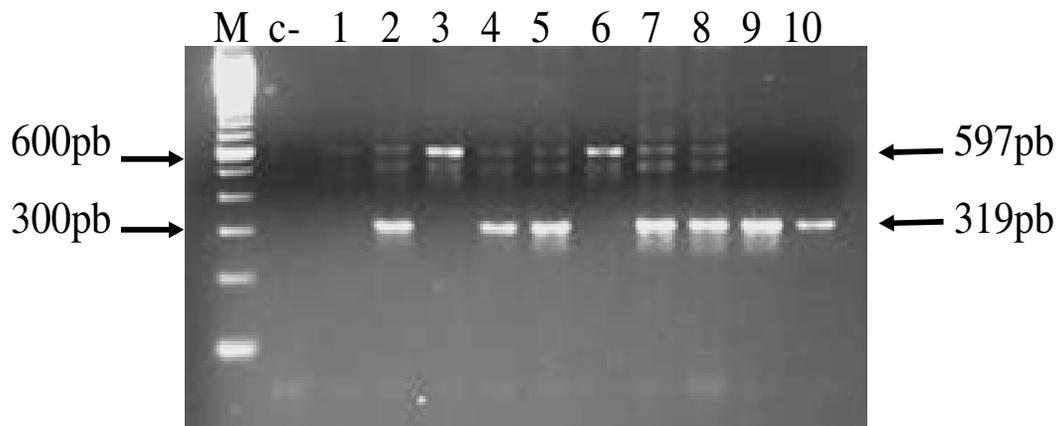


Figura 4. Determinación genotípica del polimorfismo ACE I/D. Electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa (2%). M marcador de peso molecular de 100pb. c- control negativo. Carriles: 2, 4, 5, 7, 8, corresponden a individuos heterocigotos; 3 y 6 corresponden a individuos homocigotos para el alelo I; 9 y 10 corresponden a individuos homocigotos para el alelo D.

#### 4.4 ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO MET235THR DEL GEN DEL ANGIOTENSINÓGENO (AGT)

##### 4.4.1 PCR EN TIEMPO REAL

El análisis del polimorfismo Met235Thr del AGT se llevó a cabo mediante la amplificación por PCR en Tiempo Real (Applied Biosystems, Assay By Design). Para la amplificación del ADN en la región del polimorfismo se utilizaron los oligonucleótidos, sentido 5' GCTGTGACAGGATGGAAGACT 3' y antisentido 5' AGTGGACGTAGGTG TTGAAAGC 3'. La detección de los polimorfismos se realizó por medio de sondas marcadas con distintos fluorocromos (VIC y FAM TaqMan™), para el alelo silvestre la sonda con la secuencia 5' CTGGCTCCCATCAGG 3' marcado con VIC y el alelo mutante la sonda con la secuencia 5' CTGGCTCCCGTCAGG 3' marcado con FAM bajo las siguientes condiciones:

Master Mix <sup>a</sup> (1X)	6.5µl
SNP (sonda) (10X)	1.25µl
ADN (100ng/µl)	30ng
TE <sup>b</sup> (1X)	Llevar a 12.5µl

<sup>a</sup>AmpliTaq Gold DNA Polymerasa, dNTPs con dUTP y buffer con componentes optimizados.

<sup>b</sup>10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0, y agua desionizada.

Condiciones de PCR Tiempo Real:

Desnaturalización inicial	10 min. 95°C	} 40 ciclos
Desnaturalización	15 seg. 92°C	
Alineamiento	60 seg. 60°C	
Extensión	60 seg. 60°C	

En la PCR en tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación (Higuchi *et al.*, 2003). Los termocicladores para llevar a cabo la PCR en tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada muestra amplificada.

El sistema de detección por fluorescencia (sondas TaqMan™) empleado en la PCR en tiempo real son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor (apagador) en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación de ADN diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como donador y aceptor están, ahora, espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (Holland *et al.*, 1991) (Fig. 5).

