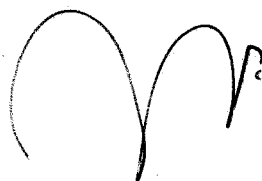


R.36.718 G/233
D 15996004
C 19807843

T.D.
6/233

**INFLUENCIA DEL POLIMORFISMO DEL GEN
DE LA ECA, APO-E Y DEL RECEPTOR BETA-3
ADRENÉRGICO SOBRE EL PERFIL LIPÍDICO,
LA RESISTENCIA A LA INSULINA Y LA
COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA MEMBRANA,
EN LA HIPERTENSIÓN ESENCIAL DE
RECIENTE COMIENZO.**



Jose Salvador Garcia Morillo

REPUBLICA DE COLOMBIA
Ministerio de Educación
Al Señor 064 220 del Nord
Compartimiento
Sevilla
20 FEB. 2003
El Director del Departamento de Sevilla

Jose David

[Handwritten signature]

COLOMBIA REPUBLICA DE COLOMBIA

[Handwritten signature]

Dr. JOSE VICENTE OJEDA

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN

- Introducción	5
- Enfermedad hipertensiva y Resistencia a la Insulina - Obesidad	6
- Resistencia a la insulina e influencia genética	8
- Contratraste Sodio/Litio como marcador de HTA	10
- La composición lipídica de la membrana en la Hipertensión Arterial	11
- Polimorfismos del gen de la ECA e Hipertensión Arterial y otros aspectos de la patología cardiovascular	13
- Polimorfismo del gen de la Apo E, Hipertensión Arterial y enfermedad cardiovascular	17
- Polimorfismo Trp64Arg del receptor beta-3-adrenérgico, hipertensión y otros factores de riesgo vascular	19

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

21

MATERIAL Y MÉTODOS

23

- Selección de los pacientes:	24
Características de los pacientes	
Criterios de inclusión	
Criterios de exclusión	
- Protocolo de Estudio Clínico	24
- Metodología de la medición de lípidos, glucosa e insulina plasmáticas	25
- Metodología de la composición lipídica de la membrana	25
- Metodología de la actividad del Contratraste sodio/litio	26
- Metodología de los Polimorfismos Genéticos:	26
Polimorfismo I/D del gen de la ECA	
Polimorfismo Arg64Trp del gen RB3A	
Polimorfismo ε4 del gen de la Apo E	
- Análisis Estadístico	26
- Aspectos Éticos	27

RESULTADOS

28

- Características generales	29
- Polimorfismo I/D de la ECA	29
- Polimorfismo del RB3A	29
- Polimorfismo de la Apo E	30
- Contra y Composición lipídica de membrana	30
- Polimorfismos genéticos y síndrome metabólico	31

DISCUSIÓN

55

CONCLUSIONES

60

Este trabajo de investigación ha sido presentado parcialmente en las siguientes comunicaciones a Congresos:

- **S. García Morillo**, A. Fernández Moyano, C. Palmero, O. Muñiz, P. Stiefel, ML. Miranda, MV. Martín-Sanz, E. Pamies; J. Villar y J. Carneado.

“POLIMORFISMO DE LA APOPROTEÍNA E Y SU RELACIÓN CON LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA Y TRANSPORTADORES DE MEMBRANA EN PACIENTES HIPERTENSOS-HIPERTRIGLICERIDÉMICOS”.

XV Congreso de la Sociedad Andaluza de Medicina Interna. Huelva-1997.

- **S. García Morillo**, E. Pamies, C. Palmero, P. Stiefel, C. Montilla, A. Alonso, R. García Lozano, J. Carneado, J. Villar.

“POLIMORFISMO DEL RECEPTOR BETA-3 ADRENÉRGICO EN LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL ESENCIAL: RELACIÓN CON EL CONTRATRANSPORTE SODIO - LITIO Y COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE MEMBRANA”.

4ª Reunión Nacional de la Sociedad Española de Hipertensión. Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial. Sevilla, 3-6 de Marzo de 1999.

Publicado en Hipertensión, Vol. 16, Nº extra, Marzo 1999, Pág.50.

- **S. García Morillo**, C. Palmero, P. Stiefel, ML. Miranda, E. Pamies, MV. Martín-Sanz, J. Villar, J. Carneado.

“ESTUDIO DE RESISTENCIA INSULÍNICA, COMPOSICIÓN Y TRANSPORTADORES DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA EN PACIENTES OBESOS HIPERTENSOS Y OBESOS NORMOTENSOS”.

4ª Reunión Nacional de la Sociedad Española de Hipertensión. Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial. Sevilla, 3-6 de Marzo de 1999.

Publicado en Hipertensión, Vol. 16, Nº extra, Marzo 1999, Pág. 47-48.

- C. Palmero, **S. García Morillo**, E. Pamies, P. Stiefel, C. Montilla, A. Alonso, J. Carneado, J. Villar.

“RELACIÓN ENTRE EL COLESTEROL DE MEMBRANA Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA EN HIPERTENSOS ESENCIALES NORMOLIPÉMICOS”.

4ª Reunión Nacional de la Sociedad Española de Hipertensión. Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial. Sevilla, 3-6 de Marzo de 1999.

Publicado en Hipertensión, Vol. 16, Nº extra, Marzo 1999, Pág. 43.

- **S. García Morillo**, C. Palmero, P. Stiefel, C. Montilla, E. Pamies, MV. Martín-Sanz, ML. Miranda, J. Villar, J. Carneado.

“POLIMORFISMO DE LA APOLIPOPROTEÍNA E Y SU RELACIÓN CON LA RESISTENCIA A LA INSULINA, EL PERFIL LIPOPROTEÍCO Y LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE MEMBRANA”.

XXXIV Congreso de la Sociedad Andaluza de Cardiología. Úbeda/Baeza (Jaén), 20-22 de Mayo de 1999.

- **S. García Morillo**, C. Palmero, I. Vallejo, P. Stiefel, E. Pamies, MV. Martín-Sanz, ML. Miranda, J. Villar y J. Carneado.

“APO-E Y SU RELACIÓN CON EL PERFIL LIPOPROTEICO, LA RESISTENCIA A LA INSULINA Y EL CONTRATRANSPORTE SODIO/LITIO EN HIPERTENSOS ESENCIA-

LES.”.

5ª Reunión Nacional de la Sociedad Española de Hipertensión. Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial. Madrid-2000.

Publicado en Hipertensión Marzo –2000; Vol. 17, nº extraordinario; Pág.65-66.

- Vallejo I, Pamies E, **García Morillo S**, Aparicio R, , Miranda ML, Stiefel P, Muñiz O, Martín Sanz MV, Villar J, Carneado J.

“ *PERFIL LIPIDICO, RESISTENCIA A LA INSULINA Y COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE MEMBRANA EN HIPERTENSOS ESENCIALES. INFLUENCIA DEL INDICE DE MASA CORPORAL*”.

6ª Reunión Nacional de la Sociedad Española de Hipertensión. Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial. Torremolinos-Málaga-2001.

Publicado en HIPERTENSIÓN , Vol. 18; nº extraordinario: Pág. 27.

- **S. García Morillo**, J Villar, I Vallejo, R. Aparicio, D. Nieto, J Carneado, P. Stiefel, E. Pamies, ML Miranda, O. Muñiz.

“ *INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS GENETICOS DEL GEN DE LA ECA, APO-E Y DEL RECEPTOR BETA-3 ADRENERGICO EN PACIENTES HIPERTENSOS CON SÍNDROME METABOLICO*”.

7ª Reunión Nacional de la Sociedad Española de Hipertensión. Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial. Madrid, Marzo de 2002.

- **S. García Morillo**, J Villar, I Vallejo, R. Aparicio, D. Nieto, J Carneado, P. Stiefel, E. Pamies, ML Miranda, O. Muñiz,

“*INTOLERANCIA HIDROCARBONADA Y GLUCEMIA BASAL ALTERADA EN HIPERTENSOS ESENCIALES Y SU RELACION CON LOS POLIMORFISMOS GENETICOS I/ D DE LA ECA Y E4 DE LA APO E*”.

7ª Reunión Nacional de la Sociedad Española de Hipertensión. Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial. Madrid, Marzo de 2002.

Además, su resultados preliminares han sido publicados en las siguientes revistas científicas:

- P Stiefel, C Montilla, O Muñiz-Grigalvo, R García-Lozano, A Alonso, ML Miranda, E Pamies, J Villar.

“*Apolipoprotein E gene polymorphism is related to metabolic abnormalities, but does not influence erythrocyte membrane lipid composition or sodium-lithium countertransport activity in essential hypertension*”.

Metabolism 2001; 50 (2): 157-160.

- Pamies E, García Lozano R, Palmero C, García Morillo S, Alonso A, Stiefel P, Carneado J, Villar J.

“*Genetic variation in the Beta-3-adrenergic receptor in essential hypertension*”.

Life Sciences 67 (2000); 391-397.

- J Villar, P Stiefel, S García Morillo, R Lozano.

“Genotipos de la Apo-E en la hipercolesterolemia asociada a la hipertensión arterial”.
Medicina Clínica 2002;118(18): 717-8.

INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial (HTA) es una enfermedad compleja, multifactorial, en la que confluyen tanto factores genéticos como ambientales. Se cree que aproximadamente el 40% de la variación interindividual de la presión arterial en la población general viene determinada genéticamente. Esta contribución de la herencia hace que el enfoque genético de ésta sea el más apropiado para conocer sus bases fisiopatológicas. No obstante el estudio genético de la HTA viene dificultado por la existencia de muchos factores que pueden influir en su desarrollo (edad, sexo, raza, etc), por la hipótesis de varios genes implicados en su fisiopatología ya que no sigue las leyes mendelianas de transmisión; y por la distribución continua o unimodal de la presión arterial. Actualmente se asume que las mayores de las variaciones genéticas producen efectos independientes aunque aditivos, es lo que se ha dado en llamar trastorno poligénico.

El estudio genético de la HTA puede enfocarse realizando un rastreo genético total del genoma sin bases de conocimiento previo o a partir de genes candidatos que surgen del conocimiento de la fisiología y la fisiopatología de los factores o mecanismos que regulan la presión arterial. Entre algunos de estos genes candidatos se encuentran aquellos que codifican los factores que intervienen en el SRAA, como variaciones del gen de la ECA, del angiotensinógeno, del receptor AT1 de la angiotensina II y de la aldosterona sintetasa. También es interesante conocer la existencia de asociaciones entre genes, de forma que la presencia de polimorfismos genéticos diferentes cuando se presentan conjuntamente pueden potenciar o hacer más visibles las manifestaciones clínicas o fenotipos.

En este trabajo vamos a intentar analizar la relación existente entre 3 polimorfismos genéticos y la presencia de fenotipos intermedios en el desarrollo de arteriosclerosis y enfermedad cardiovascular, en una población de hipertensos esenciales que nunca han sido tratados farmacológicamente. Queremos ver si el gen de la ECA, del receptor beta-3 adrenérgico o de la Apolipoproteína E se relacionan con la presencia de un perfil metabólico más desfavorable, constituido por un perfil lipídico más aterogénico y/o la presencia de hiperinsulinismo, resistencia a la acción periférica de la insulina o síndrome plurimetabólico.

La asociación entre hipertensión arterial, hiperlipemia e hiperinsulinemia se ha descrito como síndrome de resistencia a la insulina, y se ha intentado buscar una hipótesis etiopatogénica conjunta para explicar todas estas alteraciones. Una de estas hipótesis es la descrita por Reaven (1) como síndrome X, en la que parecen implicarse por una parte el incremento de la resistencia a la insulina y por otro una actividad del sistema nervioso simpático más exacerbada; y como nexo de unión común la presencia de obesidad central que sería la piedra angular de este trastorno. De esta forma, la hipótesis insulínica de la HTA propone que la hiperinsulinemia refleja una situación de aporte nutricional inadecuado al músculo esquelético y que la dislipemia acompañante sería el resultado de una disminución de la actividad de la lipoproteína-lipasa provocada por una disminución del flujo vascular y de alteraciones musculares en la pared arteriolo-

arterial (2-4). Por otra parte, la prevalencia de esta asociación muestra variaciones amplias entre los diferentes estudios, llegando inclusive al 50%(5). La prevalencia de síndrome metabólico en la población hipertensa ha sido poco estudiado, y puede ser un subgrupo de hipertensos definidos con características epidemiológicas, clínicas y biológicas independientes y por tanto su manejo en la práctica clínica puede ser diferente al resto de pacientes hipertensos. Finalmente queríamos comprobar la influencia y las posibles repercusiones a nivel celular de los diferentes polimorfismos sobre la composición lipídica de la membrana y sobre la actividad del transportador de membrana denominado Contra transporte Sodio/Litio (CONTRA Na/Li). Nuestro grupo ha intentado correlacionar las alteraciones lipídicas asociadas a la HTA, con alteraciones en la composición de membrana. Montilla et al (6) encuentran que la membrana de los sujetos hipertensos tienen un mayor cociente colesterol/ fosfolípidos, lo que confiere una mayor rigidez o menor fluidez a la membrana. Y finalmente, hay autores que defienden que estas alteraciones en las propiedades físicas de la membrana son las responsables en parte de las anomalías en los sistemas de transporte de sodio, uno de ellos el CONTRA Na⁺/Li⁺, que se han descrito en la hipertensión arterial (7).

A continuación, vamos a detallar los conocimientos existentes en la literatura sobre la influencia de dichos polimorfismos sobre cada uno de estos aspectos y su asociación con fenotipos intermedios de la enfermedad cardiovascular. También expondré los últimos estudios realizados sobre composición lipídica de membrana y actividad del CONTRA en hipertensos esenciales, en la búsqueda de influencias genéticas.

Enfermedad hipertensiva y Resistencia a la Insulina-Obesidad.

El síndrome de resistencia a la insulina caracterizado por anomalías en el perfil lipídico, disminución de la tolerancia a la glucosa y tendencia a la obesidad, es un importante factor de riesgo para eventos cardiovasculares, especialmente si se asocia a cifras elevadas de presión arterial (8,9). Recientemente la OMS en 1999, definió la resistencia a la insulina, en cuanto a sus niveles que se consideran anómalos: la resistencia a la insulina debe ser mayor del 25%; la presión arterial mayor de 140/90 mmHg, los triglicéridos deben superar los 150 mg/gl y el colesterol HDL tiene que ser menor de 35/39 mg/dl en el hombre y la mujer, respectivamente.

Diferentes estudios han demostrado que la resistencia a la insulina es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad vascular arteriosclerótica (10,11). La resistencia a la insulina ha sido implicado como un hallazgo patogénico central de un abanico de factores de riesgo que incluyen: hipertensión arterial, intolerancia a la glucosa y diabetes mellitus, hiperinsulinemia, dislipemias y trastornos homeostáticos (10,12); y el exceso de riesgo vascular asociado a ésta parece que es independiente de la presencia de estos factores de riesgo clásicos (10,11). Aunque puede ser independiente del sobrepeso u obesidad, parecen que estar relaciona-

dos desde el punto de vista patológico.

La obesidad es uno de los mayores problemas de salud pública y diversos estudios han relacionado la obesidad abdominal con la presencia de hipertensión arterial, resistencia a la insulina, dislipemia y morbilidad y mortalidad cardiovascular prematura; e igualmente que ocurre con la resistencia a la insulina, el exceso de riesgo asociado a ella es independiente de los otros factores(13). Así la resistencia a la insulina surge como un importante nexo de unión entre obesidad y riesgo vascular y con sus consecuencias. La prevalencia de hiperinsulinemia, hipersecreción insulínica y resistencia a la insulina se asocian con el índice de masa corporal (14,15). El índice de masa corporal (IMC), calculado como peso en kilogramos dividido por la talla en metros al cuadrado se relaciona con la grasa visceral. Aunque el IMC no es un marcador preciso de grasa visceral, en general a mayor IMC mayor grado de obesidad central (13,15). Una revisión de la literatura, resumido en la figura 1, indica que el tejido adiposo es un tejido metabólicamente activo y con una gran variedad de respuestas que contribuyen al desarrollo de resistencia a la insulina y otros factores de riesgo vascular, así como al desarrollo de complicaciones cardiovasculares.

Diferentes investigadores han comunicado que al hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina se asocia con frecuencia a la hipertensión arterial e incluso podrían estar implicadas en su etiología (16). Esta falta de sensibilidad a la insulina obedece al metabolismo no oxidativo en los tejidos periféricos y puede ser independiente de la presencia de obesidad (17,18). Los primeros estudios que relacionan la presencia de hiperinsulinemia e hipertensión arterial reportaron un descenso del 40% en la sensibilidad a la insulina en sujetos hipertensos no obesos con la técnica del clamp euglicémico-

hiperinsulinémico (17,19). Diferentes trabajos han documentado hiperinsulinemia con hipertensos, tanto en ayunas (20) como tras sobrecarga oral (21). La resistencia a la utilización periférica de la insulina ha sido repetidamente encontrado en un tercio hasta la mitad de pacientes hipertensos no obesos (22). Pero los datos más sugestivos de esta asociación derivan de dos estudios prospectivos; uno realizado en mujeres de Gotemburgo seguidas durante 12 años (23) y otro en población americano de origen mejicana seguida durante 8 años (24). En ambos estudios, la presencia de hiperinsulinemia fue un factor predictivo para el desarrollo de hipertensión. El riesgo relativo de hipertensión fue 2 veces superior en el estudio sueco y 3 veces superior en el estudio de Texas; y se comprobó que la relación se mantenía cuando se excluían otros factores de confusión por análisis multivariante (25). Estos resultados también se han encontrado en hijos normotensos de sujetos hipertensos (26), en niños (27) y en otras poblaciones étnicas (28).

Se ha postulado que la insulina aumenta la presión arterial a través de su efecto sobre la retención renal de sodio (29), la estimulación del sistema nervioso simpático (30), la actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona (31) y la acción del factor de crecimiento tisular (32). Además, ejerce también influencia sobre el transporte de cationes en las membranas celulares (33), entre ellos el contratransporte sodio-litio. Por otra parte, el tono adrenérgico incrementado en la hipertensión arterial, podría contribuir a su vez a disminuir la sensibilidad a la insulina. También la insulina parece que puede aumentar la síntesis de factores de crecimiento por las células musculares lisa del endotelio, aumentar y hacer proliferar estas células y de esta forma estar implicada en el remodelado vascular (34). En la tabla 1 se muestran los meca-

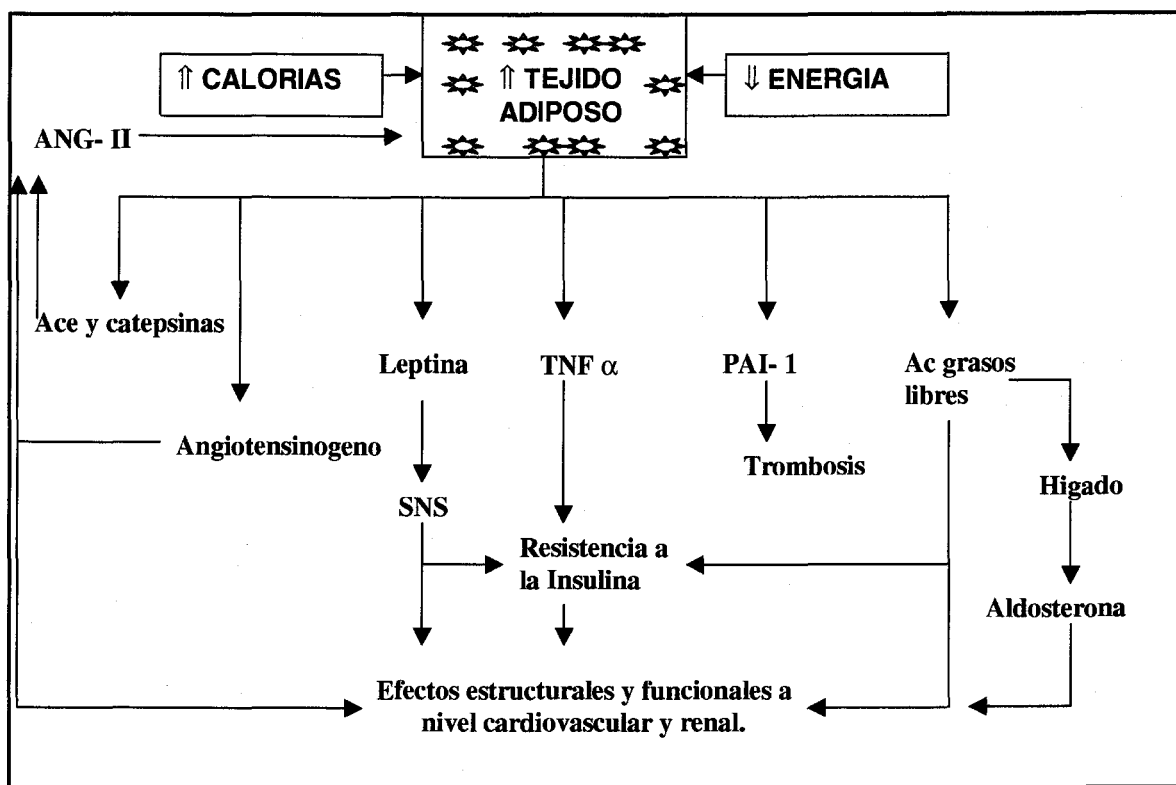


Figura 1: Modificado de Egan B et al. AJH 2001;14:116S-125S.