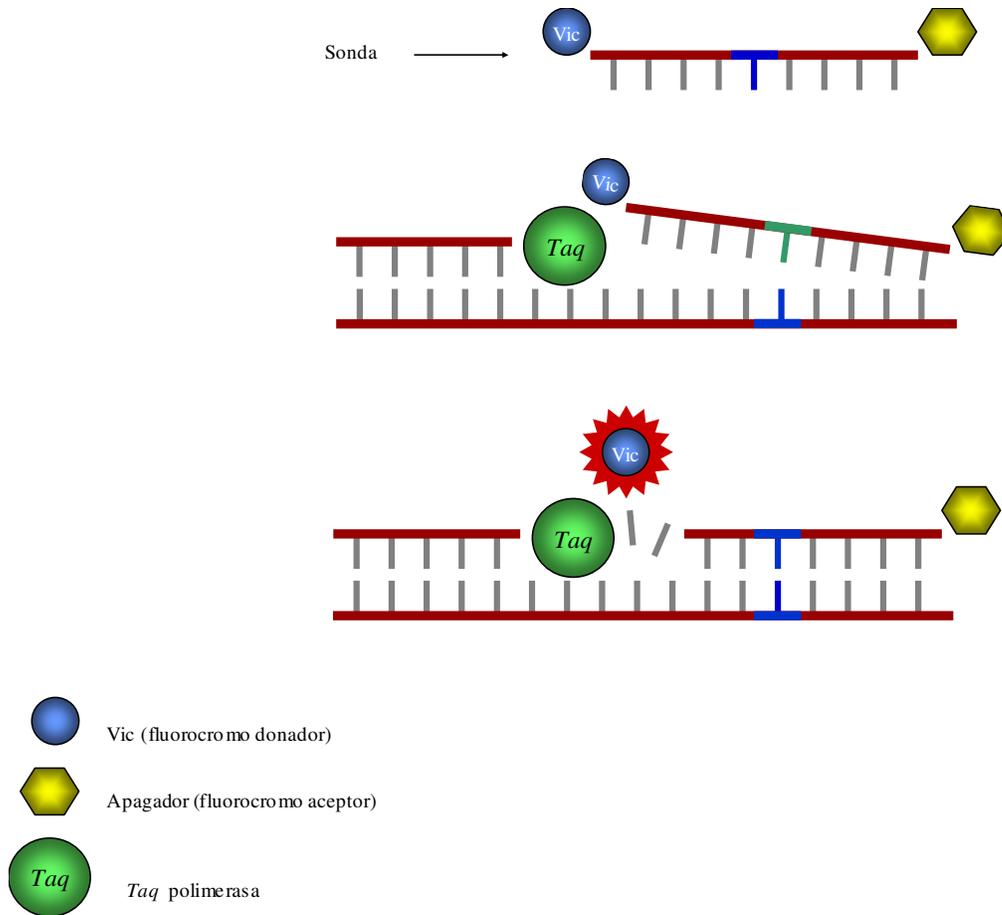


Figura 5. Fundamento de la PCR en Tiempo Real. En la imagen, la sonda tiene unidos un fluorocromo donador y un fluorocromo apagador. Cuando ambos fluorocromos están unidos a la sonda, el donador no emite señal. Pero, cuando la sonda hibrida con la secuencia de interés durante la reacción de PCR, la actividad exonucleasa 3' --> 5' de la Taq polimerasa separa al fluorocromo donador del resto de la sonda, permitiendo la emisión de una señal fluorescente. Se monitorea la señal fluorescente del donador que se va acumulando en sucesivos ciclos de PCR.

#### 4.4.2 DISCRIMINACIÓN ALÉLICA

La discriminación alélica se realizó con el programa ABI Prism 7000 SDS Software, el cual detecta la sonda específica para cada uno de los alelos, y los agrupa indicando si son homocigotos o heterocigotos. En la figura 6 se observa la imagen de discriminación alélica realizada.

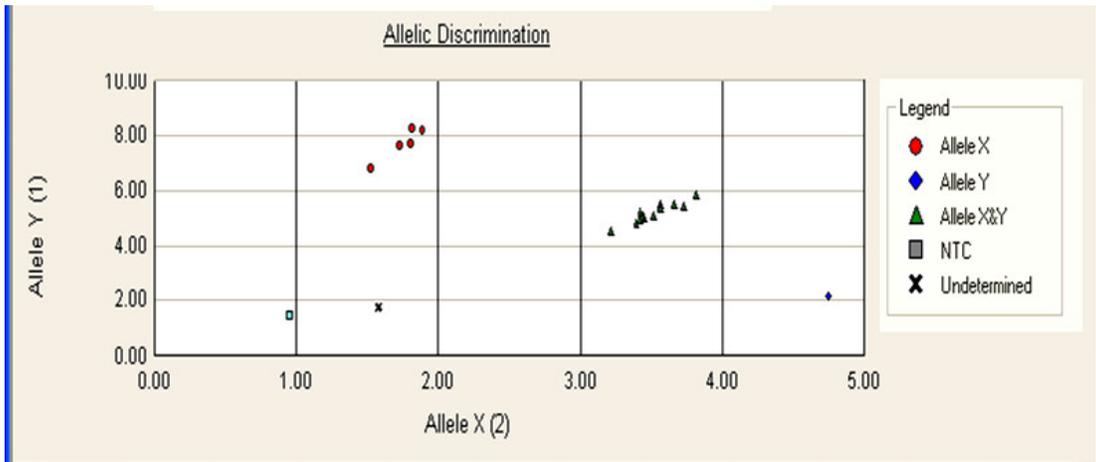


Figura 6. Discriminación alélica. En la imagen se muestra un ensayo de discriminación alélica en el que se observan agrupadas las muestras de acuerdo a la fluorescencia emitida en: homocigotos silvestres (círculos), heterocigotos (triángulos) y homocigotos mutantes (rombos).

#### 4.4.3 SECUENCIACIÓN

Se realizó una secuenciación (Fig. 7) a partir de ADN de dos muestras de individuos homocigotos para cada uno de los alelos para corroborar que el marcaje de los alelos con los distintos fluorocromos fuera el correcto, mediante la reacción en cadena de la polimerasa se amplificó la región en la cual se encuentran dichos polimorfismos bajo las siguientes condiciones:

Buffer (10X)	5 $\mu$ l
dNTP (1X)	1.0 $\mu$ l
Oligo sentido (1X)	2.0 $\mu$ l
Oligo antisentido (1X)	2.0 $\mu$ l
Mg Cl 1mM	6.0 $\mu$ l
Taq	0.4 $\mu$ l
ADN (100 ng/ml)	200ng
H <sub>2</sub> O estéril	Llevar a 50 $\mu$ l

Las condiciones de PCR fueron:

Desnaturalización inicial	5 min. 90°C	
Desnaturalización	30 seg. 95°C	} 30 ciclos
Alineamiento	30 seg. 60°C	
Extensión	30 seg. 72°C	
Extensión final	5 min. 72°C	

El ADN resultado de la amplificación se corrió en un gel de agarosa al 2% donde se cortó el producto de PCR y se colocó en un tubo de 1.5ml, se cubrió con buffer TE 1X

agitándose a temperatura ambiente por 16 hrs. Posteriormente se recuperó el buffer agregándosele 1µl de glicógeno y acetato de sodio para una concentración final de 0.3M mas etanol absoluto (doblando el volumen), se mezcló incubando 15 minutos a 4°C, posteriormente se centrifugó 15 minutos a 1500 rpm desechando el sobrenadante y lavando con 500 µl de etanol al 70%. Por último se centrifugó 15 minutos a 1500rpm desechando nuevamente el sobrenadante, el sedimento se resuspendió con 30ml de agua estéril.