MECANISMOS	REFERENCIA
Aumento de la reabsorción renal de agua y sodio	Gupta et al (1992)
Aumento de la sensibilidad de la presión arterial a la ingesta de sal.	Sharma et al (1993)
Aumento de la respuesta presora de la aldosterona a la AII	Rocchini et al (1990)
Cambios en los transportadores de electrolitos de membrana:	
- Aumento de sodio intracelular	Barbagallo et al (1993)
- Descenso de la actividad de la ATP-asa sodio/potasio	Pontremoli et al (1991)
- Incremento de la actividad del transportador sodio/protón	Aviv (1992)
Incremento del calcio intracelular	Aviv (1992)
Estímulo de factores de crecimiento, especialmente en c. Musculares lisas	Bornfeldt et al (1992)
Estímulo de la actividad simpática	Lembo et al (1992)
Reducción de la síntesis de prostaglandinas vasodilatadoras	Axelrod (1991)
Vasodilatación alterada	Baron et al (1993)
Incremento de la secreción de endotelina	Hu et al (1993)

Tabla 1: Mecanismos propuestos por los cuales la Resistencia a la insulina y/o la hiperinsulinemia pueden producir un incremento de las cifras de presión arterial.

nismos que se han propuesto como base fisiopatológica de la relación entre hiperinsulinismo e hipertensión arterial. La insulina por sí misma, además de producir las modificaciones metabólicas asociadas a la insulinerresistencia, está implicada en cambios del funcionamiento endotelial. Así la insulina es capaz de aumentar la generación de óxido nítrico (NO) por el endotelio en modelos experimentales (35) y en humanos (36). Por otra parte, esta hormona aumenta la liberación de endotelina y además, la relación NO/ endotelina está disminuida tras la administración de insulina en pacientes con hipertensión arterial. Vallance et al (37) son los primeros que sugieren el papel del deterioro de la síntesis endotelial de NO en el desarrollo de hipertensión. Una función endotelial alterada con menor producción de NO y prostaglandina I_2 también ha sido encontrada en sujetos diabéticos (38) y modelos experimentales de diabetes (39). Recientemente se ha propuesto una combinación de efectos del estado de resistencia a la insulina y la presencia del polimorfismo G894T del gen de la NO sintetasa sobre el desarrollo de hipertensión en jóvenes con riesgo familiar. Así la prevalencia de HTA familiar fue mayor en los sujetos portadores del alelo GT con resistencia a la insulina elevada (medida por HOMA) que aquellos que no lo poseen (70,5% vs 51,3%, $p=0.006$) (40).

Sin embargo, la relación causal entre hipertensión arterial y resistencia a la insulina sigue siendo materia de controversia. Aunque la coexistencia de ellas parece ser un hecho real, existen grandes diferencias en la prevalencia de esta asociación en las diferentes series, variando desde el 12% (41) hasta el 50% en hipertensos esenciales (42,43), e incluso algunos autores como Jarret opinan que la relación es inconsistente (44). Además, los escasos estudios prospectivos que han analizado la asociación entre los niveles de insulina y el

desarrollo de hipertensión no tienen unanimidad en sus resultados (45). También se han encontrado asociaciones negativas en determinados grupos étnicos, en los que a pesar de tener una alta prevalencia de hiperinsulinemia, no desarrollan hipertensión (p.e indios Pimas) (46). Reaven argumenta que las diferencias étnicas podrían estar justificadas por la interacción entre los mecanismos genéticos y los factores ambientales, de forma que en estas poblaciones étnicas la influencia de la insulina estaría anulada (47). En lo que sí parece existir acuerdo es en que cuando esta asociación se produce, existe un aumento de la morbi-mortalidad cardiovascular (48). Además, existen controversias acerca de si la resistencia a la insulina produciría cambios en el perfil circadiano de la presión arterial, en el sentido de provocar una ausencia o menor descenso de la caída fisiológica nocturna. Este hecho obedecería al aumento del tono simpático producido por la insulinemia (49). En un trabajo muy reciente, en sujetos de raza negra, la ausencia de caída nocturna de la presión arterial se relacionó inversamente con los niveles de insulina en ayunas ($R= - 0.18$; $P < 0.04$) y la presencia de resistencia a la insulina se acompañó de mayor daño en órgano diana (50).

Resistencia a la Insulina e influencia genética.

Se ha propuesto que el sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona puede mediar algunas de las relaciones entre la presencia de obesidad-resistencia a la insulina y el riesgo para el desarrollo de hipertensión arterial (51). La resistencia a la insulina se ha relacionado con mayores niveles plasmáticos de angiotensinógeno (52), mayor actividad de renina (51) y de aldosterona (53). A favor de esta relación, ha aparecido algún trabajo que demuestra como el tratamiento con inhibidores de la ECA está asociado con una mejoría de la sensi-

bilidad a la insulina (54). En cambio, la infusión de dosis bajas de angiotensina II incrementa la sensibilidad a la insulina (55); y los cambios nutricionales afectan llamativamente la expresión del gen del angiotensinógeno (56).

La influencia del polimorfismo I/D del gen de la ECA sobre la resistencia a la insulina permanece no aclarado. En un intento de aclarar esta relación, se han pusieron en marcha algunos trabajos donde se pudo comprobar como no existía relación entre el alelo D y la presencia de fenotipos sugestivos de resistencia a la insulina, sino más bien, el genotipo DD aumentaba la sensibilidad de la insulina hasta en un 132% respecto al genotipo II. En este trabajo se demuestra como los sujetos II presentaban mayores niveles de insulina y des 31,32 pro insulina, tanto en sujetos normales como en diabéticos no insulín-dependientes. Estos resultados parecen contradictorios ya que la relación entre el alelo D y patología cardiovascular está bien establecida (57).

En relación alelo I, existen trabajos de asociación que han puesto de manifiesto una relación consistente entre el alelo I y un incremento de la resistencia a la insulina. Cong et al (58) observa esta asociación en una población japonesa con el alelo I del gen de la ECA pero no con el gen del angiotensinógeno; al igual que Chiu y colaboradores (59) en una población negra americana, donde observan que los sujetos portadores del alelo I presentaban mayores niveles de insulina y precisan menores dosis de glucosa para mantener un estado de euglucemia tras un clamp euglucémico-hiperinsulinémico. En un trabajo reciente ha quedado definitivamente establecida la relación entre el alelo I y un deterioro de la sensibilidad a la insulina en sujetos hipertensos (60) y la falta de relación del alelo D con características típicas del síndrome metabólico como dislipemia, hipertensión arterial o intolerancia hidrocarbonada. En este trabajo también se encontró una relación positiva entre el alelo I y la presencia de hipertensión arterial aunque los estudios en los que esta asociación resultó negativa también existen (61).

Otros dos genes que se han buscado como candidatos para el desarrollo de resistencia a la insulina en pacientes hipertensos son la Apolipoproteína E y el receptor beta-3-adrenérgico. Respecto al polimorfismo de la Apo-E, recientes estudios han observado que la presencia de la isoforma Apo e4/e2, que es característica de pacientes con enfermedad coronaria, se asocia habitualmente con un incremento de la liberación de insulina tras un test de sobrecarga oral de glucosa en pacientes no obesos ni diabéticos (62). Este mismo grupo demostró como el alelo e4 se asocia tanto a hipertrigliceridemia y a una mayor liberación de insulina en sujetos hipertensos (63) y en pacientes con cardiopatía isquémica (64). Nuestro grupo siguiendo esta línea de investigación también pudo demostrar como los hipertensos esenciales hiperinsulinémicos (Insulina > 80 mU/L a los 120 minutos de la SOG) presentaban una mayor incidencia de genotipos con alelo E4 y la liberación de insulina estaba exageradamente aumentada en este subgrupo de pacientes (65).

El polimorfismo genético Trp64Arg del receptor beta-3 adrenérgico ha sido implicado en la

patogénesis de la obesidad, resistencia a la insulina, diabetes mellitus e hipertensión arterial. En el trabajo clásico de Widen et al (66) se demostró como los sujetos no diabéticos que presentaban este polimorfismo expresaban varias características fenotípicas del síndrome metabólico, como un aumento del índice cintura/cadera, intolerancia hidrocarbonada, hiperinsulinemia y presión arterial más elevada. En sujetos diabéticos, se demostró como la presencia del polimorfismo Trp64Arg se asociaba con un desarrollo más precoz de su diabetes (67). Posiblemente el mecanismo patogénico para implicar a este receptor con el desarrollo de resistencia a la insulina sería un aumento de la grasa abdominal y un descenso en la captación de ácidos grasos libres por el músculo esquelético. Estudios posteriores han puesto en entredicho la implicación del receptor beta-3-adrenérgico en la patogénesis de la resistencia a la insulina (68).

Otros genes que se han implicado en la patogénesis de la resistencia a la insulina han sido el gen de la lipoproteinlipasa (LPL) (69). En dicho trabajo Wu y colaboradores determinaron una región genética en el cromosoma 8, cerca del gen que codifica a la LPL, que se asociaba a mayores cifras de PA y a resistencia a la insulina como fenotipo intermedio. También el receptor 1 de la insulina se ha implicado en el desarrollo de RI y parece que podría existir una sinergia de los polimorfismos del receptor 1 de la insulina y del receptor beta-3 adrenérgico para el desarrollo de obesidad y otros factores de riesgo vascular, como así lo demuestran Benecke y colaboradores (70).

Finalmente señalar que uno de los motivos principales para estas discordancias en la relación resistencia a la insulina-polimorfismos genéticos podría obedecer a los diferentes métodos para evaluar la resistencia a la insulina y a la disparidad de criterios para determinar que sujeto presenta resistencia a la insulina y cual no. El método más utilizado ha sido el del clamp euglucémico-hiperinsulinémico según la variante de De Fronzo (71); este método reviste gran dificultad por su laboriosidad ya que se necesitan 2 a 3 horas para alcanzar el estado de equilibrio, además establece una situación poco fisiológica y puede sobrevalorar la sensibilidad a la insulina (72). Otro método propuesto para el diagnóstico de resistencia a la insulina, es el modelo Mínimo de Bergman (73), con el que hemos trabajado anteriormente pero los inconvenientes superan a las ventajas, ya que sigue siendo de difícil realización, precisa un software concreto para su interpretación y la reproducibilidad en estudios poblacionales es difícil de alcanzar.

El modelo actualmente más utilizado en la literatura por su fácil realización y por ser fácilmente reproducible es el método HOMA (HOMeostasis Model Assessment). Este modelo descrito por Matthews et al (74) en 1985, es un modelo computerizado del sistema feedback glucosa-insulina en el estado homeostático de equilibrio. Utiliza una serie de ecuaciones empíricas no lineales que son capaces de predecir las concentraciones de glucosa, insulina y péptido C en el estado de equilibrio en ayunas y de esta forma calcular el grado de funcionamiento de la célula beta y la sensibilidad o su inversa, la resistencia, a la acción de la insulina

(75). Este método puede ser utilizado en la práctica clínica y es el escogido por las mayoría de autores a la hora de estudiar muestras poblacionales, de la misma raza o en comparaciones con otras etnias, ya que su simplicidad se ha relacionado con resultados similares a los obtenidos con el clamp en estudios poblacionales (76). En un artículo reciente, se hace hincapié en la robustez y precisión del método HOMA como índice simple de determinación de sensibilidad a la insulina (77).

También se han descrito otros procedimientos para cuantificar la sensibilidad o la resistencia a la insulina pero no han tenido tanto éxito como el HOMA. Algunos de estos métodos están descritos en la tabla 2.

Contransporte Na^+/Li^+ como marcador de hipertensión arterial.

En pacientes con HTA esencial se ha demostrado un aumento de la actividad de este transportador, en relación a un aumento de su velocidad máxima (78, 79); incluso se ha descrito este aumento de actividad en normotensos y familiares en primer grado de hipertensos esenciales(80). Esta mayor actividad del transportador se mantiene tras

el CONTRA elevado tenían un riesgo del 60% para desarrollar hipertensión y junto a la edad y la presión arterial basal eran los mayores predictores para el desarrollo de hipertensión (83).

Además, existen evidencias que demuestran que el CONTRA es un factor pronóstico, de forma que los pacientes hipertensos con CONTRA elevado desarrollan mayor daño en órgano diana y un peor perfil cardiovascular (84). Mongeau et al (85) en un estudio longitudinal en niños y adolescentes hipertensos, encuentra que los que presentaban un CONTRA elevado, eran los de HTA más severa, tenían una tensión arterial media mayor que otros hipertensos con otras alteraciones del transporte, y tras 2 años de seguimiento, permanecían todos hipertensos. En hipertensos de reciente comienzo, una velocidad máxima aumentada del CONTRA se ha asociado a un mayor grado de hipertrofia ventricular y a un desarrollo más precoz de resistencia a la insulina en hipertensos de raza negra americanos (86). También se ha demostrado un mayor grado de retinopatía proliferativa en diabéticos e hipertensos (87), así como a un perfil metabólico más desfavorable en esta población (88).

	Normal	Insulin resistant	Diabetic
Fasting glucose (G_0) (mg/dl)	80	80	160
Fasting insulin (I_0) ($\mu\text{U/ml}$)	5	20	20
QUICKI	0.384	0.312	0.285
HOMA	1	4	8
1/insulin	0.20	0.05	0.05
G/I	16	4	8

QUICKI, 1/insulin, and G/I are indices of insulin sensitivity whose values should decrease with increasing insulin resistance. HOMA is an index of insulin resistance whose value should increase with increasing insulin resistance. QUICKI = $1/[\log(I_0) + \log(G_0)]$; HOMA = $(I_0 \times G_0)/22.5$ (glucose concentration in mM); 1/insulin = $1/I_0$; G/I = G_0/I_0 .

Tabla 2. Tomada de Quon MJ. J Clin Endocrin Metabol 2001; 86(10): 4615-4617.

corregir por otras variables como edad, raza o lugar de origen y estudios descriptivos recientes utilizando métodos de regresión logística, demuestran que los individuos con mayor CONTRA tienen una mayor predisposición para desarrollar HTA, por lo que se considera factor predictor para el desarrollo de ésta (81). Mediante estudios descriptivos en la población de Gubbio (82), se ha demostrado mediante análisis de regresión logística, que los individuos con actividad de CONTRA superior a 127 mmol/l cel/h⁻¹ tienen 1.23 veces más riesgo para desarrollar HTA, siendo éste un factor predictor del desarrollo de hipertensión. Esto ha quedado definitivamente demostrado en el estudio Olivetti, en el que el seguimiento de pacientes normotensos con acti-

En nuestro país es la alteración ligada a los transportadores de membrana más prevalente(89) y se asocia a otros factores de riesgo cardiovascular como la dislipemia, a través de una posible alteración en la composición lipídica de la membrana (90), también se ha relacionado con mayor cifras de glucemia e insulina basal (91), con resistencia a la insulina (92), con diabetes insulino dependiente (93) y con obesidad central (94). En estudios con hipertensos y nefropatía diabética, podría servir como un marcador de riesgo para el desarrollo de nefropatía en diabéticos tipo I y que el riesgo de nefropatía en diabéticos tipo I estaba asociado a una predisposición genética a la hipertensión (95,96). También se ha desarrollado negativamente con parámetros de funcionamiento

renal (97). Respecto a su relación con la resistencia a la insulina, parece bien establecido que los sujetos hipertensos, tanto obesos como no obesos, presentan una mayor actividad del CONTRA y mayores cifras de insulínemia y cociente insulínemia /glucemia basal que los controles (98).

También se ha relacionado con el perfil lipídico en plasma y con la composición lipídica de la membrana, ya que modificaciones en la composición de ésta, puede producir modificaciones en la actividad o funcionalidad de diferentes proteínas o transportadores de membrana; produciendo un cambio en su conformación o reduciendo la accesibilidad a sus sitios de unión específica al ión (99). A partir de los trabajos de Carr (100), que demuestra una relación entre la viscosidad de la membrana del hematíe y su relación con la composición de colesterol en un grupo de pacientes hipertensos con historia familiar de hipertensión; nuestro grupo ha demostrado que una disminución del movimiento transbica del colesterol modifica la actividad del CONTRA (101) y además, éste se relaciona positivamente con el tiempo de oxidación del colesterol de membrana (102). A favor a ésta relación, Carr et al (103) también demuestra que modificando las concentraciones plasmáticas de colesterol con tratamiento hipolipemiante, se reduce la actividad del CONTRA en pacientes hipertensos.

En estudios de epidemiología genética y genética molecular, se ha visto que dicha actividad está determinada genéticamente, al menos, parcialmente, ya que los hijos sanos de pacientes hipertensos presentan una mayor actividad del CONTRA que los hijos sanos de normotensos y además ésta activación se mantiene con el tiempo, incluso cuando las cifras de presión arterial han aumentado (104). Recientemente, estudios en hijos de hipertensos han confirmado que el CONTRA es un rasgo genético que predispone a la HTA, con independencia de otros factores como la resistencia a la insulina o la reactividad vascular (105). Estudios de genética molecular han caracterizado esta herencia como ligada a un locus mayor (106) y estudios recientes en mandriles, lo han localizado a nivel cromosoma 5 (107).

Nuestro grupo ha intentado localizar distintos polimorfismos que pudieran matizar esta actividad del transportador, y así recientemente estudiando el polimorfismo genético Trp64Arg del receptor Beta-3 adrenérgico, pudimos comprobar que los hipertensos con la mutación Trp64Arg presentaban variaciones en la actividad del CONTRA, aunque tras realizar un estudio de regresión lineal, estas alteraciones del CONTRA no se traducían en variaciones en las cifras de presión arterial (108). También hemos analizado la influencia del alelo E4 de la apoproteína E sobre la actividad de este transportador, si bien encontramos una mayor actividad asociada a dicho alelo E4, las diferencias no llegaron a ser significativas respecto a otros genotipos (109). Otros autores han intentado relacionarlo con el polimorfismo I/D del gen de la ECA, encontrando que pueden ser factores de riesgo independientes para el desarrollo de hipertensión (110). Otro gen que se ha relacionado con una mayor actividad del CONTRA en pacientes hipertensos es el polimorfismo 2-1 de la haptoglobina; lo que indica la gran

heterogeneidad genética de la hipertensión arterial (111). Finalmente, se sabe que la actividad de este transportador parece que está más determinado genéticamente en el hombre que en la mujer (112). Finalmente, comentar que a pesar de las relaciones establecidas entre actividad del CONTRA e hipertensión arterial y síndrome metabólico, existen claras diferencias en función del grupo étnico estudiado. Así cuando se comparan poblaciones de diferente localización geográfica los resultados son contradictorios. Ragone y colab. (113) encuentran en una población italiana, que en la actividad del CONTRA se relaciona positivamente con la presencia de HTA, obesidad y resistencia a la insulina; resultados que no se confirman en ese mismo trabajo al compararlos con una población asiática. Además también existen diferencias en las características cinéticas del transportador en la población negra americana frente a la caucasiana o la asiática (114).

La composición lipídica de la membrana plasmática en la hipertensión arterial.

3.1.- Estructura y función:

La membrana celular es una bicapa lipídica asimétrica en su composición de colesterol y fosfolípidos a los que se les unen diversas proteínas con diferentes funciones. Singer y Nicholson en 1972 (115) describen el modelo de mosaico fluido de la estructura de la membrana, en el que se ésta se encontraría es un estado de fluidez intermedia entre los estados sólido y líquido, denominado estado mesomórfico. Sobre esta bicapa lipídica estaría integradas o acopladas las diferentes moléculas proteicas, que cumplirían diversas funciones, entre ellas: transmitir información del exterior al interior de la célula, reconocimiento antigénico, citoestructura, aporte de sustancias para síntesis de prostaglandinas, transporte bidireccional de sustancias, etc. Diferentes estudios han demostrado como la bicapa lipídica y la composición de ésta es capaz de alterar o modificar las funciones y la actividad de estas proteínas.(116,117,118)

Los lípidos totales de la membrana comprenden alrededor del 40% de su peso; de éstos alrededor de la mitad consisten en colesterol no esterificado (40%) y la otra mitad son fosfolípidos (50%) y glucolípidos junto a ésteres de colesterol (10%). La distribución de éstos componentes no es simétrica, así el colesterol no se distribuye homogéneamente sino que actualmente se reconoce la existencia de zonas o *dominios* de colesterol que se caracterizan por la cantidad de colesterol, por la movilidad intramembrana y la facilidad para el intercambio con las lipoproteínas. Se han descrito 3 zonas de distintos comportamientos: un dominio con escaso colesterol pero con gran intercambio con el de las lipoproteínas, otro con la mayor concentración de colesterol y que tendría poco intercambio con las lipoproteínas plasmáticas y un tercero, con colesterol no intercambiable (119,120).

Por otra parte, los fosfolípidos se clasifican en función de su grupo polar, y también se distribuyen asimétricamente; así los que contienen colina, como la esfingomielina (SM) y la fosfatidilcolina (PC) se sitúan en la monocapa externa y los que contienen un grupo amino terminal, como la fosfati-

diiserina (PS) y la fosfatidiletanolamina (PE). La distribución y movilidad de éstos fosfolípidos son las que van a determinar la fluidez de la membrana.

3.2. Microviscosidad de la membrana plasmática:

La fluidez de la membrana, es decir el inverso de la microviscosidad, es una propiedad físico-química de la membrana que describe cuantitativamente el movimiento y la frecuencia de movimiento rotacionales de moléculas dentro de la membrana (121). Esta característica juega un papel fundamental en la modulación de funciones celulares tales como el comportamiento reológico o la microviscosidad (122). Se ha propuesto que una alteración en la fluidez o en la microviscosidad de la membrana sería un factor etiológico para el desarrollo de hipertensión (123,124). Alteraciones de la microviscosidad de la membrana habitualmente refleja cambios en su composición lipídica (125) o en la distribución de los fosfolípidos (126), que frecuentemente dependen del estado metabólico y nutricional. La microviscosidad también puede estar influenciada por el estado redox, la fosforilación de los componentes de la membrana, el pH local, las concentraciones de calcio o las proteínas del citoesqueleto.

Bajo condiciones fisiológicas, la microviscosidad de la membrana se incrementa cuando aumentan las concentraciones de colesterol, mientras el efecto opuesto se ejerce por cambios en el grado de insaturación de los fosfolípidos. La cantidad y naturaleza de los fosfolípidos (127), las interacciones lípido-proteína y los tipos de proteínas existentes (128) también son importantes para determinar la microviscosidad de ésta. De ésta forma la existencia de un cociente colesterol/fosfolípido elevado, se asocia a una mayor rigidez de la membrana y de éste modo disminuye la permeabilidad a moléculas solubles pequeñas (129,130).

A pesar de la capacidad de la célula para sintetizar o metabolizar lípidos, la composición de la membrana puede ser influenciada por un intercambio intensivo entre los lípidos plasmáticos y los de membrana. Sin embargo, parece que la microviscosidad está influenciada más por los triglicéridos plasmáticos que por los niveles plasmáticos de colesterol (131). Se ha observado una relación inversa entre los niveles de triglicéridos y las anisotropía medida por difenilhexatriene (DPH) en plaquetas y eritrocitos humanos (132). De igual forma, el cociente colesterol/fosfolípidos no se correlaciona con el colesterol sino inversamente con los triglicéridos plasmáticos (133).

3.3.- Lípidos plasmáticos y su relación con la composición de membrana y la actividad de transportadores de membrana:

Hay suficiente evidencia para asegurar que en humanos existe un intercambio de colesterol y fosfolípidos en plasma y a nivel de la membrana; de forma que los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos influyen en la concentración de colesterol y fosfolípidos de la membrana celular y por ende, en la presencia de una mayor o menor microviscosidad. Respecto a los triglicéridos, usando ratas con hipertrigliceridemia hereditaria, Devynck

et al (134) demostraron una relación directa negativa entre los niveles de triglicéridos y la presencia de una mayor anisotropía medida por fluorescencia. Así se ha podido documentar como los triglicéridos plasmáticos y el colesterol-VLDL se relaciona con el cociente PC/SM y PC/PE de la membrana (135) y de forma inversa con el cociente colesterol/fosfolípidos. En una serie de nuestro grupo de sujetos hipertensos-hiperlipémicos, demostramos como la presencia de hipertrigliceridemia se correlaciona positivamente con el cociente PC/PE y a su vez, con la actividad del contra transporte sodio/litio (136).

El colesterol de la membrana del eritrocito también es intercambiable con el colesterol del plasma. En ese sentido se ha encontrado una correlación positiva y directa entre el contenido de colesterol en la membrana plasmática y el colesterol LDL (137), tanto en eritrocitos de animales (138) como en humanos (139). Nuestro grupo y otro autores han podido documentar en sujetos hipercolesterolémicos, una diferente concentración de fosfolípidos de membrana, con una mayor proporción de PC, PE y SM (140,141); aunque en este último trabajo se encontró una correlación positiva con el Colesterol-VLDL. La influencia del colesterol plasmático en la composición de membrana, queda fuera de toda duda, cuando pacientes hipercolesterolémicos que son sometidos a tratamiento hipolipemiente con estatinas, presentan un descenso de la relación colesterol/fosfolípidos (142,143), reduciéndose el colesterol de membrana y de esta forma, mejora la fluidez de la membrana. Finalmente, estas modificaciones en la composición de membrana determina una mayor o menor actividad de los sistemas de transporte iónico monovalente en la membrana del eritrocito. Su actividad está incrementada en eritrocitos de sujetos hiperlipémicos o hipertensos (144,145) y puede ser reducida con tratamiento o bien por intervenciones dietéticas (146,147). Nuestro grupo encontró en una muestra de hipertensos de nuestra área una relación inversa entre la actividad del CONTRA y el contenido en ácido grasos poliinsaturados y en la cantidad y distribución del colesterol de membrana (148) (Tabla 3). También se han encontrado alteraciones en otros transportadores de membrana como el co-transporte Na-K-2Cl, en la bomba Na-K o en la difusión pasiva de sodio.

3.4.- Composición Lipídica e Hipertensión arterial:

Se han reportado, tanto en hipertensión en humanos (149) como en hipertensión experimental (150), alteraciones del contenido en colesterol o fosfolípidos de membrana y diferencias en las distribución de fosfolípidos o en el grado de saturación de los ácidos grasos. Estos cambios en la composición lipídica de la membrana puede modular la función de ésta y a largo plazo, contribuir a una regulación anormal de la presión arterial. Estudios previos indican un aumento de la microviscosidad en distintas células de ratas espontáneamente hipertensas (151) y en pacientes con hipertensión arterial (152). Estos cambios están ausentes en ratas y en pacientes con hipertensión secundaria (153).

Numerosos autores defienden la hipótesis de que

	TG	COL	PL	HDL-COL
Corrocher et al	+	++	+	NS
Duhm and Behr	+++	++		-
Hunt et al	+++	++		---
Corrocher et al	+++	++	+++	
Hespele et al	+	NS		NS
Carr et al	+++	++		-
Hajem et al	NS	NS		NS
Linen et al	+	NS	+	NS

Tabla 3. TG, triglicéridos. CHOL, colesterol. PL, fosfolípidos, HDL-COL, colesterol-HDL. +, ++, +++: correlación positiva. -, --, ---: correlación negativa. NS: no significativo. Tomado de Zicha et al. AJH 1999; 12: 318.

los pacientes hipertensos presentan un mayor porcentaje de colesterol en sus membranas, lo que conlleva una mayor rigidez de éstas. En este sentido, Aneschi et al (154) al comparar mujeres con hipertensión gestacional con embarazadas sanas, encontraron un mayor cociente colesterol/fosfolípidos en las primeras, por lo que concluyen que el aumento de colesterol de membrana puede estar ejerciendo un papel decisivo en la fisiopatología de la hipertensión arterial. Estos resultados también se han encontrado en mujeres menopáusicas (155). En ese sentido nuestro grupo, encontró en un subgrupo de pacientes hipertensos una mayor proporción de colesterol de membrana y de ácidos grasos saturados, confiriendo a estos pacientes una mayor viscosidad (140). En otro trabajo dirigido por Villar (148), se pudo comprobar una correlación entre éste aumento de la composición de colesterol con las concentraciones plasmáticas de triglicéridos. Posteriormente estudios en sujetos hipertensos normolipémicos han encontrado también distintas concentraciones de colesterol y alteraciones en la cinética del colesterol en la membrana (156).

En animales genéticamente hipertensos, se ha encontrado también una distribución anormal de fosfolípidos de membrana. Estudios previos en membranas modelos y biológicas han mostrado que la menor fluidez de la membrana también podría estar asociada con un menor cociente fosfolípidos/colesterol libre (PL/FC), PC/SM y cociente insaturados/saturados. En un trabajo reciente, el grupo de Ruiz-Gutiérrez(157) encontró un descenso de éstos y un aumento de CCL; SM y PE en ratas genéticamente hipertensa SHR. Estos cambios se tradujeron en cambios en el transporte de D-glucosa a través de la membrana del túbulo contorneado proximal renal de estas ratas. Otros autores

han encontrado diferentes alteraciones en la composición de PC y PE en ratas SHR (158, 159).

En resumen, parece bien documentado que los pacientes hipertensos presentan una diferente composición lipídica de membrana a expensas fundamentalmente de un aumento de colesterol de membrana y una mayor microviscosidad de ésta; y que diferentes mecanismos como la hiperinsulinemia o bien las concentraciones plasmáticas de lípidos podrían participar activamente en estas alteraciones moleculares. La participación de una diferente fluidez de la membrana en la fisiopatología de la hipertensión está por dilucidar aunque están demostrados cambios en actividad de los transportadores de sodio. La influencia de diferentes polimorfismos en estos aspectos está poco estudiado.

Polimorfismos del gen de la ECA e HTA y otros aspectos de patología cardiovascular.

El sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) es el factor regulador clave de la presión sanguínea y de la homeostasis de líquidos y electrolitos en el organismo. El producto final de esta cascada enzimática es la Angiotensina II, y la unión de ésta a su receptor, da lugar a vasoconstricción y a liberación de catecolaminas y aldosterona. La liberación de aldosterona lleva a la retención de agua y sal a nivel renal, a través de un incremento en la actividad del canal de sodio epitelial en el tubo contorneado distal. Existe un interés justificable en enfocar las bases genéticas de la hipertensión sobre este sistema, ya que algunas formas monogénicas de hipertensión son debidas a genes que están implicados en la síntesis de aldosterona o que afectan a la vía donde ésta actúa. Por otra parte, un tercio de los pacientes hipertensos se presentan con niveles bajos de renina e inapropiadamente elevados de aldosterona, por lo que disturbios en este sistema podrían estar implicado en el desarrollo de presión arterial elevada. Y finalmente, en modelos animales de hipertensión, se han constatado alteraciones en las concentraciones de renina, angiotensinógeno, enzima convertidora de angiotensina (ECA) o aldosterona.

El polimorfismo más ampliamente descrito dentro del SRAA ha sido el I/D del gen de la ECA. Esta enzima es una dipeptil-carboxipeptidasa que convierte angiotensina I en angiotensina II e inactiva un vasodilatador potente como la bradiquinina. La gran variedad de efectos cardiovasculares mediados por estos péptidos vasoactivos y la eficacia de los inhibidores de la ECA en el tratamiento de la hipertensión y la insuficiencia cardiaca enfatizan el papel preponderante de esta enzima en el sistema cardiovascular. Este polimorfismo consiste en la presencia (inserción-I) o bien ausencia (delección-D) de un fragmento de DNA de 287 pares de bases a nivel del intrón 16, locus 17q23 (160); siendo los genotipos posibles DD, ID ó II y es el responsable de la mitad de la variación interindividual de los niveles de ECA. Los primeros estudios demostraron una fuerte correlación entre el alelo D y los niveles circulantes (161), intralinfocíticos (162) e incluso con niveles intracardíacos de la ECA, en el sentido que los homocigóticos caucásicos con genotipo DD tenían una mayor actividad y niveles de la ECA que los homocigóticos II con un nivel intermedio en

los heterocigóticos, sugiriendo una herencia co-dominante y condicionando niveles mayores de Angiotensina II tanto plasmáticos como tisulares; con todas las acciones fisiopatológicas que de ello se derivan a nivel orgánico (163). La influencia de este polimorfismo en el desarrollo de HTA ha sido difícil de explicar en la literatura y los resultados de los trabajos han sido conflictivos e incluso contradictorios. En uno de los primeros trabajos, Zee et al (164) describieron una mayor proporción de homocigóticos II en un grupo de hipertensos esenciales frente a controles. Posteriores estudios no han podido demostrar una relación entre el polimorfismo I/D con la presencia o no de HTA(165,166,167). A pesar de estos resultados, han seguido surgiendo estudios multivariantes como el de Hingorani et al (168), en el que se demuestra un efecto del genotipo de la ECA sobre la presión sanguínea en hipertensos esenciales, siendo el alelo I el que se correlacionaba con niveles más altos de presión arterial, resultados que no fueron confirmados utilizando como metodología de medida de presión arterial, el registro ambulatorio de presión arterial (169).

Aunque los estudios de ligamiento discrepaban respecto a la asociación del gen de la ECA con la HTA, posteriormente dos grandes trabajos lo han confirmado. Uno de ellos el estudio Framingham, incluyendo a 3095 individuos para los que la presión arterial diastólica ajustada por edad fue 81.6, 80.9 y 79.6 mmHg para los genotipos DD, DI o II, respectivamente. Al analizar la población total, no se encontró ninguna relación. Sin embargo, al estratificar por sexo la población en estudio se observó que los hombres con genotipo DD mostraban un riesgo relativo de desarrollar HTA de 1,5 pero no en las mujeres (170). Estos resultados coinciden con los de los experimentos realizados en ratas *knock-out* en las que el efecto se apreciaba sólo en los animales macho, no así en las hembras. En otro estudio más reciente, el estudio SUITA (171), demostró en una población de 14200 japoneses, que la frecuencia del genotipo DD (17,1%) en los hipertensos era significativamente mayor ($p < 0,0015$) que en aquellos con una HTA ligera o normotensos, a pesar que la frecuencia de DD fue muy inferior a la descrita en sujetos de raza blanca. La prevalencia estimada por Odds-ratio para hipertensos entre los portadores del alelo D fue de 1.75 (IC 95%:1.21-2.53), asociación que no se confirmó par las mujeres (OR de 1.17, CI 95%:0.79-1.72). Además se ha podido demostrar en una población similar como el alelo D predispone al desarrollo más precoz, a edades más tempranas, de hipertensión y con desarrollo precoz de daño en órgano diana (172) y es un factor de riesgo para el inicio de desarrollo de hipertensión maligna(173).

En cambio los estudios realizados en nuestra área para demostrar esta asociación, no han sido tan concluyentes. Nuestro grupo no encontró ninguna asociación entre los distintos genotipos del gen de la ECA y la HTA en una población mediterránea. No encontramos relación entre el alelo D y la existencia de hipertrofia ventricular izquierda, aunque sí con la existencia de antecedentes familiares de HTA. Un dato contradictorio en el presente estudio es que encontramos una relación significativa entre el genotipo II y una mayor presencia

de episodios cardiovasculares, a expensas de mayores eventos cerebrovasculares, sin diferencias en la presentación de episodios de cardiopatía isquémica (174).

Otros estudios realizados en nuestra área encuentran resultados similares(175), sin bien en alguno relaciona el alelo D con los niveles de ECA (176) o con un descenso marcado en la caída nocturna fisiológica de la PAS, cuando se estudian los hipertensos con monitorización ambulatoria de la PA (MAPA) (177).

Polimorfismo I/D y regulación de la presión arterial.

Hay varias razones para considerar al gen de la ECA como un gen candidato para el control y desarrollo de hipertensión arterial. En un estudio en ratas espontáneamente hipertensas, el locus que determinaba con más fuerza hipertensión arterial estaba localizado en cromosoma 10 muy cerca del gen de la ECA (178) y esta región era homóloga al cromosoma 17q, que es donde se encuentra el gen de la ECA. Sin embargo, los estudios que han intentado correlacionar la actividad de la ECA o la presencia de un determinado genotipo del gen de ésta con la presencia de hipertensión arterial no han sido concluyentes (179,180). Sin embargo, algunos estudios han sugerido que el alelo D podría contribuir al desarrollo de HTA en algunas poblaciones como en los americanos de origen africano (181). Recientemente O'Donnell y colaboradores (182), en una cohorte de 3095 participantes procedentes del estudio Framingham encontraron una asociación significativa entre el alelo D y la presencia de HTA. Los análisis de regresión lineal demostraron una Odds-ratio para hipertensión entre los hombres homocigóticos para el alelo D, de 1.59 (Intervalo de confianza del 95%:1.13-2.25); pero no encontraron asociación entre las mujeres. Este estudio analizó también un marcador microsatélite que se asocia al gen de la hormona de crecimiento humana (hGH) y la asociación de ambos se relacionó significativamente con la presión arterial diastólica, no con la sistólica, en los hombres.

En contradicción a las evidencias anteriormente expuestas, en un estudio en 357 familias francesas y del Reino Unido, se describieron 2 marcadores fuertemente relacionados con el desarrollo de hipertensión, el D17S183 y el D17S934, localizados en el cromosoma 17, a 17 centimorgans del locus del gen de la ECA, pero sin contenerlo (183). Así el cromosoma 17q parece contener un importante locus que determina el desarrollo de HTA pero parece que no se trata del locus de la ECA. Muchos genes han sido localizado en esta región genómica pero ninguno de ellos se han asociado a HTA; entre ellos, los genes candidatos que se localizan en el intervalo génico 17q 12-21 incluyen el receptor alfa-1 tiroideo, el homólogo neuronal del receptor epitelial de sodio sensible a amiloride, intercambiador sodio/bicarbonato AED1, o el receptor 1 del factor liberador de la hormona de crecimiento, entre otros (184).

Otra evidencia en contra del papel del gen de la ECA como regulador de la presión, la defiende Krege et al (185) en un trabajo realizado en ratones que sobreexpresaban el gen de la ECA, no en-

cuentra un aumento de las cifras de presión arterial a pesar de cifras muy elevadas de ECA. Por tanto, queda por dilucidar si el gen de ECA tiene un papel protagonista como determinante de HTA.

Fenotipos intermedios para el polimorfismo I/D

Aunque el alelo D es el mayor determinante séricos de los niveles de ECA, ha sido más difícil de identificar un fenotipo intermedio de este polimorfismo, por ejemplo un efecto fisiológico, que podría relacionarlo con la enfermedad cardiovascular. Ueda et al (186) encontró que los niveles séricos de Angiotensina II tras la infusión de Angiotensina I eran mayores en normotensos DD que en sujetos normotensos II y que la dosis necesaria para incrementar la presión arterial 20 mmHg fue más baja. Esta respuesta fue en sujetos depleccionados de sodio lo que podría indicar que el polimorfismo es más importante en situaciones en las que el eje RAA está activado.

Otro estudio analiza la influencia del genotipo I/D sobre la capacidad contráctil de anillos de mama interna *in vitro* (187). La respuesta contráctil a la Angiotensina I fue superior en los pacientes con genotipo DD y DI comparados con los homocigóticos II. También había sensibilidad significativamente menor al vasodilatador dependiente del endotelio metacolina en los pacientes con el alelo D, sugiriendo que la liberación estimulada endotelial de óxido nítrico (NO) era más baja. Por el contrario, el aumento de contracción estimulada por fenilefrina en presencia de LNMMA (n-nometil-arginina), un inhibidor de la óxido nítrico sintetasa, fue mayor, sugiriendo una secreción basal mayor de NO en aquellos que poseían el alelo D.

Por último otro estudio investiga la vasodilatación inducida por acetilcolina en el antebrazo de sujetos normotensos e hipertensos (188). En los sujetos hipertensos DD, la acetilcolina produjo menos vasodilatación cuando se compara con los hipertensos ID y DD tomados juntos. Aunque estos resultados iniciales son persuasivos, se puede debatir si el análisis basado en la combinación ID frente a los homocigóticos DD es apropiada, ya que los alelos eran codominantes. Así aunque el alelo D se asocia indudablemente a una mayor actividad de la ECA, evidencias que demuestren que esto lleva a cambios sustanciales en la biodisponibilidad tisular son limitadas.

La disfunción endotelial es considerada un fenotipo intermedio para el desarrollo de hipertensión arterial y arteriosclerosis; y también se ha demostrado una relación directa entre la presencia de un genotipo del gen de la ECA y la existencia de disfunción endotelial medida por vasodilatación dependiente del endotelio. Así, Arcaro et al (189) demostró en 92 sujetos sanos, como la presencia del alelo D se asociaba a una caída llamativa de la vasodilatación dependiente del endotelio medida en la arteria femoral mediante doppler; mientras la vasodilatación independiente del endotelio no se modificaba con por el genotipo de la ECA. También se han encontrado alteraciones metabólicas asociadas al alelo D; que se podrían considerar fenotipos intermedios; así se ha encontrado que los niveles plasmáticos de LDL pueden estar condiciona-

dos por el alelo D, de forma que los sujetos homocigóticos para dicho alelo tendrían mayores niveles de LDL-colesterol y estos niveles se relacionan positivamente con las cifras de presión arterial (190). También a nivel cardiaco, el alelo D se ha mostrado como un predictor del peso cardiaco; Nakahara et al (191), demuestran que el peso cardiaco fue superior en los sujetos con genotipo DD (249.9 ± 49.9 g/m²) que en aquellos con genotipo ID o II (230.0 ± 51.2 g/m²; P < 0.05).