Se amplificó nuevamente bajo las siguientes condiciones:

big dye	4µl
buffer (10X)	2µl
Oligo antisentido	0.32µl
ADN purificado	60ng
H <sub>2</sub> O estéril	Llevar a 30µl

Las condiciones de la PCR fueron:

Desnaturalización inicial	5 min. 90°C	
Desnaturalización	10 seg. 96°C	} 25 ciclos
Alineamiento	5 seg. 60°C	
Extensión	4 seg. 60°C	

Finalmente se pasó por una columna de purificación y se centrifugó a 12.000 rpm durante 2 minutos, se recuperó el eluido que contiene el DNA listo para ser utilizado en reacciones de secuenciación.



## 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos y se compararon las poblaciones mediante el análisis estadístico de  $X^2$  (chi-cuadrada).

El equilibrio de Hardy-Weinberg fue calculado mediante el programa GenePop V 3.4 (<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop/>), el cual calcula las frecuencias esperadas en caso de equilibrio, y las compara con las frecuencias observadas mediante una prueba de  $X^2$ . El resultado de la prueba nos indica si las diferencias que se observan entre frecuencias observadas y esperadas son tan pequeñas que se pueden atribuir al azar, o lo suficientemente grandes como para indicar que la población no se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg.



## 6. RESULTADOS

Se analizó la frecuencia de los alelos del polimorfismo I/D de la ACE a partir de muestras de ADN de 63 pacientes con preeclampsia (Tabla 1) y 100 de controles con embarazo. Para población abierta se analizaron 53 muestras de población maya y 101 muestras de mestizos.

**Tabla 1 Datos de la población con preeclampsia comparados con valores normales.**

	Edad	Tensión arterial (mmHg)		IMC	Proteinuria	Antecedentes de preeclampsia	Preeclampsia previa
		Sistólica	Diastólica				
Grupo problema	22.5 ± 3.8	146.7± 4.38	96.05±3.14	28.07± 3.32	Positivo	5.4%	32%
Valores normales		110	70	22.25	Negativo		

IMC=Índice de masa corporal

A partir de estas muestras de ADN se amplificó un fragmento correspondiente al intrón 16 del gen de la ACE, generando un producto de PCR de 597 pb en caso de la inserción y 319pb para el caso de la delección (Fig. 4).

La distribución del polimorfismo ACE I/D en población abierta Maya fue de 0.6037 para I/I, I/D 0.2830 y 0.1132 para DD, mientras que los alelos mostraron una frecuencia de 74.52% para el alelo I y 25.47% para el alelo D, en la población Mestiza los resultados muestran una distribución de 0.3069 para I/I, I/D 0.6435 y 0.4950 para D/D, con frecuencia alélica de 62.87% para el alelo I y 37.13% para el alelo D (Tabla 2).

La distribución de los genotipos difiere significativamente ( $\chi^2=18.1599777902319$ ; 2 gl  $p\leq 0.001$ ) entre las poblaciones de acuerdo a la prueba de chi-cuadrada. Respecto a las

frecuencias alélicas las poblaciones también difieren significativamente ( $\chi^2=4.26496284101434$ ; 1 gl  $p \leq 0.05$ ).

**Tabla 2. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo ACE I/D en población abierta maya y mestiza.**

Población	II		ID		DD		Total n	I		D		Total n
	n	%	n	%	n	%		n	%	n	%	
<b>Maya</b>	32	(60.37%)	15	(28.30%)	6	(11.32%)	53	79	(74.52%)	27	(25.47%)	106
<b>Mestiza</b>	31	(30.69%)	65	(64.35%)	5	(4.95%)	101	127	(62.87%)	75	(37.13%)	202

**Tabla 3. Comparación de frecuencias del polimorfismo ACE I/D en diferentes poblaciones.**

Población	n	I	D	Referencia
<b>Mestizos</b>	101	0.63 <sup>a</sup>	0.37	Presente estudio
<b>Mayas</b>	53	0.74 <sup>b</sup>	0.26	Presente estudio
<b>Caucásicos</b>	466	0.48	0.52	Rankinen <i>et al.</i> , 2000
<b>Turcos</b>	85	0.39	0.61	Agachan <i>et al.</i> , 2003
<b>Chinos</b>	286	0.45	0.55	Chia <i>et al.</i> , 2003
<b>Polineses</b>	111	0.57	0.43	Zak <i>et al.</i> , 2003

<sup>a</sup> Frecuencia alta comparada con poblaciones caucásica, turca y china ( $p < 0.05$ ).

<sup>b</sup> Frecuencia alta comparada con poblaciones mestiza, caucásica, turca, china y polinesia ( $p < 0.05$ ).

La distribución genotípica del polimorfismo I/D del gen de la ACE fue de 0.390 para I/I, I/D 0.490 y 0.120 para D/D en los controles, con frecuencia alélica de 63.5% para la inserción y 36.5% para la delección, en la población con preeclampsia los resultados

muestran una distribución de 0.603 para I/I, I/D 0.286 y 0.111 para D/D, con frecuencia alélica de 74.6% para la inserción y 25.4% para la delección (Tabla 4).

La distribución de los genotipos difiere significativamente ( $\chi^2=7.66841126852798$ ; 2 gl  $p\leq 0.025$ ) entre las poblaciones de acuerdo a la prueba de chi-cuadrada. Respecto a las frecuencias alélicas las poblaciones también difieren significativamente ( $\chi^2=4.36446391206055$ ; 1 gl  $p\leq 0.05$ ).

**Tabla 4. Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo ACE I/D en relación a controles y pacientes con preeclampsia.**

Población	II		ID		DD		Total	I		D		Total
	n	%	n	%	n	%	n	n	%	n	%	n
<b>Control</b>	39	(39.0)	49	(49)	12	(12)	100	127	(63.5)	73	(36.5)	200
<b>Preeclampsia</b>	38	(60.3)	18	(28.6)	7	(11.1)	63	94	(74.6)	32	(25.4)	126

**Tabla 5 Frecuencia genotípicas polimorfismo ACE I/D en población Maya con y sin preeclampsia comparada con otras poblaciones.**

Población	I	D	Referencia
-----------	---	---	------------

<b>Maya</b>			Presente estudio
Control	0.64	0.36	
<b>Preeclampsia</b>	<b>0.74</b>	<b>0.25</b>	
<b>Coreana</b>			Hyunah <i>et al.</i> , 2003
Control	0.65	0.35	
<b>Preeclampsia</b>	<b>0.45</b>	<b>0.55</b>	
<b>Italiana</b>			Mello <i>et al.</i> , 2003
Control	0.47	0.43	
<b>Preeclampsia</b>	<b>0.27</b>	<b>0.73</b>	

Para el polimorfismo M/T del gen del AGT se analizó la frecuencia de los alelos a partir de de ADN de 56 muestras de pacientes con preeclampsia (Tabla 1) y 91 controles con embarazo. Para población abierta se analizaron 97 muestras de población maya y 57 de mestizos.