Otro fenotipo asociado a la presencia de HTA es la existencia de Resistencia a la Insulina (RI). Además, de su influencia en el desarrollo de las cifras de presión arterial elevadas, el sistema RAA parece que puede influir en otros aspectos de la patogénesis del síndrome metabólico, tales como la presencia de arteriosclerosis o resistencia a la insulina. Existen estudios que relacionan al polimorfismo I/D del gen de la ECA (192) y al gen del angiotensinógeno con el desarrollo de resistencia a la insulina o diabetes (193). Por otro lado, el tratamiento con IECAS ha demostrado que reduce las frecuencias de ambas entidades (194,195). Parece que estos fármacos reducen el incremento de la lipólisis en tejido adiposo en hipertensos con obesidad central, sin embargo, no se pudo determinar si se debía a una disminución de los niveles de angiotensina II o bradiquinina (196).

En este sentido, existe suficiente evidencia que relacionan al alelo I del gen de la ECA con índices de resistencia a la insulina incrementados, tanto en diabéticos como en no-diabéticos de diferentes razas, caucasianos o negros americanos (197, 198). Aunque también existen trabajos recientes, que de forma contraria a los anteriores, han relacionado al alelo D con mayor grado de insulín-resistencia. Así, Huang et al (199), observaron en pacientes con diabetes tipo 2, que los sujetos homocigóticos DD tenían mayores niveles de glucosa sanguínea y más intolerancia a la glucosa medida tras sobrecarga oral de glucosa, que aquellos con genotipo ID o II. Entre los sujetos no diabéticos no encontraron diferencias en estos parámetros. Por otra parte, muy recientemente, Perticone y colaboradores (200), muestran en una muestra de hipertensos no tratados farmacológicamente como el alelo D se relaciona con más niveles basales de insulina y con una insulín-resistencia más marcada, determinada por método homeostático (HOMA). También existen estudios en los que no se ha encontrado relación entre el polimorfismo I/D e insulín-resistencia en sujetos hipertensos aunque en poblaciones orientales (201,202). Por tanto, actualmente la asociación entre el polimorfismo del gen de la ECA y la existencia de resistencia a la acción de la insulina en sujetos hipertensos sigue siendo controvertida.

En otros grupos de riesgo vascular también se ha estudiado el gen de la ECA, como en los obesos, intentando buscar un nexo de unión entre la intolerancia a la glucosa y el desarrollo de arteriosclerosis. En un grupo de 66 mujeres obesas, se ha podido demostrar como el alelo D se asociaba a un mayor grado de resistencia a la insulina medido por la técnica del clamp euglicémico y una mayor probabilidad de desarrollar diabetes mellitus, comparado con la presencia del alelo I (203). En otro grupo

étnico, en una cohorte de indios Pima, que presentan una baja incidencia de enfermedad coronaria, a pesar de una alta prevalencia de diabetes mellitus; se encontró una correlación entre los niveles de la ECA con parámetros de resistencia a la insulina, con hipertrigliceridemia y mayores cifras de presión arterial; por lo que los autores concluyen que los niveles elevados de ECA pueden ser el nexo de unión entre la resistencia a la insulina y la enfermedad coronaria.(204).

Polimorfismo I/D y enfermedad cardiovascular

La relación de este polimorfismo con diversos subgrupos de pacientes hipertensos y con diversos factores fenotípicos de enfermedad cardiovascular arteriosclerótica ha sido amplia, con resultados también contradictorios en este aspecto. En relación a este, sí se ha descrito una relación entre el genotipo DD con diversos subgrupos de pacientes hipertensos como los hipertensos diabéticos (205), con el subgrupo de diabéticos no insulino-dependientes(206) y en el caso del genotipo II con el subgrupo de hipertensos sensibles a la sal (207). También el genotipo DD se ha asociado a una constelación de factores de riesgo cardiovascular y daño en órgano diana arteriosclerótico: cardiopatía isquémica con expresión de IAM en adultos (208,209) y en una población joven de nuestro entorno (210); hipertrofia ventricular izquierda (HVI) (211,212), HVI en miocardiopatía hipertrófica (213), arteriosclerosis carotídea (214), muerte súbita (215), enfermedad coronaria en pacientes sin factores de riesgo "clásicos" (216), ictus en hipertensos (217), microalbuminuria o nefropatía en pacientes diabéticos tipo 1 (218) y empeoramiento de la función renal en diabéticos tipo 2 (219). En una población similar a la nuestra, se observó que la proporción de sujetos con genotipo DD fue superior a otras series de pacientes de raza blanca y además, la presencia de microalbuminuria en pacientes hipertensos tiende a ser mayor y se relaciona con los valores de presión arterial en aquellos con el genotipo homocigótico para el alelo D (220). Todo ello apunta a que el genotipo DD se asocia a un mayor daño orgánico por mayor actividad del SRA a nivel tisular y por tanto a un peor pronóstico cardiovascular, e incluso, en hipertensos. Se ha demostrado como factor de riesgo de muerte prematura a medida que avanzan los grupos de edad (221).

Un aspecto a considerar a la vista de este estudio, es que los sujetos hipertensos con genotipo DD deberían recibir un tratamiento antihipertensivo más enérgico para prevenir el deterioro de la función renal; ya que parece que el alelo D confiere una menor protección frente a los inhibidores de la ECA (222). Esto es así porque los sujetos con alelo D tienen una mayor actividad de la ECA (223) y por tanto mayor generación de angiotensina II, como así demuestra Ueda et al (224), al infundir exógenamente angiotensina I. En este sentido también existen datos contradictorios ya que otros autores al analizar la respuesta al tratamiento de los diferentes alelos no encontraron diferencias estadísticamente significativas (225,226). Por otra parte, también se ha demostrado recientemente, como el polimorfismo I/D es capaz de predecir la respuesta

hipotensora a los inhibidores de los receptores AT-1 de la angiotensina II. Kurland y colaboradores (227) demuestran como el alelo I se relaciona con un mayor descenso de la presión arterial diastólica frente al alelo D en hipertensos tratados con irbesartan en comparación con atenolol. Ni el polimorfismo A1166C del receptor AT-1 de la A-II ni el polimorfismo del gen del angiotensinógeno fueron capaces de predecir esta respuesta.

Posteriormente han aparecido otros estudios en los que los resultados son contradictorios. Algunos de estos, como el de Lindpaintner et al (228) no encuentran relación entre dicho genotipo y el riesgo para padecer cardiopatía isquémica o IAM, tampoco se observa asociación entre el genotipo DD y la masa ventricular determinada ecocardiográficamente, ni supone un incremento del riesgo para HVI en un estudio realizado por el mismo grupo de investigadores a partir de los datos del estudio Framingham (229). En cualquier caso un metaanálisis reciente sobre 145 trabajos con una muestra de 49.959 sujetos llega a la conclusión de que el alelo D se asocia a un mayor riesgo de padecer complicaciones arterioscleróticas y microvasculares renales: enfermedad coronaria, IAM, ictus, enfermedad renovascular, nefropatía diabética y reestenosis tras angioplastia; y no se encuentra relación con HTA, miocardiopatía dilatada o hipertrófica, HVI ni retinopatía diabética (230). Muy recientemente, un estudio parece haber disuelto todas estas dudas, al demostrar en varones blancos caucásicos, que el genotipo DD contribuye independiente de la edad y otros factores de riesgo vascular a la presencia de hipertensión arterial (OR:1.8; IC:1.2-5.4) y que en presencia de cifras normales de LDL-colesterol, los genotipos DD e ID se asociaron a una historia personal de infarto de miocardio (OR:2.2;IC:1.1-4.4) (231). Este estudio, al igual que otro más reciente(232), no demostró que el polimorfismo I/D fuese un marcador predictivo para la presencia de aterosclerosis carotídea o cerebral.

Finalmente, en la tabla 4 aparecen las asociaciones que parecen haberse demostrado definitivamente con el polimorfismo I/D del gen de la ECA.

Un aspecto a considerar en todos estos trabajos, es que existen diferencias étnicas con respecto a la distribución de los distintos genotipos, que pueden matizar los resultados obtenidos y que hay que tener en cuenta a la hora de la valoración de los mismos, por lo que habría que enfatizar en la importancia de usar poblaciones homogéneas en dichos estudios (233). Por ejemplo, el polimorfismo I/D del gen de la ECA mostró una relación significativa con la hipertensión arterial en poblaciones americanas de origen africano, pero no en europeos (234). Esto podría ser explicado en parte por que el polimorfismo I/D está en desequilibrio de unión con otros 17 polimorfismos simples de nucleótidos en el gen de la ECA. Algunos de estos polimorfismos simples podrían ser funcionalmente activos y sus frecuencias podrían variar significativamente entre las distintas poblaciones. En este sentido, Williams et al, corroboran esta hipótesis al analizar la interacción de 4 locis candidatos en diferentes genes (ECA, angiotensinógeno y receptor

tipo 1 de la angiotensina) y comprobaron que, si bien aisladamente ninguno se asociaba a HTA, al menos 16 combinaciones multilocus se encontraban en equilibrio en el grupo de hipertensos y concluyen que muchos resultados negativos de estudios de análisis de un solo locus en hipertensos, se deben a la presencia de interacciones entre múltiples genes que forman parte de un complejo sistema homeostático que predispone al individuo a te-

HP tipo III, hay un acumulo de partículas remanentes de quilomicrones y colesterol cargado de VLDL, dando lugar a un aumento de triglicéridos con colesterol LDL bajo en los sujetos portadores del alelo e2 respecto a los sujetos con alelo e3 (245). Por otro lado, se ha descrito una mayor incidencia del alelo e2 en sujetos hipertrigliceridémicos (246) y los sujetos E2/E3 especialmente tienen una relación VLDL-/triglicéridos elevado, como marcador de en-

TABLA 4. ASOCIACIONES RELEVANTES DEL GEN DE LA ECA

- HTA esencial (sólo en hombres.)
- Fenotipos asociados a HTA: sensibilidad a la sal, lesión endotelial, resistencia a la insulina.
- Complicaciones de la HTA: HVI, microalbuminuria, nefroangioesclerosis.
- Cardiopatía isquémica, antecedentes familiares de IAM, reestenosis coronaria, miocardiopatía hipertrofica.
- Accidente vascular cerebral, estenosis de arterias extracraneales.
- Nefropatía diabética, progresión de la insuficiencia renal crónica.

ner la presión arterial elevada (235.)

Polimorfismos del gen de la apo-E, hipertensión arterial y enfermedad cardiovascular.

La Apo-E es una proteína, sintetizada en el hígado, que forma parte de diversas lipoproteínas ricas en triglicéridos y su función principal es el aclaramiento por parte del hígado de éstas lipoproteínas ricas en triglicéridos (VLDL y remanentes de quilomicrones) mediante su papel como ligando de los receptores hepáticos de LDL y sobre todo del receptor de remanentes de lipoproteínas (LRP) o receptor de la Apo-E (236). Es polimórfica y su variación se relaciona con parte de la variación inter poblacional de los niveles de colesterol (237). Recientes evidencias apuntan a que no sólo influye en la absorción de colesterol de la dieta(238) y el aclaramiento de los lípidos de ésta (239) sino que también contribuye al proceso arteriosclerótico (240).

El gen de la apo-E está localizado en el cromosoma 19 y exhibe un polimorfismo genético con 3 alelos codominantes (e2, e3 y e4), que codifican las 3 principales isoformas de la apo-E (E2, E3., E4) y dando lugar a 6 posibles fenotipos plasmáticos. La isoforma E3 es la forma normal de la proteína y el fenotipo E3/E3 es el más frecuentemente encontrado, aproximadamente en el 60% de la población general caucásica(240,241). Estas isoformas difieren en la sustitución de aminoácidos en los residuos del 112 al 158 (Fig. 2.)

La apo E2 tiene una menor afinidad por el receptor hepático de LDL que la E3 y E4; es aclaramiento del plasma menos eficazmente que la E3 (242) y ésta a su vez, menos que la E4 (243). La presencia de enfermedad coronaria y arteriopatía periférica en pacientes con hiperlipoproteinemia (HP) tipo III fue el primer indicio del potencial aterogénico de la apo E. Así los sujetos con fenotipo E2/E2 pueden desarrollar niveles elevados de colesterol y triglicéridos en presencia de otros factores concomitantes como obesidad, diabetes, hipotiroidismo, etc (244). En la

riquecimiento por VLDL del colesterol. Todos estos datos apuntan que la presencia del alelo e2 de forma homocigótica (e2/e2) es la causa subyacente de la HP tipo III cuando se combina con un segundo "hit" como diabetes o hipotiroidismo (247). Este fenotipo displipémico se asocia a enfermedad coronaria y vascular periférica (aproximadamente el 0.01-0.02% de la población) aunque por otra parte, dado la asociación del alelo e2 con niveles bajos de colesterol-LDL, se le han atribuido propiedades anti-aterogénicas.

En contraste con la apo E2, la apo E4 se

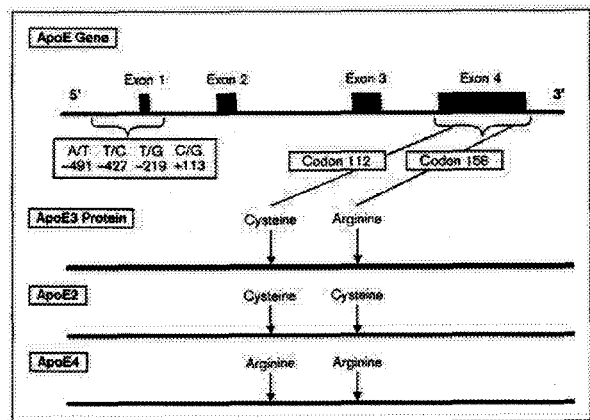


Figura 2.

asocia con mayores niveles de colesterol-LDL que la apo E3 (236), y puede además conllevar un aumento del riesgo relativo de arteriosclerosis. El alelo e4 de la Apolipoproteína E aparece en aproximadamente el 30% de la población general (248). Los sujetos heterocigóticos para el alelo (E3/E4) tienen niveles de colesterol un 10 % más elevados que los homocigóticos para el alelo e3 a causa de un efecto alélico diferente sobre el turnover de las lipoproteínas. La base molecular para esta diferencia entre apo E2 y apo E4 sigue siendo especulativa. Se sabe que los quilomicrones

producidos tras la absorción de la grasa de la dieta, adquieren apo E de las HDL circulantes y progresivamente son catabolizadas por la lipoproteinlipasa, perdiendo apo C y formando partículas remanentes más pequeñas, que son captadas por el receptor de apo E a nivel hepático (249). Mientras que los remanentes de quilomicrones que portan apo E4 en una superficie (fenotipo E4/E3) son aclarados más eficazmente, aquellos quilomicrones con apo E2 (fenotipo E3/E2) son eliminados con más dificultad que los sujetos con fenotipo E3/E3 (238). Por tanto, se puede hipotetizar que los remanentes-E4 son tomados con más avidez por el receptor hepático de apo E, que las partículas-E2, contribuyendo a un aumento del pool intrahepático de colesterol y regulando a la baja el receptor de LDL; y consiguiendo de esta forma, incrementar los niveles plasmáticos de LDL-colesterol (250). Además, es posible que alcance el hígado más cantidad de colesterol en sujetos portadores del alelo e4, ya que en ellos la absorción del colesterol de la dieta es mayor (239), haciendo todo ello, que el número de receptores de LDL disponibles sea menor en estos sujetos.

Estudios poblacionales, tanto en niños como en adultos han mostrado que los sujetos portadores del alelo e4 tienen un perfil lipoproteico más aterogénico, principalmente debido a un aumento de los niveles de LDL-colesterol (251,252). En el Framingham Offspring Study las isoformas de apo E sólo fueron responsables del 1% de la variación del colesterol LDL en varones y mujeres premenopáusicas y del porcentaje de mujeres posmenopáusicas (253). Cuando se estudia el efecto de Apo E sobre diferentes poblaciones, se observa que la relación es homogénea entre los grupos étnicos aunque la amplitud del efecto difiere entre ellas (254). En un estudio de casos y controles analizando población mediterránea, se pudo comprobar como el alelo e2 se asociaba a una reducción de 3 veces en el riesgo de desarrollar hipercolesterolemia moderada, mientras que el alelo e4 se asoció a un aumento del riesgo de 3 veces (255). Esta asociación del fenotipo de la apo-E con los niveles de LDL-colesterol es significativamente mayor en mujeres posmenopáusicas que premenopáusicas o en varones, lo que sugiere un posible papel de las hormonas sexuales modulando dicha relación (253). En cuanto a la relación del polimorfismo de la apo-E con las concentraciones plasmáticas de triglicéridos, en un reciente metaanálisis de 147999 sujetos de 45 poblaciones diferentes en 17 países se encontró que además de aumentar los niveles de LDL-colesterol, el alelo e4 de la apo-E puede mediar el aumento de riesgo cardiovascular que supone su presencia, produciendo un descenso de las concentraciones de HDL-colesterol y un aumento de los niveles plasmáticos de triglicéridos (254). Estudios posteriores parecen haber confirmado esta asociación (256). No está claro si las concentraciones de lipoproteína (a) están influenciadas por el fenotipo de la apo-E. De Kniff et al (257) encontraron que el fenotipo E4 se asociaba a mayores niveles de Lp(a) y en el estudio EARS, se encontró una relación entre niveles bajos de Lp (a) y el alelo e2 (258). Posteriores estudios no han confirmado esta asociación (253).

En relación a este perfil lipídico más desfavorable, se ha encontrado una mayor proporción de alelo e4 en pacientes con enfermedad coronaria o enfermedad cerebrovascular que en controles. En algunos trabajos está descrita su interrelación con otro polimorfismo como el DD de la ECA, potenciándose ambos y produciendo un mayor riesgo de re-estenosis tras angioplastia coronaria (259). También se ha demostrado un efecto sinérgico entre este alelo e4 y el polimorfismo TT del gen del angiotensinógeno para el desarrollo precoz de infarto agudo de miocardio, efecto que podría estar mediado por un incremento exagerado de las concentraciones plasmáticas de colesterol (260). En un estudio prospectivo en una población española (261), se pudo demostrar la relación entre la apo-E y el riesgo de desarrollar enfermedad coronaria, a pesar de una menor prevalencia del alelo e4 respecto a poblaciones del norte de Europa. En este trabajo la relación entre el alelo e4 y la presencia de enfermedad coronaria se mantuvo tras corregir para la edad, el sexo, los factores de riesgo cardiovascular y la concentración de colesterol total, HDL-colesterol y triglicéridos (OR 2,56; IC del 95%; 1,03-6,39).

En la enfermedad cerebrovascular se han encontrado resultados contradictorios. El alelo e4 no fue un factor de riesgo importante para ictus isquémicos o hemorrágicos (262) o para ictus isquémicos en estudios prospectivos en ancianos (263). Kessler et al (264) recientemente no encontró asociación global entre los ictus isquémicos y el alelo e4 aunque sí existió una asociación significativa con los ictus aterotrombóticos. Además los sujetos-E4 tiene un mayor engrosamiento íntima-media (265). En relación a esto, estudios con resonancia nuclear magnética en patología cerebrovascular incipiente y de pequeño vaso han mostrado una mayor prevalencia asociada a los otros 2 fenotipos de apo E (e2/e3), con independencia de factores de riesgo clásicos como edad, hipertensión arterial y presencia de enfermedad cardíaca; mientras que los sujetos con alelo e4 estarían presentes estos factores con más frecuencia (266). También se ha encontrado una asociación entre los genotipos relacionados con el sistema renina-angiotensina-aldoesterona y el fenotipo e4/* de la apo E (165, 267); apoyando que los mecanismos relacionados con la arteriosclerosis están acelerados en estos sujetos. Otros estudios han investigado el papel de la Apolipoproteína E sobre la evolución tras el daño isquémico del cerebro y han encontrado una asociación entre el genotipo E4 y una peor evolución clínica. En un estudio reciente sobre ictus isquémicos, se ha encontrado un efecto inesperado favorable del e4 sobre la supervivencia en accidentes vasculocerebrales hemorrágicos (268).

El hiperinsulinismo y la resistencia a la insulina, así como todas las características fenotípicas que conllevan el síndrome metabólico, pueden ser el origen o nexo de unión entre este riesgo cardiovascular deletéreo y la presencia del alelo e4. Un estudio previo ha puesto de manifiesto que la frecuencia del genotipo E4/* está aumentada en pacientes hipertensos, al igual que en pacientes hipertensos con hiperinsulinemia como marcador de resistencia a la insulina (64); caracteres ambos del

síndrome metabólico. En este trabajo se observa como los sujetos hipertensos portadores del alelo e4 presentaban mayores niveles de insulina basal y tras sobrecarga oral de glucosa y además se apreciaba un perfil lipídico más aterogénico, principalmente caracterizado por mayores niveles de triglicéridos y LDL-colesterol con niveles más bajos de HDL-colesterol. La presencia del alelo e4 también confiere este perfil lipídico desfavorable en poblaciones de riesgo vascular, no hipertensas, como pueden ser los sujetos obesos, diabéticos o hiperlipémicos (269). Resultados similares hemos podido documentar en un estudio piloto con una muestra de nuestra área (66), donde demostramos que los sujetos hipertensos portadores del alelo e4 tenían un mayor grado de hiperinsulinemia (> de 80 mU/l a los 120 minutos de la SOG) y además presentaban mayores cifras de triglicéridos e insulina basal y menores de HDL-colesterol. En un estudio poblacional en niños de el estudio Bogalusa, también se pudo demostrar como la presencia de alelo E4 condicionaba un peor riesgo vascular, no sólo por relacionarse con los niveles de LDL-colesterol sino por presentar un mayor incidencia de factores asociados al síndrome X; por lo que se podría especular que el genotipo de la Apo E podría regular varias condiciones metabólicas asociadas al síndrome X (251). Esta asociación ha sido claramente establecida en una población de alto riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus, como es la raza americana de origen hispana; así Valdez R et al(270), demostraron como el alelo e4 estaba en una mayor proporción en esta raza frente a la población blanca americana y que el genotipo E4 se correlaciona muy fielmente con los niveles mayores de glucosa e insulina basal y a los 120 min de una SOG.

A pesar de la relación bien estudiada, entre apo E y enfermedad coronaria o cerebrovascular, existen pocos trabajos que hayan intentado relacionar la presencia del alelo e4 con una mayor incidencia de hipertensión arterial. La prevalencia de los portadores del alelo e4 parece estar incrementada en los pacientes hipertensos (259,260). En un trabajo reciente se observó como los hipertensos portadores del alelo E4 presentan un daño en órgano diana mayor, con más hipertrofia ventricular, un mayor grado dilatación de la aurícula izquierda y más retinopatía; comparado con los otros alelos (271). La implicación de este gen en la patogénesis de la HTA se desconoce aunque un estudio reciente demuestran en ratones knockout para apo-E, como desarrollan HTA acelerada precoz tras la infusión de angiotensina-II (272) y recientemente se ha demostrado por primera vez como los ratones Apo e^{-/-} desarrollan hipertensión arterial y deterioro de la función endotelial a los pocos meses de vida, acelerando el proceso de la arteriosclerosis (273). Una elevación de las cifras de presión arterial asociada a deficiencia de apo E se han demostrado a edades más precoces incluso 9 semanas (274). En ratas espontáneamente hipertensas, la distribución de la apo E en las distintas subfracciones lipídicas también es diferente y la síntesis de apo E medida por ARN mensajero, disminuye con la edad en estos animales (275). Todos estos estudios nos hacen pensar en la posibilidad de

que apo E intervenga en algunos de los aspectos fisiopatológicos que llevan al desarrollo de HTA aunque los mecanismos no están aclarados. En este sentido se ha reportado una variación genética en la región promotora del gen de la apo E (A - 491T) que podía estar implicada genéticamente en el desarrollo de HTA, ya que se ha demostrado que sujetos normotensos con este polimorfismo exhiben mayores cifras de presión arterial basalmente, aunque no hubo diferencias en la frecuencias de alelos en hipertensos respecto a controles (276).

Desde el punto de vista poblacional, existen pocos trabajos. Uusitupa y colaboradores (277) demostraron en una población finlandesa seleccionada (n=159), que individuos con los genotipos e3/e4 y e4/e4 tenían cifras significativamente mayores de presión arterial sistólica (8 mmHg) que aquellos que presentaban los otros genotipos. En ese mismo año, De Knijff(278) analizando varias poblaciones holandesas, no pudo demostrar esta asociación y echó por tierra la hipótesis de los anteriores autores que discutían la posibilidad de que el alelo e4 influyera en las cifras de presión arterial a través de los niveles de colesterol. Más recientemente, en una población del área mediterránea, el alelo e4 fue significativamente más frecuente entre hipertensos respecto a controles, y además se correlacionó con una mayor daño en órgano diana, al menos cardiaco y renal en hipertensión leve-moderada (279). A la vista de estos resultados, parece obvio que son precisos más estudios poblacionales en nuestra área, en los que se pueda demostrar esta relación e intentar aclarar los mecanismos de conexión con otros componentes del síndrome metabólico.

El polimorfismo Trp64Arg del receptor beta-3 adrenérgico, hipertensión, y otros factores de riesgo vascular.

El gen del receptor beta-3 adrenérgico es expresado primariamente en los adipocitos que revisten el tracto gastrointestinal. La principal función del receptor beta-3 adrenérgico es mediar la lipólisis en las células grasas y la termogénesis en el tejido adiposo marrón (280). Por consiguiente, defectos en alguna de estos dos procesos metabólicos puede llevar al desarrollo de obesidad visceral y resistencia a la insulina (281,282). El receptor beta-3 adrenérgico atraviesa 7 veces la membrana plasmática, está acoplado a la proteína G y está localizado en el tejido adiposo. La estimulación del receptor por agonistas activa la adenilato-ciclasa, que incrementa la concentración intracelular de AMP cíclico y como resultado produce un incremento de la lipólisis y termogénesis (283,284). La expresión de este receptor está marcadamente disminuida en modelos animales de obesidad (285). Los ratones *knockout* para el gen de este receptor tienen disminuida la lipólisis estimulada por beta-agonistas (286) y los agonistas beta-3-específicos tienen potentes efectos anti-obesidad y como anti-diabéticos, tanto en animales (287) como en humanos (288).

Los primeros estudios epidemiológicos que pusieron en relación polimorfismos genéticos de este receptor con distintos componentes del síndrome plurimetabólico aparecieron en 1995. En ese

año, en el mismo número de la revista de mayor impacto clínico, el *New England Journal of Medicine*, aparecieron 3 artículos que ponían en relación la presencia de la mutación Trp64Arg del receptor beta-adrenérgico con el desarrollo más precoz de diabetes y con una tendencia a tener un metabolismo basal más bajo en una población de Indios Pimas (289). También se asoció a la presencia de obesidad central y resistencia a la insulina medida por técnica del clamp en una población finlandesa (290); y finalmente, se comprobó que la mutación puede contribuir a la capacidad para ganar peso en personas de alto riesgo para obesidad, posiblemente en conjunción con factores ambientales (291). Esta hipótesis se puede sustentar en base a los resultados de Sipilainen et al (292), que demuestran como los sujetos obesos con el genotipo Trp64Arg presentaban una tasa metabólica basal 66 Kcal/día más baja que los sujetos obesos con el genotipo Trp64Trp; aunque no encontraron diferencias en cuanto a frecuencias de aparición con el grupo control.

La hipótesis fisiopatogénica para el desarrollo de resistencia a la insulina y obesidad se centra en una disminución de la actividad del receptor y por tanto, en un descenso de la actividad metabólica basal, llevando a un gasto energético positivo, ganancia de peso y obesidad. A su vez, los depósitos incrementados de grasa abdominal podría proporcionar más cantidad de ácidos grasos libres para la síntesis de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en el hígado; lo cual podría condicionar cambios en la composición de ácidos grasos en la membranas celulares (293) o una mayor concentración de triglicéridos en el músculo. En ratas, la acumulación de triglicéridos en el músculo está relacionado con un deterioro de las acciones de la insulina (294). Otra hipótesis alternativa sería un descenso en la capacidad de respuesta del receptor de los vasos sanguíneos en los portadores del polimorfismo, ya que el 30% de la disposición de glucosa inducida por insulina en el músculo esquelético está determinada por cambios en flujo sanguíneo regional (295).

Posteriormente a estos trabajos, ha habido mucha controversia en la literatura sobre la implicación de este polimorfismo en el desarrollo de componentes del síndrome de resistencia a la insulina. Kurabayashi et al (296) y Sakane et al (297) encontraron asociación entre el polimorfismo Trp64Arg con obesidad y características fenotípicas de resistencia a la insulina en mujeres homocigóticas o heterocigóticas para dicha variante. Posteriormente estos mismos resultados se han confirmado, planteándose la posibilidad de que el efecto de la variante Trp64Arg en las formas heterocigóticas pueda estar condicionado por la edad y sexo, ya que la asociación con la resistencia a la insulina no se observó en los hombres (298). También existen trabajos con resultados negativos en mujeres premenopáusicas sanas (299).

Respecto al resto de aspectos del síndrome metabólico también existen trabajos con resultados contradictorios, aunque los más recientes parecen que decantan hacia la asociación del alelo 64Arg con obesidad central, diabetes mellitus e hipertensión arterial. En el año 1996, Odawara y colabora-

dores (300) en un metaanálisis en población japonesa, no encontraron asociación significativa entre la presencia del polimorfismo y el desarrollo de diabetes mellitus. Estudios más recientes en población caucásica han puesto de manifiesto como la prevalencia de esta mutación es mayor en la población diabética y como su presencia se relaciona con una menor pérdida de peso y una mayor predisposición para el desarrollo de diabetes mellitus (301).

En relación a la hipertensión arterial, en una población diabética centroeuropea, se encontró una relación sólo en varones, siendo el desarrollo de ésta más precoz, precisando un mayor número de fármacos hipotensores para su control (302). La asociación parece estar perfectamente establecida sobre todo en población caucásica y mediterránea, sobre todo a raíz de los estudios longitudinales realizados en la población italiana. En un primer estudio Tonolo y colaboradores (303) demostraron como el 13,6% de los 213 hipertensos estudiados eran heterocigóticos para la mutación Trp64Arg, mientras que la proporción en normotensos era del 6,8% (χ^2 5.73; $p=0.017$). Estos resultados, posteriormente, se confirmaron en un estudio longitudinal llevado a cabo entre mayo del 1994 y diciembre de 1995 en 979 trabajadores de las fábricas de Olivetti de Nápoles y Caserta en Italia. Un subgrupo de estos individuos, en concreto 457 participantes, ya habían sido vistos por primera vez en 1975, por lo que se realizó un análisis de seguimiento de 20 años (304). Este estudio reveló una fuerte asociación entre la presencia de la variante Trp64arg y la presencia de un mayor cociente cintura/cadera, mayores niveles de ácido úrico y de presión arterial sistólica. También hubo diferencias pequeñas con el índice de masa corporal y la presión arterial diastólica pero no llegaron a ser significativas. También se observó como existía una fuerte interrelación entre la variante 64Arg y la edad, y ésta a su vez con la presencia de HTA ($p<0.001$).

Cuando se analizaron los datos prospectivos, los participantes seguidos durante 20 años que tenían el polimorfismo tuvieron una mayor tendencia a ganar peso con el tiempo, a presentar mayores niveles de presión arterial y una mayor tendencia desarrollar HTA. También en este estudio, se relacionó el polimorfismo con otro componente del síndrome metabólico como la hiperuricemia. No se encontró relación con parámetros del metabolismo glucídico ni con resistencia a la insulina, medida por HOMA.

Resumiendo parece bien establecido en la literatura que el polimorfismo Trp64Arg del receptor beta-3 adrenérgico se asocia a obesidad central y características clínicas del síndrome metabólico como hipertensión arterial, hipeuricemia e hipertrigliceridemia. La relación con resistencia a la insulina es más controvertida, a pesar del trabajo de Widen, posiblemente porque los métodos de medición de ésta son heterogéneos. Resultados igual de contradictorios han aparecido con diabetes mellitus tipo 2.

**PLANTEAMIENTO
DEL
PROBLEMA**

La hipótesis de trabajo es que la presencia de diferentes mutaciones como Trp64Arg del receptor beta-3 adrenérgico, el genotipo DD del gen de la ECA o el alelo E4 del gen de la Apo-E podrían condicionar una respuesta indeseable de los factores medioambientales sobre los factores de riesgo vascular, favoreciendo el desarrollo más precoz de alteraciones metabólicas proaterogénicas junto con unas cifras de presión arterial más elevadas y por tanto una mayor repercusión en los órganos diana de los pacientes con hipertensión arterial.

En este sentido, se podría identificar un subgrupo de pacientes hipertensos en los que el síndrome metabólico y la enfermedad aterosclerótica aparecerían más precozmente y con una mayor severidad. Por ende, en estos hipertensos se deberían extremar las medidas encaminadas a la corrección energética y precoz de otros factores de riesgo metabólicos asociados como la obesidad, la resistencia a la insulina, la diabetes o la hiperlipemia.

También queríamos comprobar si los hipertensos presentan un mayor grado de resistencia a la insulina medida por HOMA y analizar si existen diferencias fenotípicas, metabólicas o genéticas entre los pacientes que presentan un mayor grado de hiperinsulinismo y de síndrome metabólico.

Por último, queríamos comprobar si existe alguna interrelación entre los distintos polimorfismos estudiados, y si existiese, como podían influir conjuntamente o por separado, sobre la presencia de hipertensión arterial, síndrome metabólico, resistencia a la insulina y sobre el Contratraste de Na^+/Li^+ o la composición lipídica de la membrana.

En resumen, los **objetivos fundamentales** de este trabajo son:

- 1) Conocer la prevalencia de 3 polimorfismos en relación con el gen de la ECA, del receptor Beta-3 adrenérgico y de la apolipoproteína E, en una población hipertensa de nuestra área geográfica.
- 2) Ver si alguna de estos polimorfismos se asociaba a mayores cifras de presión arterial o bien a un perfil metabólico desfavorable, entendido como tal un perfil lipídico aterogénico o bien la presencia de resistencia a la insulina. En este sentido queríamos ver alguna de estas mutaciones se asocian a un mayor grado de hiperinsulinemia medida por diferentes índices indicativos de resistencia a la insulina.
- 3) Analizar la influencia de los polimorfismos estudiados sobre la presencia del síndrome metabólico en este subgrupo de hipertensos.
- 4) Estudiar la influencia de estos polimorfismos sobre la actividad del contratraste sodio/litio y la composición lipídica de la membrana en pacientes hipertensos.

**MATERIAL
Y
MÉTODOS**

SELECCION DE PACIENTES

Tipo de estudio: Estudio Descriptivo, poblacional de tipo transversal, en 259 pacientes adultos de ambos sexos, que estuviesen diagnosticados de hipertensión arterial en el último año, que no realizaran tratamiento hipotensor y que aceptaran ser incluidos previo consentimiento informado.

Procedencia de los sujetos: Los pacientes fueron reclutados en las consultas de la Unidad de Hipertensión arterial y Lípidos del Servicio de Medicina Interna del H.U. Virgen del Rocío. Proceden en parte derivados del servicio de Urgencias del propio hospital y por otra, remitidos desde las consultas de atención primaria y los centros de Salud del distrito sanitario de nuestro hospital.

Características de los pacientes.

El diagnóstico de Hipertensión Arterial se estableció conforme a los criterios del *Joint National Committee on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure* (305). La presencia de HTA secundaria quedó definitivamente descartada después de un estudio clínico completo con anamnesis exhaustiva, exploración clínica por aparatos y realización de pruebas complementarias que incluyeron la determinación de parámetros hematológicos habituales, catecolaminas en orina de 24 horas, cociente aldosterona/ ARP tras deambulación, radiografía de tórax, electrocardiograma y ecografía renal con doppler de arterias renales únicamente cuando estuviese indicado.

Los pacientes estudiados presentaban una HTA grado I-II del JNC-VI, de diagnóstico en el último año y sin tratamiento farmacológico previo, y en aquellos que estaban recibiendo algún tipo de medicación hipotensora se le retiró 30 días antes de comenzar el estudio.

Todos los sujetos del estudio presentaron un peso estable en las 3 últimas semanas y consumieron una dieta con 150 gramos de carbohidratos al día en los 3 últimos días antes de entrar en el estudio.

Para el cálculo del tamaño muestral, hemos tenido en cuenta un estudio piloto previo en sujetos portadores del alelo E4, y asumiendo un error alfa de 0.05 y para una potencia estadística de 1-beta de 0.80, el resultado fue de 246. Asumiendo una tasa de pérdidas/enfermos no valorable del 5%, hemos creído oportuno reclutar 259 pacientes.

Criterios de Inclusión

Hipertensos grado I-II del JNC VI, etiquetados de esenciales tras minucioso estudio clínico y biológico; de edades comprendidas entre los 18 y 75 años, sin evidencia de daño en órgano diana, libre de tratamiento hipotensor y de diagnóstico reciente, entendido en el último año.

El criterio de hipertensión arterial se basó en al menos 3 determinaciones de presión arterial por encima de 140 / 90 mmHg, separadas en el tiempo y tras reposo del sujeto durante 10 minutos.

Criterios de exclusión

- Hipertensos esenciales con daño a nivel cardiaco, renal, vasculocerebral o vascular periférico.
- Insuficiencia renal definida por una creatinina > de 1.6 mg/dl o bien proteinuria manifiesta por cifras mayores a 30 mg/dl.
- Glucemia basal alterada, tolerancia anormal a la glucosa o diabetes mellitus.
- Índice de masa corporal mayor de 40.
- Hiperlipemia familiar o esporádica.
- Alcoholismo.
- Enfermedad valvular u otras enfermedades cardiacas previas.
- Enfermedades sistémicas o neoplasias.

PROTOCOLO DE ESTUDIO CLÍNICO

Todos los pacientes hipertensos incluidos en este trabajo fueron sometidos al siguiente estudio clínico:

- Recogida por anamnesis de los siguientes datos: edad, antecedentes familiares de hipertensión, enfermedad coronaria o vasculocerebral prematura (varones <55 años y mujeres <65 años) y antecedentes personales de factores de diabetes mellitus, dislipemia, obesidad, tabaquismo, enfermedad coronaria, cerebrovascular, vascular periférica y renal. A todos ellos se le determinó el peso, la talla, el índice de masa corporal (IMC), la presión arterial sistólica y diastólica, en decúbito y sedestación, en ambos brazos.
- Todos los sujetos que participaron en el estudio fueron clasificados en 2 grupos en función de la presencia o no de criterios clínico-biológicos del síndrome metabólico; según la definición del III Panel de Expertos del NCEP-ATP (306), que se detalla en la figura 1.
- Tras 12 horas de ayuno, y después de consumir una dieta con al menos 150 gr de carbohidratos diariamente durante 3 días, se realizaron las determinaciones analíticas en muestras de 20 ml de sangre venosa. Se cuantificaron los niveles plasmáticos de glucemia, urea, creatinina, ácido úrico e iones por métodos enzimáticos convencionales y el perfil lipídico por ultracentrifugación con posterior separación enzimática de las subfracciones. La composición lipídica de la membrana del eritrocito y la actividad del transportador Sodio/Litio también fue medida a todo ellos.

Defining risk factor	Criteria for metabolic syndrome
Abdominal obesity by waist circumference	> 40" in men > 35" in women
Higher fasting triglycerides	≥ 150 mg/dl
Lower HDL	< 40 mg/dl for men < 50 mg/dl for women
Higher blood pressure	≥ 130/≥ 85 mmHg
Higher fasting blood glucose	> 110 mg/dl

Figura 1: Clinical identification of the metabolic syndrome: presence of more than three factors. From: Denke: Curr Opin Lipidol, Volume 12(6).December 2001.625-628

- A todos los participantes se le realizó una sobrecarga oral de glucosa (SOG) con 75 gr de glucosa en condiciones basales y tras ayunas de 12 horas, y se realizaron determinaciones de glucemia e insulina de forma basal, a los 60 y 120 minutos tras la sobrecarga, por métodos convencionales. También se determinó el área bajo la curva de ambos parámetros en cada paciente.
- Los estudios genéticos se realizaron mediante extracción del DNA de linfocitos obtenidos de sangre periférica, mediante protocolos estándares. Posteriormente se realizó una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con amplificación y posterior restricción de los distintos fragmentos genéticos que se iban a estudiar: el polimorfismo I/D del gen de la ECA, el polimorfismo Trp643Arg del gen del receptor beta-3 adrenérgico y el polimorfismo e2/e3/e4 del gen de la apolipoproteína E.