A partir de estas muestras de ADN se amplificó la región del polimorfismo. En la figura 6 se observa la amplificación por PCR Tiempo Real de 3 muestras distintas: un individuo homocigoto silvestre (VIC), un homocigoto mutante (FAM) y un heterocigoto (VIC y FAM).

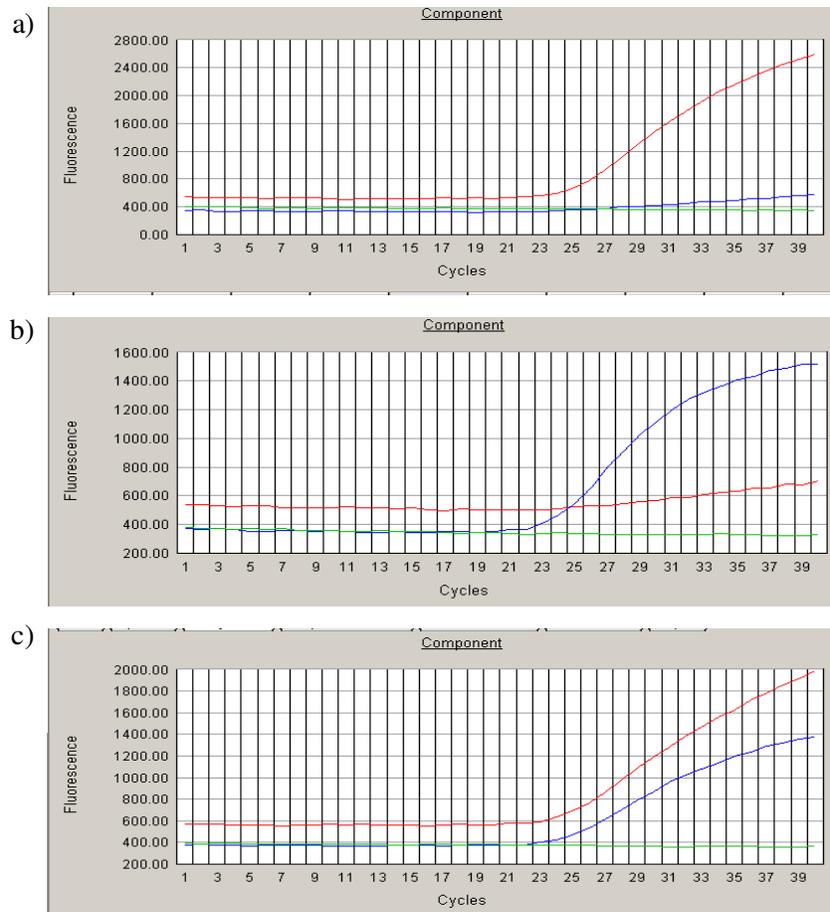


Figura 6. Amplificación por PCR Tiempo Real. En la figura se muestra un ensayo de amplificación por PCR Tiempo Real. a) Curva de amplificación de un homocigoto silvestre que identifica la sonda marcada con FAM (rojo). b) Curva de amplificación de un homocigoto que identifica la sonda marcada con VIC. (azul) c) Curva de amplificación de un heterocigoto donde se marcan ambas sondas Fam y Vic (azul y rojo).

Se corroboró la secuencia de la sonda en la muestra de un individuo homocigoto para el alelo 704C del gen AGT, para verificar la identidad y el marcaje (fig. 7).

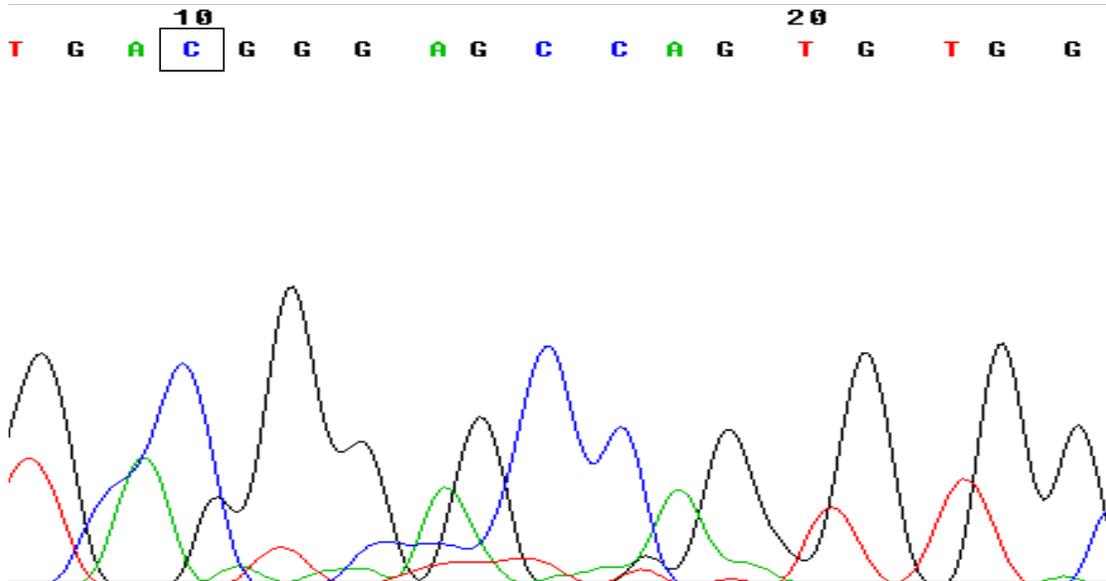


Figura 7. Electroferograma de secuenciación. En la imagen se observa la secuencia de una muestra de individuo homocigoto para el alelo 704C del gen AGT.