Se utilizaron como medidas indirectas de resistencia los valores de insulinemia a los 0, 60 y 120 minutos, así como el área bajo la curva de insulina tras SOG. También utilizamos el modelo homeostático para valorar la existencia de resistencia a la insulina (HOMA-IR) utilizando la siguiente fórmula matemática (309):

$$\text{HOMA-IR: } \frac{\text{insulina en ayunas (mU/ml)} \times \text{glucosa en ayunas (mmol/l)}}{22.5}$$

Además del índice HOMA, calculamos la función de la célula beta mediante el método propuesto por estos mismos autores, según la fórmula:

$$\%b: \frac{20 \times \text{Insulina en ayunas (mU/ml)}}{[\text{glucosa en ayunas (mmol/l)} - 3.5]}$$

METODOLOGÍA DE LA MEDICIÓN DE LÍPIDOS, GLUCOSA E INSULINA PLASMÁTICA

Tras obtener las muestras de sangre venosa, las subfracciones lipídicas fueron separadas mediante ultracentrifugación a 4º durante 18 horas. La fracción lipoproteica de muy baja densidad (VLDL) fue obtenida del sobrenadante y su composición en colesterol y triglicéridos fue medida por métodos enzimáticos convencionales. A continuación, la lipoproteína de alta densidad total (HDL) y la subfracción HDL3 (la HDL2 se calculó de sustraer la HDL3 de la HDL total) se obtuvieron por precipitación con la adición de polietilenglicol (Quantolip inmuno-GMBH, Heidelberg, Germany) en el infranadante y se midió su composición en colesterol y triglicéridos. Finalmente la cantidad de LDL (lipoproteína de baja densidad) resultó de la extracción del colesterol y los triglicéridos unidos al total de HDL en el infranadante, usando la fórmula de Friedewald (307)

Tras la SOG, las concentraciones de glucosa plasmática se determinaron por métodos enzimáticos convencionales y las de insulina mediante radioinmunoanálisis (RIA). El cálculo del área bajo la curva de glucosa e insulina se realizó siguiendo el modelo matemático trapezoidal propuesto por Tai con aproximación al cálculo infinitesimal (308).

Los factores de conversión para nuestras unidades habituales de glucosa e insulina se exponen a continuación:

- Glucosa en mg/dl x 0,056 = Glucosa en mmol/l.
- Insulina en pmol/l x 0,167 = Insulina en mU/ml.

Consideramos un HOMA elevado cuando era superior o igual a 3,8; a raíz de un estudio realizado en población de nuestra área geográfica (310)

METODOLOGÍA DE LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA MEMBRANA

La extracción lipídica de la membrana del hematíe se realizó según el método de Rose y Oklander (311), y la revisión posterior de Peuchant y col (312). A un paquete de 1.0 ml de hematíes, se le añaden 11 ml de alcohol isopropílico y, tras agitación, se deja en reposo durante una hora. Este solvente contiene butilhidroxitoluol (BHT) 0.45 mM como antioxidante. Tras el tiempo indicado se añaden 7 ml de cloroformo y finalmente se filtra la mezcla quedando en el filtro los restos de membranas depiladas y en el filtrado la fracción orgánica con los componentes lipídicos filtrados. Esta preparación se evapora mediante un sistema de presión

reducida (Rotavapor) a T^a de 40°C y se mantiene en una atmósfera inerte de N₂ a -30°C.

Para la identificación y cuantificación de los distintos componentes lipídicos se utilizó un sistema de cromatografía en capa fina denominado la-troscan (Technical Marketing Associats, Mississauga, Ont), equipado con un detector de ionización de llama (H₂ flow rate 175 ml/min, air flow rate 1850 ml/min) con scanner (scanning 0.47 cm/seg) e integrador (sensitivity 10 mV, chart speed 0.42cm). Este sistema se caracteriza por el uso de unas varillas de cuarzo (Cromatorods tipo S), recubiertas con silica gel. Se usó como fase móvil una mezcla de hexano/éter etílico/ácido fórmico (90/10/3, v/v/v). Esta fuente de calor se controlaba con una mezcla de H₂ y aire. Las fracciones lipídicas se identificaron mediante la señal eléctrica producida tras su ionización con una llama. Tras barrido con la llama de los Cromatorods y con la ayuda del integrador, se obtuvieron los cromatogramas correspondientes. La cuantificación se llevó a cabo mediante la comparación del área de cada pico con el área del pico producida por un patrón de concentración conocida.

METODOLOGÍA DE LA ACTIVIDAD DEL CONTRATRANSPORTE SODIO/LITIO.

La actividad máxima estimulada por litio del Contratraste Sodio/Litio (CONTRA Na⁺/Li⁺) intraeritrocitaria fue medida por técnica de Canessa (313). Para ello, los eritrocitos (a un nivel de hematocrito del 20%) fueron incubados durante 1 hora a 37°C en una solución cargada de litio, que contenía 75 mmol/l de CO₃Li₂ 10 mmol/l de glucosa y 120 mmol de una solución buffer ácido tris-morfolino-propansulfónico (MOPS-TRIS) y posteriormente fueron lavados por 4 veces con 110 mmol/l de Cl₂Mg. Se midió el contenido de litio dentro de las células y a continuación 2 partes alícuotas de 1 ml de células fueron incubadas durante 1 hora a 37°C en una solución isoosmolar enriquecida con sodio (150 mmol/l de ClNa) o en otra libre de sodio (85 mmol/l de sucrosa y 75 mmol/l de Cl₂Mg) ambos conteniendo 10 mmol/L de glucosa, 0.1 mmol/L de ouabaina y 10 mmol/l de MOPS-TRIS (37°C, 1 hora).

Tras centrifugación, se separó el sobrenadante por aspiración y se practicó la medida de la concentración de litio en el sobrenadante de ambas suspensiones mediante espectrofotometría de absorción atómica (espectrofotómetro Perkin-Elmer 460) ajustado a una longitud de onda de 670.8 nm.

Se determinó la velocidad máxima del CONTRA, como la diferencia existente en la concentración de litio medido entre los sobrenadante de ambas alícuotas. Se asume que a las concentraciones de litio intracelular alcanzadas tras la incubación en una solución de sobrecarga de sodio, el sistema de trasporte está saturado, obteniéndose un flujo de litio máximo y constante en el tiempo. Se corrigió tal diferencia para el valor hematocrito medido en el volumen celular centrifugado tras sobrecarga de litio y se expresó en nmol/litro de células/hora.

METODOLOGÍA DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS

Determinación del polimorfismo I/D del gen de la ECA

La extracción de DNA se realizó a partir de 50 ml de sangre lisando los leucocitos con detergente y proteinasa K. El polimorfismo I/D del gen de la ECA se determinó mediante reacción en cadena de la polimerasa según el método propuesto por Rigalt et al (314), añadiendo un 5% de dimetilsulfoxido (DMSO) en todas las reacciones de PCR para potenciar la amplificación del alelo I en las muestras heterocigóticas (315). La PCR se realizó en un termociclador Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Hispania, Barcelona) bajo las siguientes condiciones: 5 min de desnaturalización a 95°C, 30 ciclos de 1 min a 95°C, 2 min a 61°C y 2min a 72°C y 7 min de extensión final a 72°C. El producto de PCR fue visualizado en agarosa al 2% con bromuro de etidio.

Determinación del Polimorfismo Arg64Trp del gen del receptor beta-3-adenérgico

EL DNA extraído, libre de RNA y contaminación proteica, fue amplificado por PCR del fragmento polimórfico de acuerdo con la metodología propuesta por Widen (290). Los productos amplificados por PCR fueron digeridos, añadiendo 5 ml de una solución que contenía: 30 mM de ácido TRIS-hidroclórico (pH 7,9), 30 mM de cloruro magnésico, 150 mM de cloruro sódico y 5 unidades de la enzima de restricción BstNI, una enzima de restricción específica para la secuencia CC(A/T) GG. Posteriormente, las muestras digeridas fueron separadas mediante electroforesis en agarosa al 2%.

Determinación del polimorfismo e2/e3/e4 del gen de la apolipoproteína E

El polimorfismo e2/e3/e4 de la apo-E fue genotipado por PCR mediante amplificación del fragmento polimórfico del gen de la apo-E y digestión de los productos amplificados usando la enzima de restricción CfoI según el método de Wenham(316).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En primer lugar, se estudiará cual es la prevalencia de estas mutaciones en nuestra población de hipertensos. Mediante un test de Kolmogoroff-Smirnoff, se comprobó como la mayoría de nuestras variables no seguían una distribución normal; por lo que en todo el estudio estadístico se emplearon test no paramétricos para comparar variables. Las variables se expresan como percentil 50 (mediana) y rango intercuartílico (P75-25) junto con el rango promedio. Debido a que existe un dimorfismo sexual en la asociación entre el polimorfismo de la ECA y la HTA, los análisis se han realizado considerando por separado a varones y mujeres.

Para estudiar si alguna de estas mutaciones, se asocian a diferencias en cuanto a la com-

posición lipídica, el metabolismo hidrocarbonado, la actividad del CONTRA y la composición de la membrana del eritrocito se empleó el test de test de Kluskall-Wallis para ECA y Apo-E por presentar más de 2 categorías mientras que para el RB3A se empleó un test de la U de Mann-Whitney. La distribución de los genotipos y la frecuencia de los alelos se comparó entre los grupos mediante el test de la chi-cuadrado o la prueba de Fisher.

Se utilizó los "softwares" estadísticos: EPI-info 3.0 y SPSS 10.0 para el análisis de los datos.

ASPECTOS ÉTICOS

Este estudio respeta los principios éticos recogidos en la declaración de Helsinki. Puesto que se va a trabajar con material genético, los pacientes fueron informados de todas las determinaciones analíticas que se realizarán , darán su consentimiento por escrito o de forma oral ante testigos.

RESULTADOS

Las características generales clínico-biológicas de nuestra población hipertensa y la distribución de los diferentes genotipos se exponen a continuación (Tabla 1.) La edad media de la población fue de 42 años y el índice de masa corporal medio fue de 28.7. La distribución por sexos de nuestra población fue del 57.1 % para los hombres frente a un 42.9% para las mujeres.

Además encontramos diferencias en el perfil lipídico y en el metabolismo glucídico (tabla) en función del sexo. Así los hombres presentaban mayores niveles de LDL-c, VLDL-c, Tg, Tg-LDL, Tg-VLDL, Tg-LDL, col no-HDL y apoproteínas A1 y B; mientras que las mujeres tenían más HDL-col (Tabla 2.) También los varones mostraron mayores niveles de ácido úrico ($p=0.0001$), glucemia e insulina en los 3 puntos de la curva de sobrecarga oral de glucemia y el índice HOMA era significativamente más elevado entre ellos respecto a las mujeres del estudio ($p=0.035$.) (Tabla 3.)

No había diferencias por sexo en la CLM aunque sí en la actividad del CONTRA que significativamente mayor en los varones ($p=0.004$) (Tabla 4.)

En cuanto a la distribución de genotipos estudiados queda reflejada en la Tabla 5. La frecuencia del genotipo DD fue elevada (35,1 %) mientras la frecuencia de la mutación TRP64Arg del RB3A fue del 12,7%. Respecto al polimorfismo de la apo-E, el genotipo e3/e3 fue el mayoritario con una frecuencia del 71%. El alelo e4 viene a representar aproximadamente el 20 % de la población el alelo e2 el 10,8 % de ésta. (Tabla 6 y 7.) Al analizar las frecuencias de los diferentes genotipos en hombres y mujeres, no hubo diferencias en cuanto a la distribución de alelos de los genes de la ECA o beta-3 adrenérgico (Chi cuadrado:

0.644; $p = NS$ y Chi cuadrado: 0.003; $p = NS$, respectivamente) pero sí en relación a los genotipos de la apo E. Así, los varones presentaban una mayor frecuencia del alelo $\epsilon 4$ y el alelo $\epsilon 2$ era significativamente menos prevalente en el grupo de mujeres (Fig. 1.)

Polimorfismo I/D de la ECA:

Comenzamos analizando la relación entre los diferentes genotipos de la ECA y las variables clínico-biológicas determinadas en nuestra población hipertensa. Globalmente la única diferencia encontrada es que los individuos que portaban el genotipo II presentaban mayores cifras de glucemia basal que los otros 2 genotipos ($p=0.04$) (Fig. 2.) Presentando los resultados en función del sexo, el genotipo II se asoció a mayores niveles de PAD y apo A1 en hombres (Fig. 3 y 4) mientras que las mujeres con el genotipo II eran más jóvenes ($p=0.04$.) (Fig. 5.)

Polimorfismo del RB3A:

Respecto al genotipo WR del RB3AD, los hipertensos varones con la mutación presentaban mayores niveles de colesterol total, col-LDL, y col no-HDL respecto a los hipertensos que no la tenían mientras que en mujeres sucedía lo contrario; las mujeres con la mutación presentaban menores niveles plasmáticos de CT, LDL-c y col no-HDL, con diferencias estadísticamente significativas (Fig. 6,7 y 8.)

Además los hipertensos con el polimorfismo WR del RB3A presentaban un índice aterogénico mayor que los hipertensos que no lo presentaban, efecto que era contrario en el grupo de mujeres (Fig. 9.) No encontramos diferencias estadísticamente significativas en relación a las cifras de PA, IMC, metabolismo hidrocarbonado, HOMA ni tampoco en el CO-

NTRA o en la composición lipídica de la membrana.

Polimorfismos de la Apo E:

Las mayores diferencias las encontramos en este polimorfismo. Dado que la frecuencia alélica fue diferente en hombres y mujeres, las comparaciones de medianas y percentiles se harán en hombres y mujeres por separados.

Las mujeres con el alelo e2 mostraban un IMC significativamente mayor que las mujeres con los otros 2 alelos ($p=0.02$) (Fig. 10.) Además hubo una tendencia a que las cifras de PAS fueron discretamente más elevadas en las mujeres con genotipo apo-E2 aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0.07$) (Fig. 11.)

A pesar de esta asociación anterior, el perfil lipídico fue más desfavorable en los hipertensos que portaban el alelo e4 tanto en hombres como sobre todo en mujeres. Así, el alelo e4 se asoció a mayores niveles plasmáticos de C-total, LDL-c, Tg, Tg-LDL, No-HDL-c, y mayores niveles plasmáticos de Lp(a) entre las mujeres (Fig. 12-16.)

También hubo diferencias en las apoproteínas A1 y B en las mujeres hipertensas con el genotipo E4 (e3/e4 y e4/e4), como se muestran en las figuras 17 y 18 y los índices aterogénicos medidos también fueron muy superiores en los hipertensos apo-E4 (Fig. 19.)

En cuanto al perfil metabólico, las diferencias también se manifestaron mayoritariamente entre las mujeres; así las mujeres hipertensas apo E4 frente a las "normales" (apo E3) mostraban alteraciones del metabolismo hidrocarbonado; con mayores niveles de glucemia basal e insulina basal (Tablas 8 y 9.) No se en-

contraron diferencias cuando comparamos los hipertensos apoE2 frente a los apoE3 (Tablas 10 y 11.) Esta alteración en el metabolismo hidrocarbonado se tradujo en un índice HOMA significativamente mayor entre las mujeres hipertensas portadoras del alelo e4 (Fig. 20.) Finalmente, el porcentaje de mujeres hiperinsulínicas entre las portadoras del alelo e4 también fue superior en relación a las hipertensas que no mostraban dicho alelo (Chi cuadrado: 4.594; $p: 0.032$) (Fig. 21.)

CONTRA y Composición lipídica de la membrana

La actividad del contratransporte Na/Li no fue diferente entre los diferentes polimorfismos estudiados. Respecto a la composición lipídica de la membrana no encontramos diferencias en la composición de colesterol ni fosfolípidos de membrana cuando analizamos la influencia de los polimorfismos WR del RB3A ni del polimorfismo I/D del gen de la ECA globalmente. Sólo encontramos una pequeña diferencia cuando analizamos, matcheados por sexo, la PE de membrana en función de la presencia o no del genotipo II del gen de la ECA. Así las mujeres con este genotipo II presentaban menor concentración de PE en la membrana plasmática del hematíe (Fig. 22.)

La concentración colesterol y fosfolípidos de membrana en función de los diferentes alelos de la apo E se expresan en la tabla 5. Las mayores diferencias las encontramos en relación a la presencia del alelo e2. Los hombres que portaban este alelo e2 presentaban una mayor concentración de colesterol de membrana respecto a los otros 2 genotipos ($p= 0,033$) al igual que las mujeres aunque en estas la diferencia no fue estadísticamente significativa. También encontramos diferencias en

cuanto a la composición de PC de membrana entre los varones que portaban el alelo $\epsilon 2$ de forma que éstos presentaban una menor concentración respecto a los otros 2 alelos ($p=0,04$) (Tabla 12.)

Cuando analizamos los genotipos 2 a 2 mediante una U de Mann-Whitney comprobamos que las diferencias mayores se producían al comparar los hipertensos apo E2 frente a los apo E3; como se expresa en las figuras anteriormente expuestas. No hubo diferencias al comparar el genotipo E4 frente a los hipertensos con el alelo e2 o e3.

Polimorfismos Genéticos y Síndrome metabólico

De nuestra población de hipertensos, 75 pacientes cumplían criterios de síndrome metabólico (SMB) del NCEP-III, lo que viene a representar un 29% frente al 71 % de los pacientes que cumplían menos de 3 criterios (NSMB.) En cuanto al sexo, no hubo diferencias entre ambos grupos (Fig. 23.)

En cuanto al estudio de los distintos polimorfismos, no hubo diferencias en cuanto a la distribución de los dos primeros polimorfismos estudiados en relación a la presencia de SMB o no (Fig.24 y 25.)

Cuando analizamos la presencia de síndrome metabólico en función de los genotipos de la apo E, hubo una tendencia a relacionar el alelo e2 con esta característica fenotípica. Así, si analizamos todos los posibles genotipos de la apo E (E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4 y E4/E4), el SMB apareció más frecuentemente entre aquellos hipertensos que portaban el alelo e2, pero sólo entre las mujeres (Chi cuadrado: 9,945; $p=0,041$.) Los resultados se expresan en la figura 26.

Aunque cuando analizamos la relación

entre el SMB y los genotipos agrupados por alelos: apo e2, apo e3, y apo e4; se pierde la asociación entre las 2 variables (Chi cuadrado: 0,855; $p=NS$ para varones y chi cuadrado: 3,834; $p=NS$ para mujeres.) (Fig. 27.)

	<i>Percentiles</i>	
	P50 (Mediana)	P75-P25
<i>EDAD</i>	44,00	51 - 34
<i>IMC</i>	28,000	31,2 - 25,6
<i>PAS</i>	140,00	150 - 130
<i>PAD</i>	87,00	95 - 80
<i>CT</i>	216,00	266 - 185,5
<i>HDLC</i>	50,00	63 - 39
<i>LDLC</i>	130,00	163 - 104,5
<i>TG</i>	114,50	223,7 - 74
<i>LPA</i>	19,00	49 - 1
<i>G0</i>	96,00	106 - 87
<i>IN0</i>	10,00	14 - 7
<i>HOMA</i>	2,439	3,4 - 1,6
<i>AU</i>	5,700	7 - 4,5

Tabla 1: Características generales de los pacientes.

	HOMBRES	MUJERES	
	P50 (P75-P25)	P50 (P75-P25)	P
EDAD	44 (51-34)	45 (50-34)	NS
IMC	28 (31,1-26,3)	27,7 (31,3-24,3)	NS
PAS	140 (150-129,25)	140 (160-130)	NS
PAD	88,5 (95-80)	85 (95-80)	NS
CT	218,5 (269,75-195,25)	213,5 (245-179)	NS
HDLC	44 (54,7-36)	59 (70,25-49,5)	0.0001
LDLC	134 (167,5-105,25)	125,5 (157-95,75)	0.42
VLDLC	22 (45-13)	12 (19,5-7)	0.0001
H2	11 (18-4)	15 (28-6)	0.0001
H3	33 (41-26)	39 (50,75-32)	0.0001
TG	157 (308,75-91)	84 (122,5-64)	0.0001
TGHD	18 (24-12)	18 (24-9,5)	0.0001
TGLD	38 (66,25-23,7)	25(34-19)	NS
TGVLD	109,5 (209,5-54)	44 (70,25-24)	0.0001
TGVLDLCH	2,56 (5,70-1,05)	0,65 (1,30-0,36)	0.0001
IND	3,15 (4,30-2,20)	152,5 (186,25-117,7)	0.0001
NHDL	175 (228,7-140)	134 (150,5-118,5)	0.001
A1	117,5 (132-101)	134 (150,5-118,5)	0.0001
B	112 (140-92)	96 (121,7-82)	0.001
LPA	16,15 (46,25-1)	26,6 (51,6-10,1)	NS

Tabla 2: Características generales y perfil lipídico de los pacientes distribuidos por sexos.

	<i>Hombres</i>		<i>Mujeres</i>		<i>p</i>
	<i>P50 (75-25)</i>	<i>Rango</i>	<i>P50(75-25)</i>	<i>Rango</i>	
<i>G0</i>	98 (106-89)	131,37	94 (104-84)	109,94	0.01
<i>G60</i>	186(222-147)	133,88	146 (192-113)	95,01	0.0001
<i>G120</i>	128 (166-107)	128,29	112 (138,2-98)	103,10	0.005
<i>IN0</i>	10 (15,25-7)	124,09	9,75 (12-7)	108,03	NS
<i>IN60</i>	85,5 (119-57)	131,73	63(95-42)	97,04	0.0001
<i>IN120</i>	64 (104,25-38)	125,01	53 (82-34)	106,70	0.042
<i>AU</i>	6,7 (7,5-5,8)	167,41	4,5 (5,1-4)	67,95	0.0001
<i>HOMA</i>	2,55 (3,9-1,6)	123,75	2,24 (2,9-1,5)	104,90	0.035
<i>XBETA</i>	103 (160-62,2)	113,82	107 (171,4-70)	119,13	NS

Tabla 3: Metabolismo hidrocarbonado, ácido úrico e índices de RI distribuidos por sexos.

	<i>Hombres</i>		<i>Mujeres</i>		<i>p</i>
	<i>P50(75-25)</i>	<i>Rango</i>	<i>P50(75-25)</i>	<i>Rango</i>	
<i>NALI</i>	0,36 (0,4 - 0,27)	129,15	0,29 (0,4-0,2)	102,97	0.004
<i>COL</i>	50 (53,4 - 45,5)	89,77	48,5 (52,8-44,4)	82,93	NS
<i>PI</i>	0,1 (0,10 - 0,10)	84,17	0,1 (0,1-0,07)	87,45	NS
<i>PE</i>	17,2 (20,2 - 14,8)	86,08	17,6 (20,1-14,9)	89,56	NS
<i>PS</i>	0,1 (0,10 - 0,10)	88,21	0,1 (0,1-0,08)	84,01	NS
<i>PC</i>	17,6 (19,9-16,2)	88,93	17,6 (20,1-15,5)	85,43	NS
<i>SM</i>	13,3 (17,2-11,2)	84,12	15,1 (17,6-11,4)	92,41	NS
<i>LPC</i>	0,1 (0,10 - 0,10)	90,34	0,1 (0,1-0,01)	80,91	NS
<i>CPH</i>	1 (1,2-0,83)	89,10	0,95 (1,1-0,8)	85,18	NS

Tabla 4: CONTRA y CLM en función del sexo de los pacientes.

<i>ECA</i>	<i>N = 259</i>	<i>%</i>
<i>DD</i>	91	35,1
<i>ID</i>	129	49,8
<i>II</i>	39	15,1
<i>WR (Trp 64 Arg)</i>	33	12,7
<i>WW (Trp 64 Trp)</i>	226	87,3

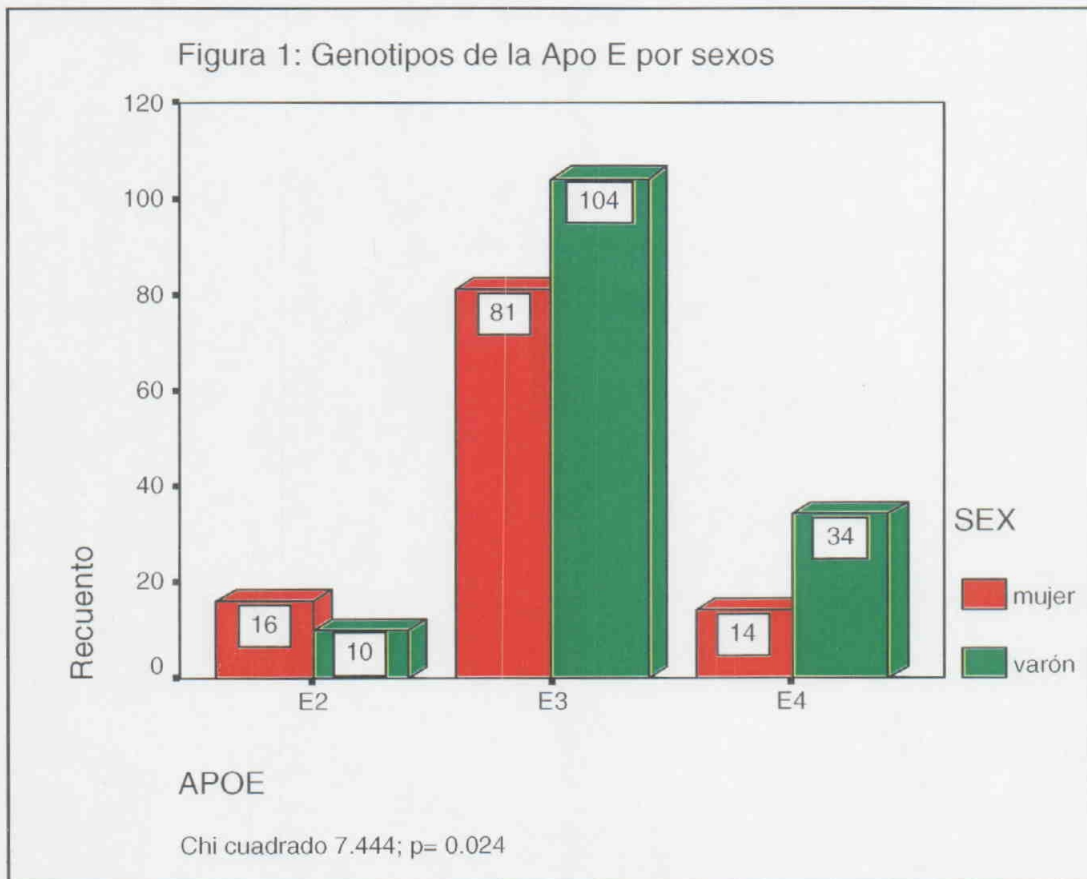
Tabla 5: Genotipos de la ECA y del RB3A.

<i>Apo E</i>	<i>N=259</i>	<i>%</i>
<i>E2E2</i>	1	0.4
<i>E2E3</i>	21	8.1
<i>E2E4</i>	3	1.2
<i>E3E2</i>	2	0.8
<i>E3E3</i>	184	71.0
<i>E3E4</i>	44	17.0
<i>E4E4</i>	4	1.5
Total	259	100.0

Tabla 6: Frecuencia de los genotipos de la apo-E.

ALELOS	$\epsilon 2$ (%)	$\epsilon 4$ (%)
PRESENTE	28 (10.8)	52 (20.1)
AUSENTE	231 (89.2)	207(79.9)

Tabla 7: Alelos $\epsilon 2$ y $\epsilon 4$ de la apo-E.



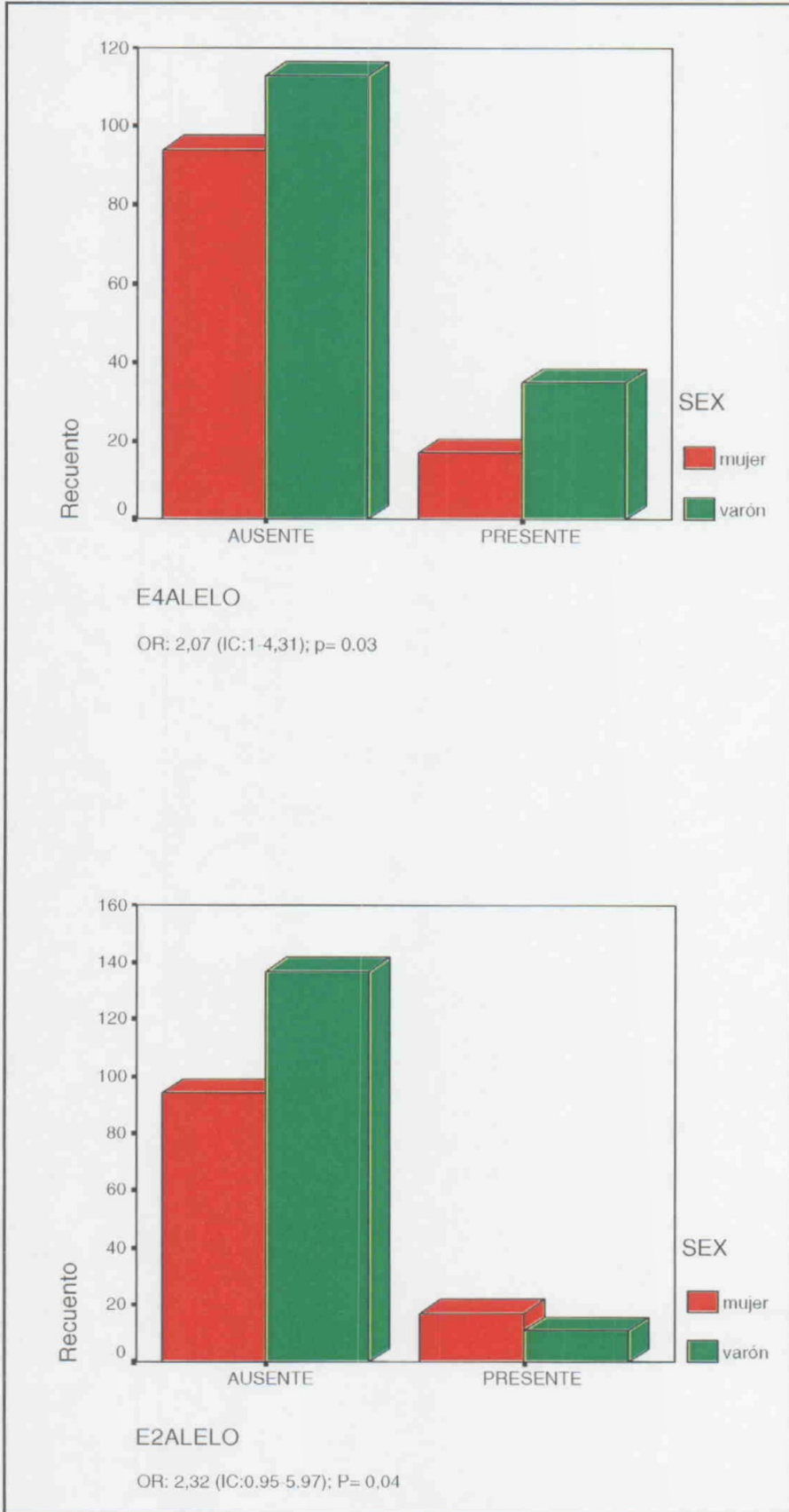


Figura 1 bis: Genotipos de la Apo E por sexos.

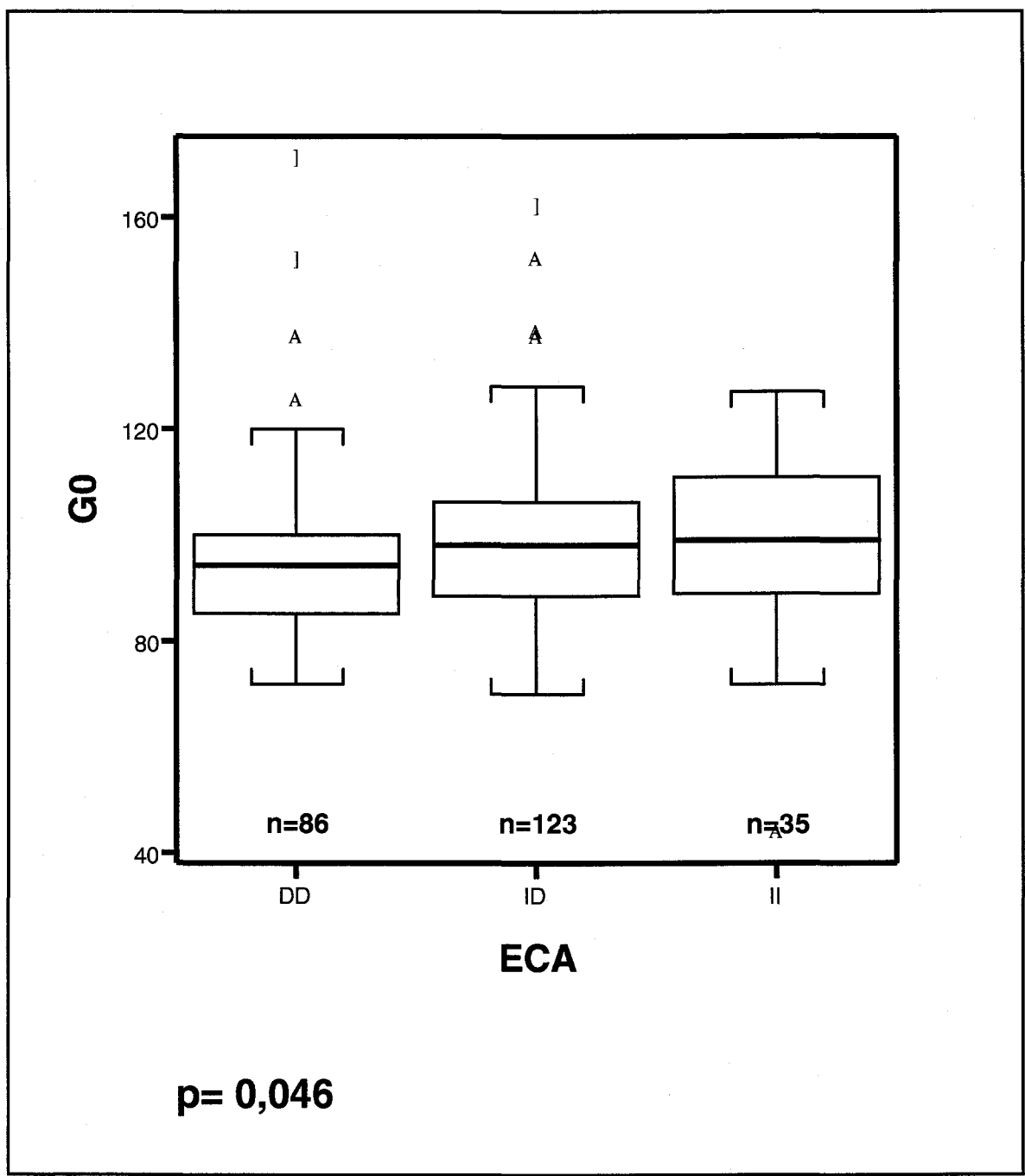


Figura 2: Polimorfismo I/D de la ECA. Glucemia basal.

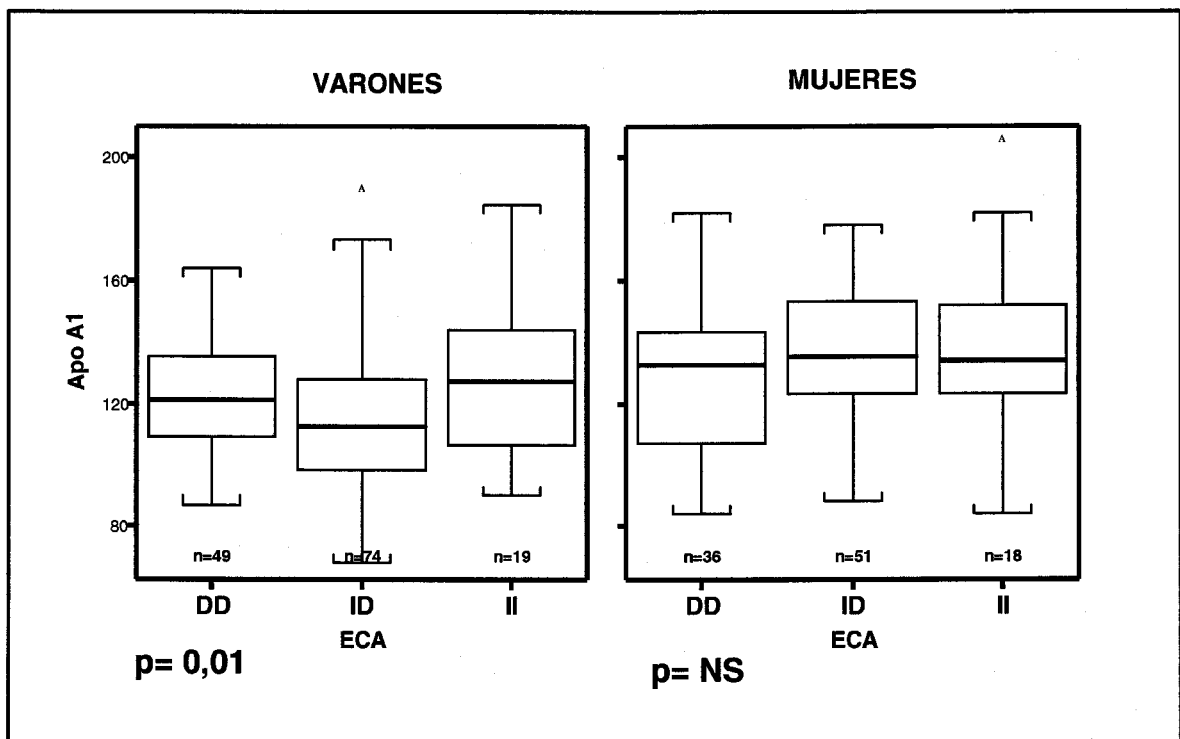
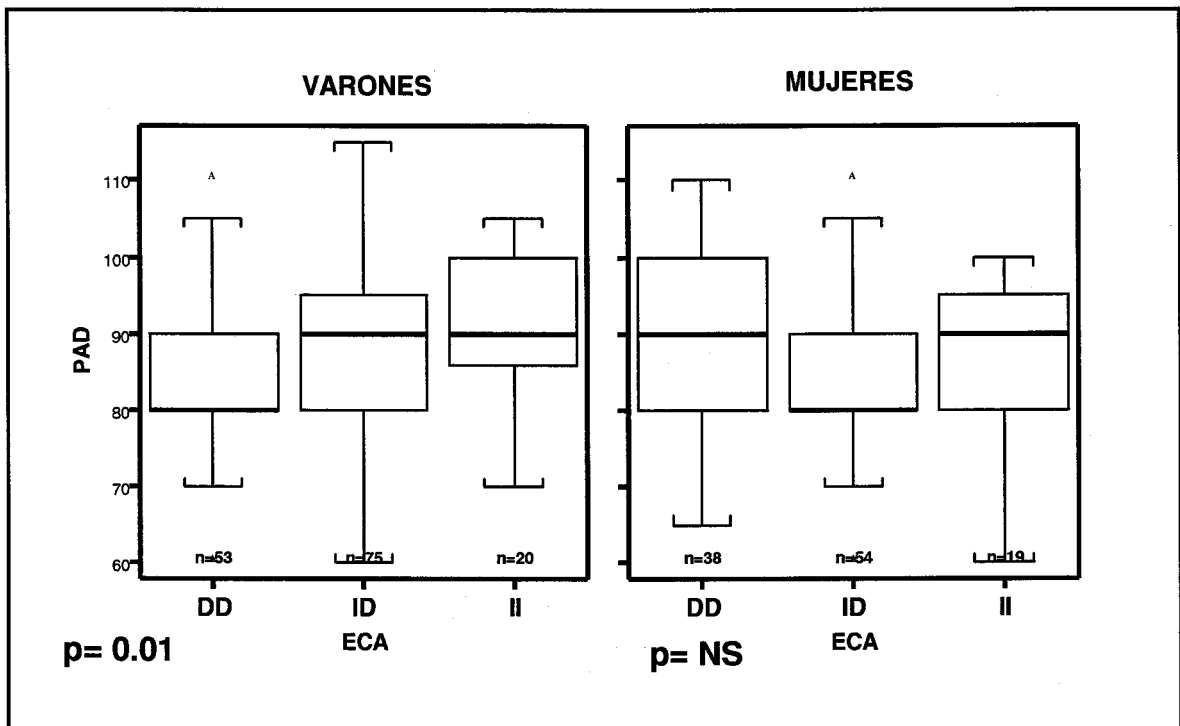


Fig. 3 y 4: Polimorfismo I/D de la ECA. Niveles de PAD y apo A1.

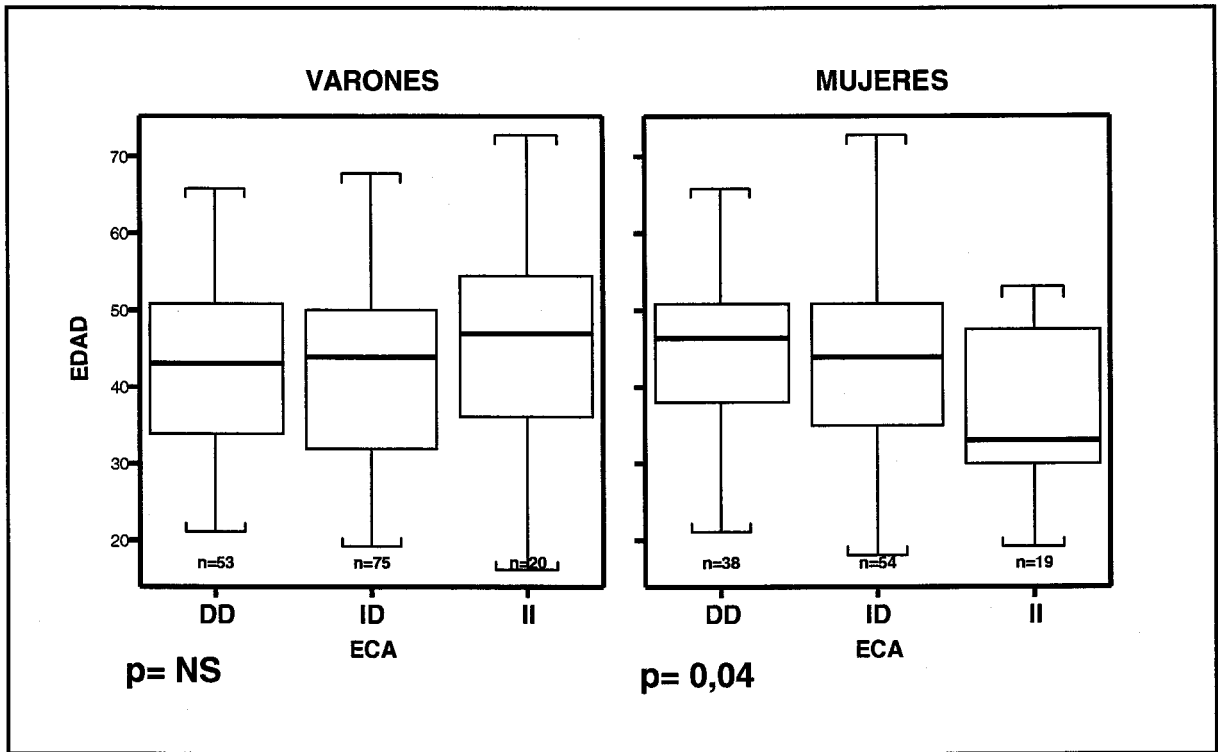


Fig. 5: Polimorfismo I/D de la ECA. Edad.