La distribución del polimorfismo Met/Thr del gen del AGT en población abierta Maya fue de 0.018 para Met/Met, Met/Thr 0.771 y 0.211 para Thr/Thr en , mientras que los alelos mostraron una frecuencia de 74.52% para el alelo Met y 25.47% para el alelo Thr, en la población Mestiza los resultados muestran una distribución de 0.24 para Met/Met, Met/Thr 0.40 y 0.36 para Thr/Thr, con frecuencia alélica de 62.87% para el alelo Met y 37.13% para el alelo Thr (Tabla 8).

La distribución de los genotipos difiere significativamente ( $\chi^2=22.8769754520172$ ; 2 gl  $p\leq 0.001$ ) entre las poblaciones de acuerdo a la prueba de chi-cuadrada. Mientras que en las frecuencias alélicas las poblaciones no difieren significativamente ( $\chi^2=0.35241721309604$ ; 1 gl  $p\leq 1$ ).

**Tabla 6. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo AGT M235T en población abierta maya y mestiza.**

Población	M		M/T		T		Total n	M		T		Total n
	n	%	n	%	n	%		n	%	n	%	
<b>Maya</b>	1	(1.8%)	44	(77.1%)	12	(21.1%)	57	46	(40.35)	68	(59.65)	114
<b>Mestiza</b>	23	(24%)	39	(40%)	35	(36%)	97	85	(43.81)	109	(56.19)	194

**Tabla 7. Comparación de frecuencias del polimorfismo AGT Met/Thr en diferentes poblaciones.**

Población n	n	M	T	Referencia
<b>Mestiza</b>	97	0.40	0.60	Presente estudio
<b>Maya</b>	57	0.44	0.56	Presente estudio
<b>China</b>	286	0.15	0.85 <sup>a</sup>	Chia <i>et al.</i> , 2003
<b>Turca</b>	74	0.64	0.34 <sup>b</sup>	Agachan <i>et al.</i> , 2003
<b>Alemana</b>	100	0.56	0.44 <sup>b</sup>	Luther <i>et al.</i> , 2003

<sup>a</sup> Frecuencia alta comparada con poblaciones maya y mestiza ( $p < 0.05$ ).

<sup>b</sup> Frecuencia baja comparada con poblaciones maya y mestiza ( $p < 0.05$ ).

La distribución genotípica del polimorfismo Met/Thr del gen del AGT fue de 0.6373 para Met/Met, Met/Thr 0.3076 y 0.5491 para Thr/Thr en los controles, con frecuencia alélica de 79.12% para Met y 36.5% para la Thr, en la población con preeclampsia los resultados muestran una distribución de 0.7140 para Met/Met, Met/Thr 0.2500 y 0.0360 para Thr/Thr, con frecuencia alélica de 83.92% para Met y 16.17% para Thr (Tabla 8).

La distribución de los genotipos difiere significativamente (1.07 vs.

$\chi^2=8.75544575211834$ ; 2 gl  $p \leq 0.025$ ) entre las poblaciones de acuerdo a la prueba de

chi-cuadrada. Sin embargo en las frecuencias alélicas las poblaciones no difieren significativamente ( $\chi^2 = 4.26496284101434$ ; 1 gl  $p \leq 1$ ).

**Tabla 8. Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo AGT Met235Thr en relación a controles y mujeres con preeclampsia.**

Población	Met		Met/Thr		Thr		Total	Met		Thr		Total
	n	%	n	%	n	%		n	%	n	%	
<b>Control</b>	58	(63.73)	28	(30.76)	5	(5.49)	91	144	(79.12)	38	(20.87)	182
<b>Preeclampsia</b>	40	(71.40)	4	(25.00)	2	(3.60)	56	94	(83.92)	18	(16.17)	112

**Tabla 9. Frecuencia genotípicas polimorfismo AGT Met235Thr en población Maya comparada con otras poblaciones.**

Población	Met	Thr	Referencias
<b>Maya</b>			Presente estudio
Control	0.79	0.21	
Preeclampsia	0.84	0.16	
<b>Hispana</b>			Bashford <i>et al.</i> , 2001
Control	0.30	0.70	
Preeclampsia	0.28	0.72	
<b>Estadounidense</b>			Xiu <i>et al.</i> , 2003

Control	0.64	0.36
Preeclampsia	0.68	0.32

**Coreana**

Hyunah *et al.*, et. al. 2003

Control	0.77	0.23
Preeclampsia	0.79	0.21

Todas las frecuencias observadas y esperadas se encontraron en equilibrio de acuerdo a la ley de Hardy-Wienberg, en todas las poblaciones analizadas.

## 7. DISCUSIÓN

La Enzima Convertidora de Angiotensina (ACE) y el Angiotensinógeno (AGT) son componentes clave del sistema Renina Angiotensina, que es un sistema regulador de gran alcance con una influencia importante sobre la presión arterial y el metabolismo de sodio y agua (Choi *et al.*, 2004).

Los niveles del ACE en plasma se han asociado al polimorfismo de inserción/delección (I/D) en el intron 16 del gen de la ACE (Rigat *et al.*, 1990). El polimorfismo I/D de la ACE influye en la variación fenotípica total de ACE en suero, contribuyendo mucho a la variabilidad de los niveles de ACE (Rigat *et al.*, 1990). El genotipo de la DD se asocia a niveles más altos del ACE del tejido y plasma, mientras que el genotipo II se asocia a niveles más bajos y el genotipo de la ID con niveles intermedios. La razón de los niveles más altos de ACE en el alelo de D se ha asumido a que el alelo I tiene una secuencia similar a una secuencia de silenciador (Jackson *et al.*, 2000).

Al analizar la frecuencia del polimorfismo ACE I/D en población abierta se observó un incremento en el alelo de Inserción en la población maya respecto a la población mestiza.

En relación con trabajos en que se han reportado estudios similares en diferentes poblaciones, las frecuencias alélicas y la distribución genotípica del polimorfismo ACE I/D que se reportan en este estudio, tanto en población mestiza como en población maya se muestran incrementados con respecto a estudios realizados en poblaciones sanas:

caucásica, china, polinesa y turca (Rankinen *et al.*, 2000; Chia *et al.*, 2003; Zak *et al.*, 2003; Agachan *et al.*, 2003) (Tabla 3).

En el presente estudio el alelo de inserción de la Enzima Convertidora de Angiotensina se encontró asociado con el desarrollo de preeclampsia, esto contrasta con lo reportado en población china, italiana y coreana (Zhou *et al.*, 1999 Mello *et al.*, 2003; Chou *et al.*, 2004), donde el alelo de la delección se ha encontrado asociado a preeclampsia. No hay reportes anteriores de la asociación del alelo de inserción con el desarrollo de preeclampsia.

Algunos estudios anteriores observaron una asociación significativa, de preeclampsia con la variante molecular del angiotensinógeno, M235, en caucásicos y japoneses (Ward *et al.*, 1993; Arngrimsson *et al.*, 1993; Kobashi, 2001) y esta concentración más alta del angiotensinógeno en plasma observada en los portadores de las variantes de M235 podía causar un desequilibrio mayor del sistema RA durante el embarazo. Contrariamente Guo *et al.*, (1997) encontraron que no había diferencias significativa en las frecuencias de los genotipos del alelo M235T entre los casos de preeclampsia/eclampsia y los controles en poblaciones australianas y chinas, así como en poblaciones japonesa (Suzuki, 1999) e hispánica (Morgan, 1995), esto pudiera ser atribuible a los criterios usados para diagnosticar preeclampsia (Choi *et al.*, 2004).

Al analizar la frecuencia del alelo M235T del AGT en población abierta maya y mestiza, no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas mientras que en las frecuencias genotípicas se observó una disminución de individuos homocigotos para el alelo M respecto a la población mestiza.

En relación con estudios similares reportados en distintas poblaciones, las frecuencias alélicas y la distribución genotípica del polimorfismo M235T del AGT que se reportan en este estudio tanto en población mestiza como maya difieren de los presentados en los estudios realizados en poblaciones sanas caucásica china y turca (Luther et al., 2003; Chia *et al.*, 2003; Agachan *et al.*, 2003)(Tabla 7).

En nuestros resultados, el alelo M235 del gen del angiotensinógeno se encontró incrementado en las mujeres con preeclampsia mostrando diferencias significativas, sin embargo las frecuencias alélicas no muestran diferencias significativas.

La causa exacta del preeclampsia no se ha determinado, pero un desequilibrio del sistema RA podría contribuir a su desarrollo. Los productos de los genes de este sistema podrían ser candidatos potenciales para el desarrollo de preeclampsia y de hipertensión inducida por el embarazo (Chou *et al.*, 2004).

## 8. CONCLUSIONES

Este estudio mostró que el polimorfismo de I/D del gen de la ACE, está asociado con el desarrollo de preeclampsia en mujeres mayas y que el polimorfismo M235T del gen del Angiotensinógeno, parece no estar asociado con el desarrollo de la enfermedad.

Diversos polimorfismos de genes de los componentes del sistema RA pueden contribuir a la heterogeneidad de la preeclampsia en diversos grupos étnicos. En mujeres mayas, la variante molecular del gen de la ACE parece ser importante.

El alelo de Inserción de la Enzima Convertidora de Angiotensina es un factor de riesgo de preeclampsia en población maya.

El polimorfismo AGT M235T no es un factor de riesgo de preeclampsia en población maya.

## 9. REFERENCIAS

- Agachan B, Isbir T, Yilmaz H, Akoglu E. 2003. Angiotensin converting enzyme I/D, angiotensinogen T174M, M235T and angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphisms in Turkish hypertensive patients. *Exp Mol Med.* 35:545-549.
- Anumba D, Robson SC. 1999. Management of pre-eclampsia and haemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 11(2): 146-56.
- Arngrimsson R, Purandare S, Connor M, Walker JJ, Bjornsson S, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Geirsson RT, Bjornsson H. 1993. Angiotensinogen: a candidate gene involved in preeclampsia? (letter). *Nat Genet.* 4: 114-5.
- Bashford MT, Hefler LA, Vertreesb TW, Roa BB, and Gregg AR. (2001). Angiotensinogen and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms among Hispanic patients with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 184:1345-51.
- Berglund L. MD. 1998. A recurrent theme with a new spin: polymorphism and cardiovascular disease. *J Lab Clin Med* 131:485-6
- Brand E; Chatelain N; Paillard F; Tiret L; Visvikis S; Lathrop M; Soubrier F; Demenais, F. 2002. Detection of putative functional angiotensinogen (AGT) gene variants controlling plasma AGT levels by combined segregation-linkage analysis. *Europ. J. Hum. Genet.* 10: 715-723.

Burrow GM. 1996. Complicaciones médicas durante el embarazo. 4ª ed, México, McGraw-Hill panamericana. 1-25.

Campbell D. 1987. Circulating and tissue angiotensin systems. *J Clin Invest.*79:1-6.

Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou J P, Arveiler D, Luc G, Bard J M, Bara L, Sylvain Ricard, Tiret L, Amouyel P, Alhenc-Gelas F and Soubrier F. (1992). Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 359: 641-644.

Cooper DW, Hill JA, Chesley LC, Bryans CI. 1988. Genetic control of susceptibility to eclampsia and miscarriage. *Br J Obstet Gynaecol.* 95: 644-53.

Cotran RM, Kumar V, Collins T. 2000. Patología estructural y funcional. 6ª ed, México, McGraw-Hill interamericana. 1127-30.

Chesley LC. (1978). Eclampsia: the remote prognosis.. *Semin Perinatol* 2:99-111.

Chesley LC, Cooper DW. 1986. Genetics of hypertension in pregnancy: Possible single-gene control of pre-eclampsia and eclampsia in the descendants of eclamptic women. *Br J Obstet Gynaecol.* 93:898-908.

Tsai C, Fallin D, Chiang F, Hwang J, Lai L, Hsu K, Tseng C, Liao C, Tseng Y. 2003. Angiotensinogen Gene Haplotype and Hipertensión Interaction With ACE Gene I Allele. *Hypertension*. 41:9-15.

Choi H, Kang JY, Yoon HS, Han SS, Whang CS, Moon IG, Shin HH, Park JB. 2004. Association of Angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen gene polymorphisms with preeclampsia. *J Korean Med Sci*. Apr;19(2):253-7.

Dekker GA. 1999. Risk factors for Preeclampsia. *Clin Obstet and Gynecol*. 42 (3): 422-35

Esplin MS, Fausett MB, Fraser A et al. 2001. Paternal and maternal Components of the Predisposition to Preeclampsia. *N Engl J Med*. 344 (12): 867-72

Estrada-Altamirano A, Hernández-Pacheco JA, Cisneros-Castolo M y García-Benitez CQ. 2002. Experiencia de la Unidad de Cuidados Intensivos Obstétricos del Instituto Nacional de Perinatología. 1993-1998. *Perinatol Reprod Hum*; 16(2): 88-95

Beevers G, Lip G, O'Brien E. (2001). The pathophysiology of hypertension. *Clinical review*. *BMJ*;322:912-916

Guo G, Wilton AN, Fu Y et al. Angiotensinogen gene variation in a population case-control study of preeclampsia/eclampsia in Australians and Chinese. *Electrophoresis* 1997;18:1646-9.

Haddad T. 2002. Update on preeclampsia. *Intr Anesth Clin.* 40 (4): 115-35

Hall S, Chu G, Miller G, Cruickshank K, Cooper J, Humpries S, Talmud P. (1997) A common mutation in the lipoprotein lipase gene promoter, -93T/G, is associated with lower plasma triglyceride levels and increased promoter activity in vitro. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Bio.*,17:1969-76.

Heiskanen JT, Pirskanen MM, Hiltunen MJ, Mannermaa AJ, Punnonen KR, Heinonen ST, (2001). Insertion-deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is associated with obstetric cholestasis but not with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 185:600-3.

Hennekens,Ch. (1995) A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N.Eng.J.Med.*, 332:706-711.

Higuchi R, Fokler C, Dollinger G, Watson R. 1993. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology* .11:1026-30.

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of The National Academy of Sciences USA.* 88:7276-80.

Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverrí J. (1993) Estructura y regulación de la expresión del gen del angiotensinógeno. *Rev Invest Clin*; 45(4): 387-398.

Jackson A, Brown K, Langdown J, Luddington R, Baglin T. Effect of the angiotensin-converting enzyme gene deletion polymorphism on the risk of venous thromboembolism. *Br J Haematol* 2000; 111: 562-4.

Johanning GL, Johnston KE, Tamura T, Goldenberg RL. 1995. Ethnic differences in angiotensin converting enzyme gene polymorphism. *J Hypertens*. 13: 710-1

Kalmes y Huret, 2002. Modele de hardy-weinberg. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*.

Kim YJ, Williamson RA, Murray JC, Andrews J, Pietscher JJ, Peraud PJ, Merrill DC. (2001). Genetic susceptibility to preeclampsia: roles of cytosineto-thymine substitution at nucleotide 677 of the gene for methylenetetrahydrofolate reductase, 68-base pair insertion at nucleotide 844 of the gene for cystathionine beta-synthase, and factor V Leiden mutation. *Am J Obstet Gynecol* 184:1211-7.

Kim DK, Kim JW, Kim S, Gwon HC, Ryu JC, Huh JE, Choo JA, Choi Y, Rhee CH, Lee WR. 1997. Polymorphism of angiotensin converting enzyme gene is associated with circulating levels of plasminogen activator inhibitor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 17: 3242-7.

Kobashi G. A case – control study of pregnancy – induce hypertension with a genetic predisposition: Asociation of a molecular variant of AGT in the Japanese women. *Hok Ig Zasshi* 1995;70:649-57.

Kobashi G, Shido K, Hata A, Yamada H, Kato EH, Kanamori M, Fujimoto S, Kondo K. 2001. Multivariate analysis of genetic and acquired factors; T235 variant of the angiotensinogen gene is a potent independent risk factor for preeclampsia. *Semin Thromb Hemost.*, 27(2):143-7.

Lindpaintner K, Pfeiffer M , Kreutz R , Stampfer MJ, Grodstein F, LaMotte F, Buring J, Mailly F, Tugrul Y, Reymer P, Bruin T, Seed M, Groenemeyer B, Asplund, Carlson A, Vallance A. (1995) A common variant in the gene for lipoprotein lipase (Asp9Asn) Functional implications and prevalence in normal and hyperlipidemic subjects. *Artheroscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 15:468-478.

Luther Y, Bantis C, Ivens K, Fehsel K, Kolb-Bachhofen V, Heering P. 2003. Effects of the genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system on focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Blood Press Res.* 26(5-6):333-7.

Mello G, Parretti E, Gensini F, Sticchi E, Mecacci F, Scarselli G, Genuardi M, Abbate R, Fatini C. 2003. Maternal-fetal flow, negative events, and preeclampsia: role of ACE I/D polymorphism. *Hypertension.* Apr;41(4):932-7.

Montgomery HE, Marshal R, Hemingway H, Myerson S et al. 1998. Human gene for physical performance. *Nature* 393: 221-222.

Morgan L, Baker P, Pipkin FB, Kalsheker N. 1995. Pre-eclampsia and the angiotensinogen gene. *BIOG* 102:489-90.

Myers JE, Baker PN. 2002. Hypertensive diseases and eclampsia. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 14: 119-125.

Nakai K, Itoh C, Miura Y, Hotta K, Musha T, Itoh T, Miyakawa T, Iwasaki R, Hiramori K. 1994. Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese. *Circulation.* 90: 2199-202.

National Heart Lung And Blood Institute. (2000). National High Blood Pressure Education Program: Working Group. Report On High Blood Pressure In Pregnancy. Bethesda (MD): National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI); Jul. 38 p.

Powell JS, Clozel JP, Muller RKM, Kuhn H, Hefti F, Hosang M, Baumgartner HR. 1989. Inhibitors of angiotensin converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. *Science.* 245:186-8.

Pridjian G, Puschett JB. 2002. Preeclampsia. Part 1: Clinical and Pathophysiologic Considerations. *Obstet and Gynecol Survey* 57 (9): 598-618.

Pridjian G, Puschett JB. 2002. Preeclampsia. Part II: Experimental and Genetic Considerations. *Obstet and Gynecol Survey*. 57 (9): 619-40.

Rankinen T, Gagnon J, Perusse L, Chagnon YC, Rice T, Leon AS, Skinner JS, Wilmore JH, Rao DC, Bouchard C. AGT M235T and ACE ID polymorphisms and exercise blood pressure in the HERITAGE Family Study. 2000. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Jul; 279.

Raynolds MV, Bristow MR, Bush EW, Abraham WT, Lowes BD, Zisman LS, Taft CS and Perryman B. (1993). Angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with ischaemia or idiopathic cardiomyopathy. *Lancet* 342: 1073-1075.

Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P and Soubrier F. (1990). An insertion/deletion polymorphism in the Angiotensin-converting enzyme gene accounting for the half the variance of serum enzyme levels. *J. Clin. Invest*. 86: 1343-1346.

Roberts JM, Cooper DW. (2001). Pathogenesis and genetics of preclampsia. *Lancet* 357:53-6.

Roberts JM, Lain KY. 2002. Recent Insights into the pathogenesis of preeclampsia. *Placenta*. 23: 359-72.

Roberts JM, Pearson G, Cutler J, Lindheimer M. 2003. Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. *Hypertension*. 41: 437-445.

Skjærven R, Ph D, Allen J, Wilcox MD, Lie PD. 2002. The Interval Between Pregnancies and the Risk of Preeclampsia. *N Engl J Med* 346 (1): 33-8.

Schunkert H, Hense HW, Holmer SR, Stender M et al. (1994). Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *N. Engl. J. Med.* 330: 1634-1638.

Sibai BM. (1996). Hypertension in pregnancy. In: Gabbe SG, Niebyl JR, Simpson JL editors. *Obstetrics: normal and problem pregnancies*. 3<sup>a</sup> ed New York: Churchill Livingstone.936:96.

Sohda S, Arinami T, Hamada H, Yamada N, Hamaguchi H, KuboT. (1997). Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and preeclampsia. *J Med Genet* 34:525-6.

Staessen JA, Kinetsova T, Wang JG, Emalianou D Vlietinck R, Fargard R, (1999).M235T angiotensinogen gene polymorphism and cardiovascular renal risk. *J. Hipertens* 17: 9-17.

Sun Y, Ratajaska A. 1995. Bradikinin receptor and tissue ACE binding in myocardial fibrosis. *J Moll Cell. Cardiol.* 27:813-822.

Suzuki Y, Tanemura M, Murakami I et al. Is angiotensinogen gene polymorphism associated with hipertensión in pregnancy? *Hypertens Pregnancy* 1999;18:261-71.

Tamarin R. H. 1996. *Principios de genética*. Ed. Reverté. Barcelona.

Tiret L, Kee F, Poirier O, Nicaud V et al. (1993). Deletion polymorphism in angiotensin-converting enzyme gene associated with parental history of myocardial infarction. *Lancet* 341: 991-992.

Ward K, Hata A, Jeunemaitre X et al. 1993. A molecular variant of angiotensinogen associated with preeclampsia. *Nature Genetics*.;4:59-61.

Wilson MI, Goodwin TM, Pan VI, Ingles SA. 2003. Molecular epidemiology of preeclampsia. *Obstet. and Gynecol. Survey* 58(1):39-66.

Quan Z, Varner MD, DizonD, Song MD, and Kenneth W, MD. 2003. A Molecular Variant of Angiotensinogen Is Associated With Idiopathic Intrauterine Growth Restriction. *Obstet Gynecol*; 101:237-42.

Zak I, Niemiec P, Sarecka B, Balcerzyk A, Ciemniowski Z, Rudowska E, Dylag S. 2003. Carrier-state of D allele in ACE gene insertion/deletion polymorphism is associated with coronary artery disease, in contrast to the C677T transition in the MTHFR gene. *Acta Biochim Pol.* 50(2):527-34.

Zhou N, Yu P, Chen J, Huang H, Jiang S. (1999). Detection of insertion/deletion polymorphism of angiotensin converting enzyme gene in preeclampsia. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 10 (1):29-31.

Zusterzeel PLM, Visser W, Peters. Merkus HMW MJ, Nelen WLDM, Steegers EAP. (2000). Polymorphism in the Glutathione S-transferase P1 Gene and Risk for Preeclampsia. *Obstetrics and Gynecology* 96:50-4.

**Abreviaturas usadas:**

ACE	Enzima Convertidora de Angiotensina-I
ADN	Acido desoxirribonucleico
AGT	Angiotensinógeno
ARN	Acido ribonucleico
BUN	Nitrógeno ureico sérico
dl	Decilitro
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
GFR	Tasa de filtración glomerular
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
IGF-2	Factor de crecimiento semejante a la insulina
Kb	Kilobases
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
mg	Miligramos
mmHg	Milímetros de mercurio
mM	Milimolar
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Preeclampsia
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
pmol	Picomoles
RA	Sistema Renina-Angiotensina
RCLB	Amortiguador de lisis de células rojas (eritrocitos)
rpm	Revoluciones por minuto