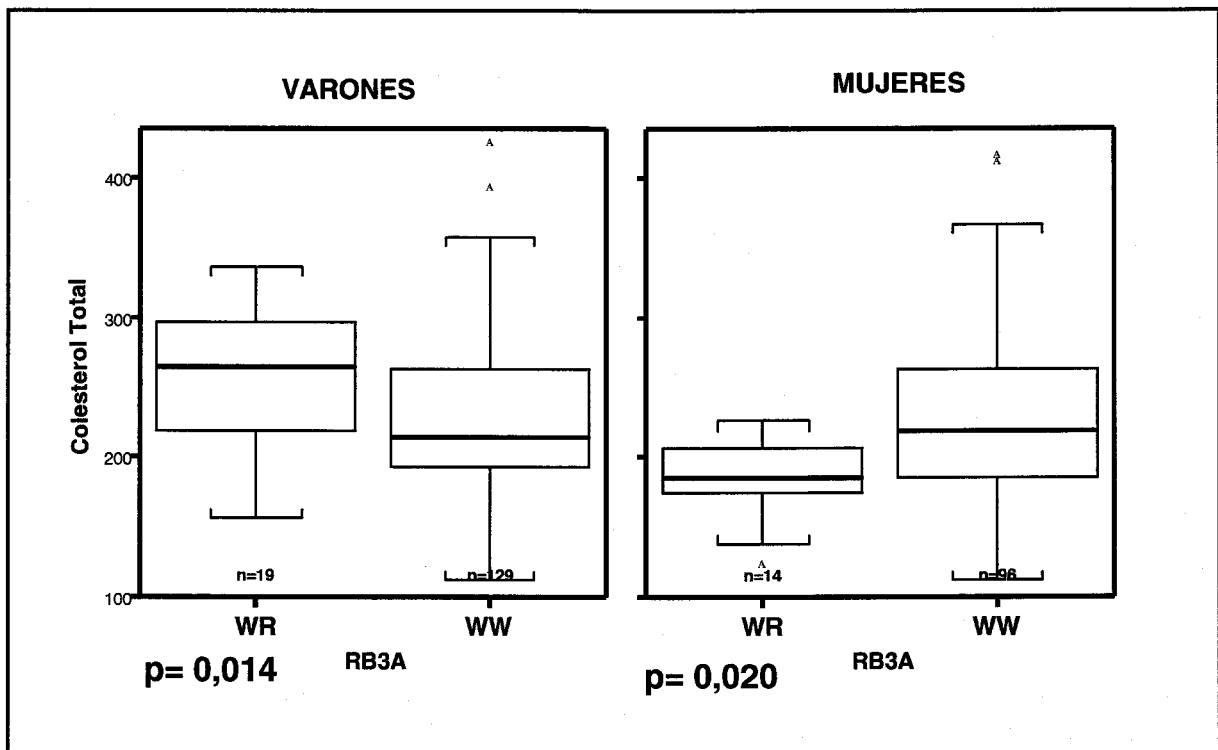


Fig. 6: Polimorfismo del R3BA. Colesterol total.

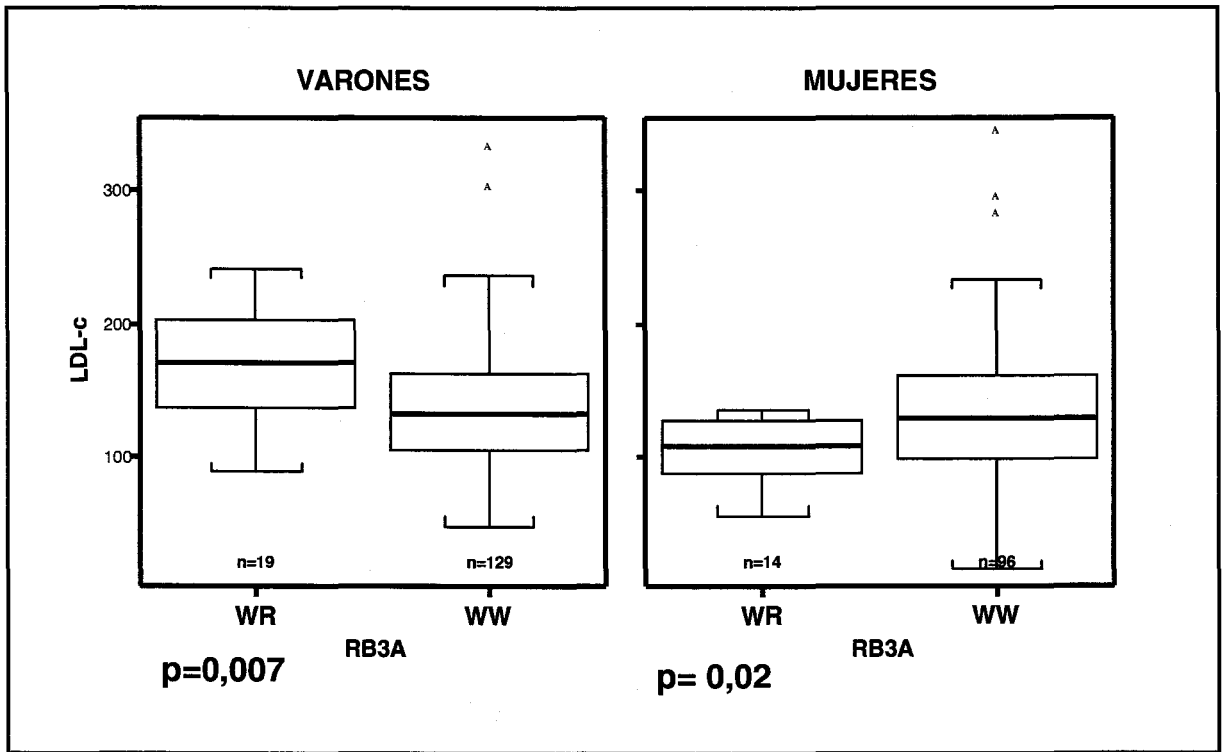


Fig. 7: Polimorfismo del R3BA. Colesterol LDL.

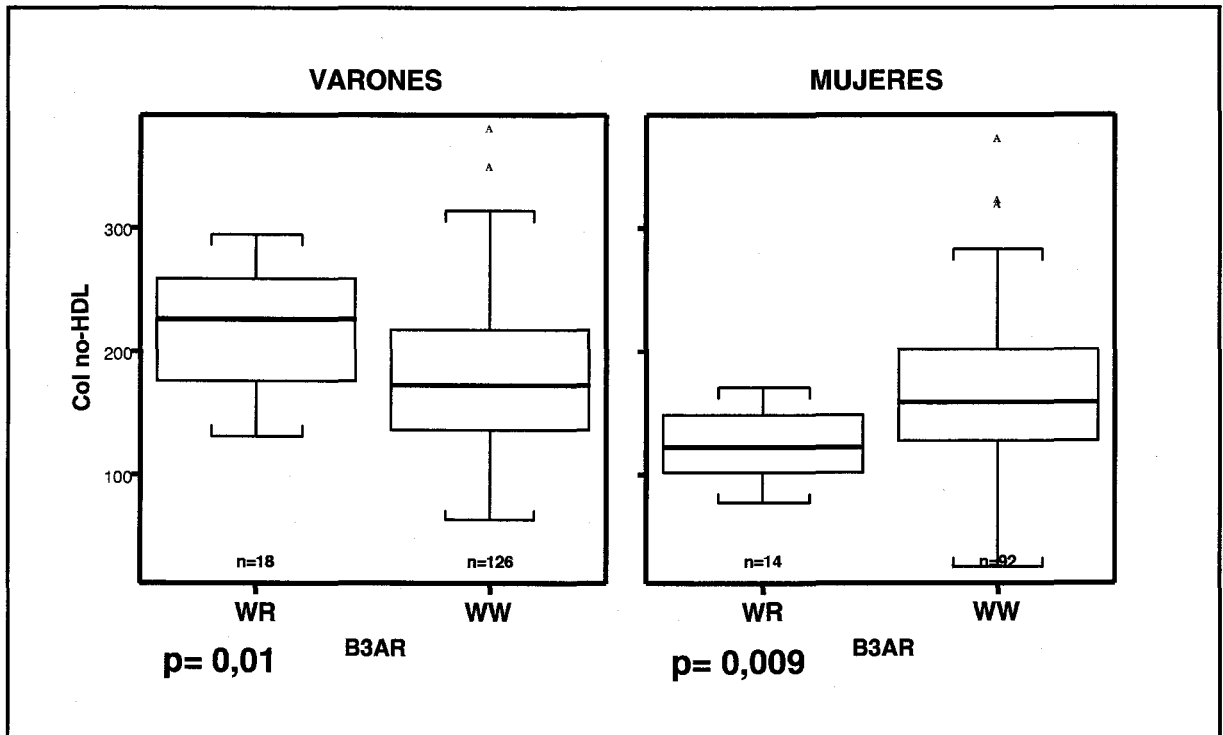


Fig. 8: Polimorfismo del R3BA. Colesterol HDL.

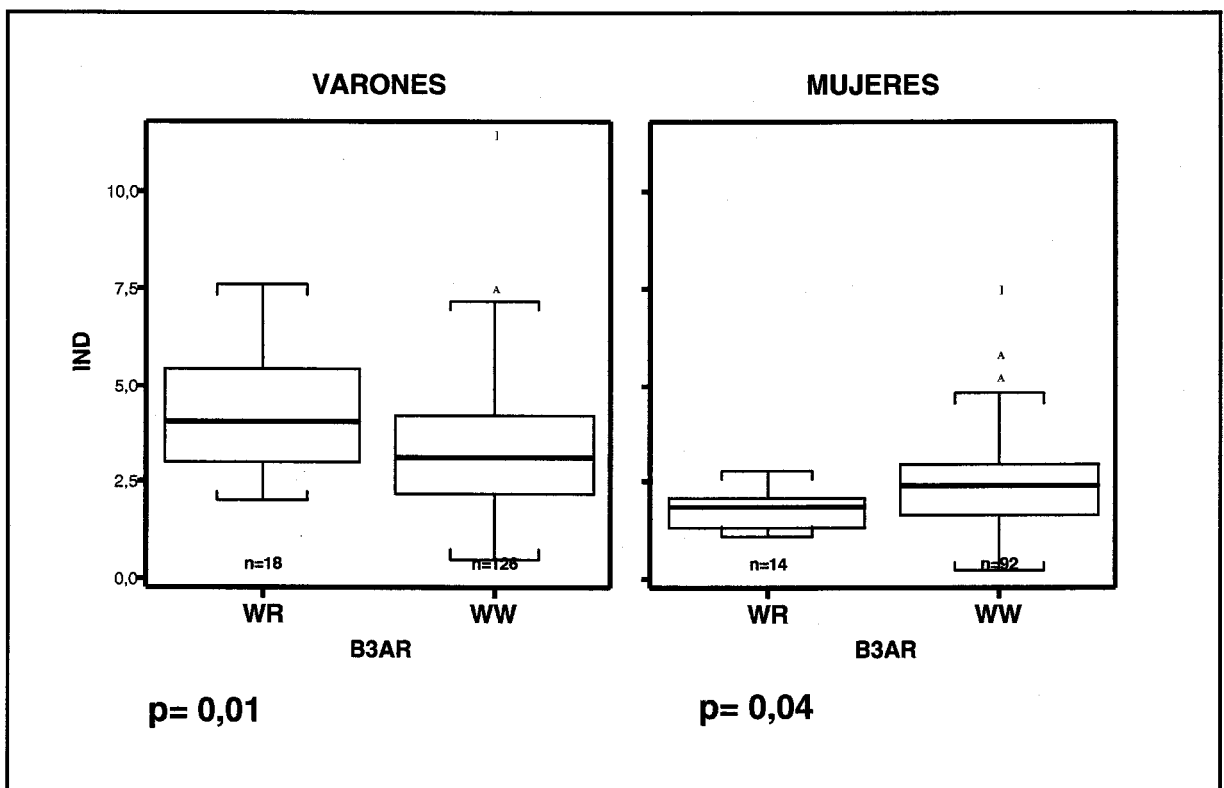


Fig. 9: Polimorfismo del R3BA. Índice aterogénico.

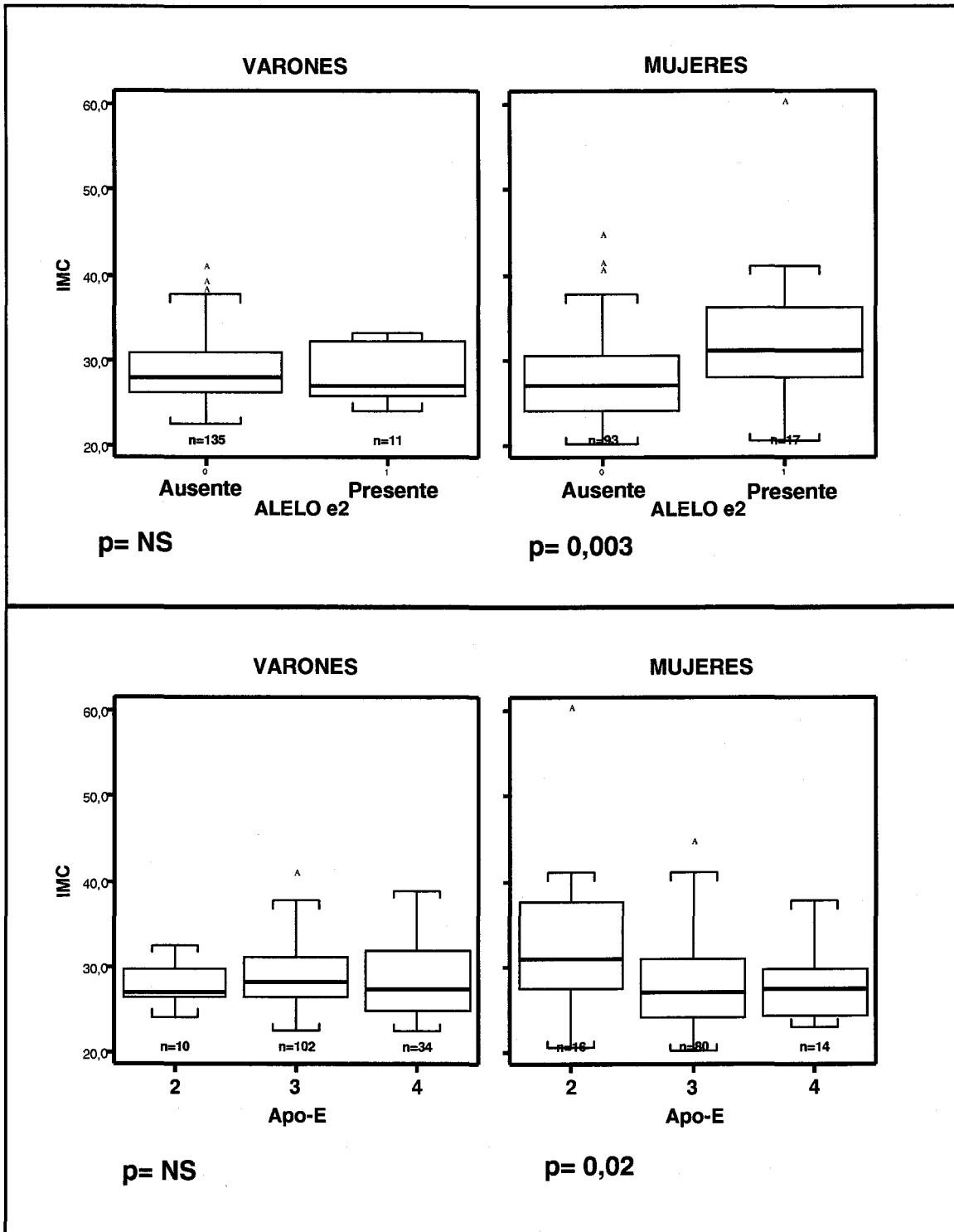


Fig. 10: Polimorfismo de la apo E. IMC

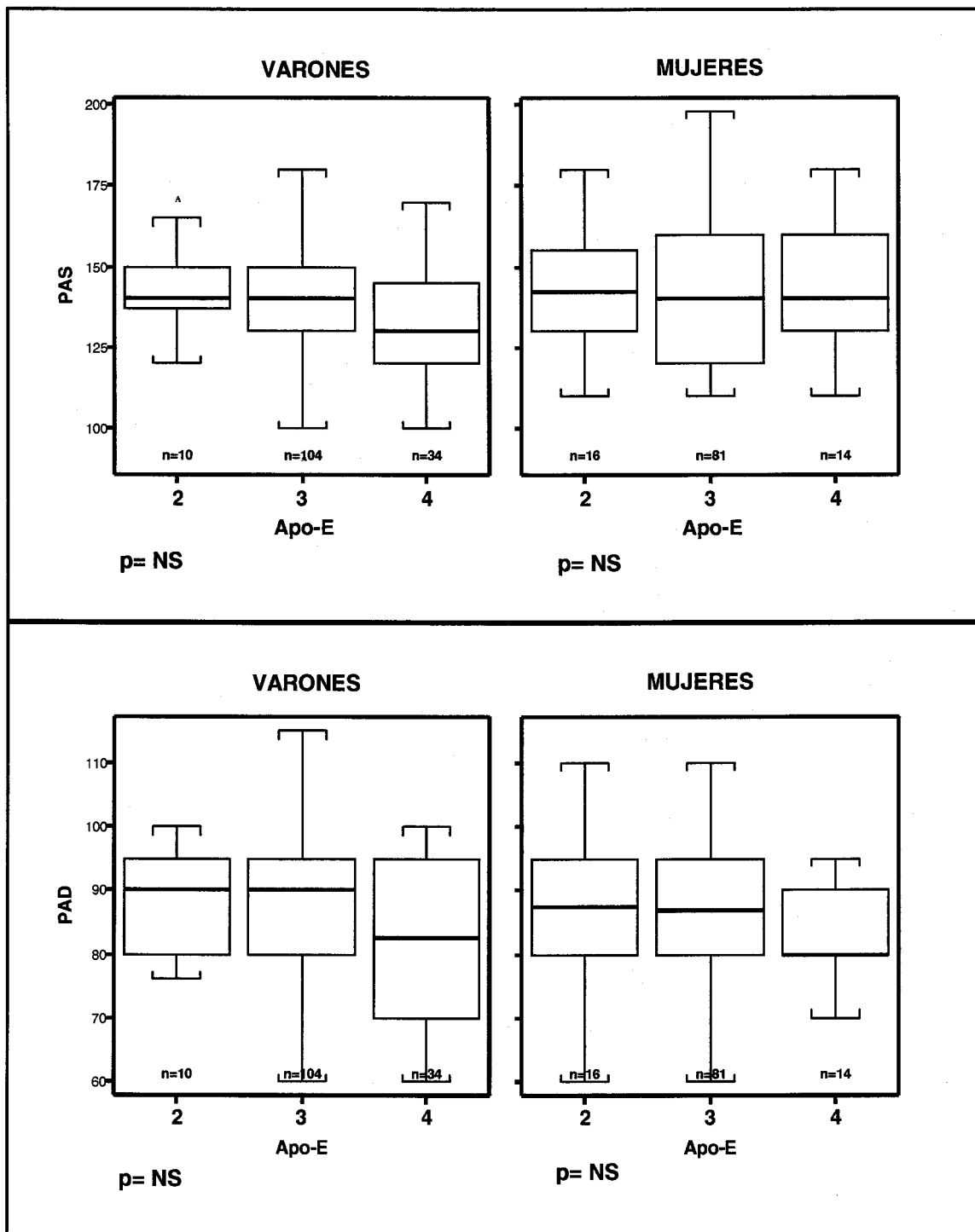


Fig. 11: Polimorfismo de la apo E. PAS y PAD.

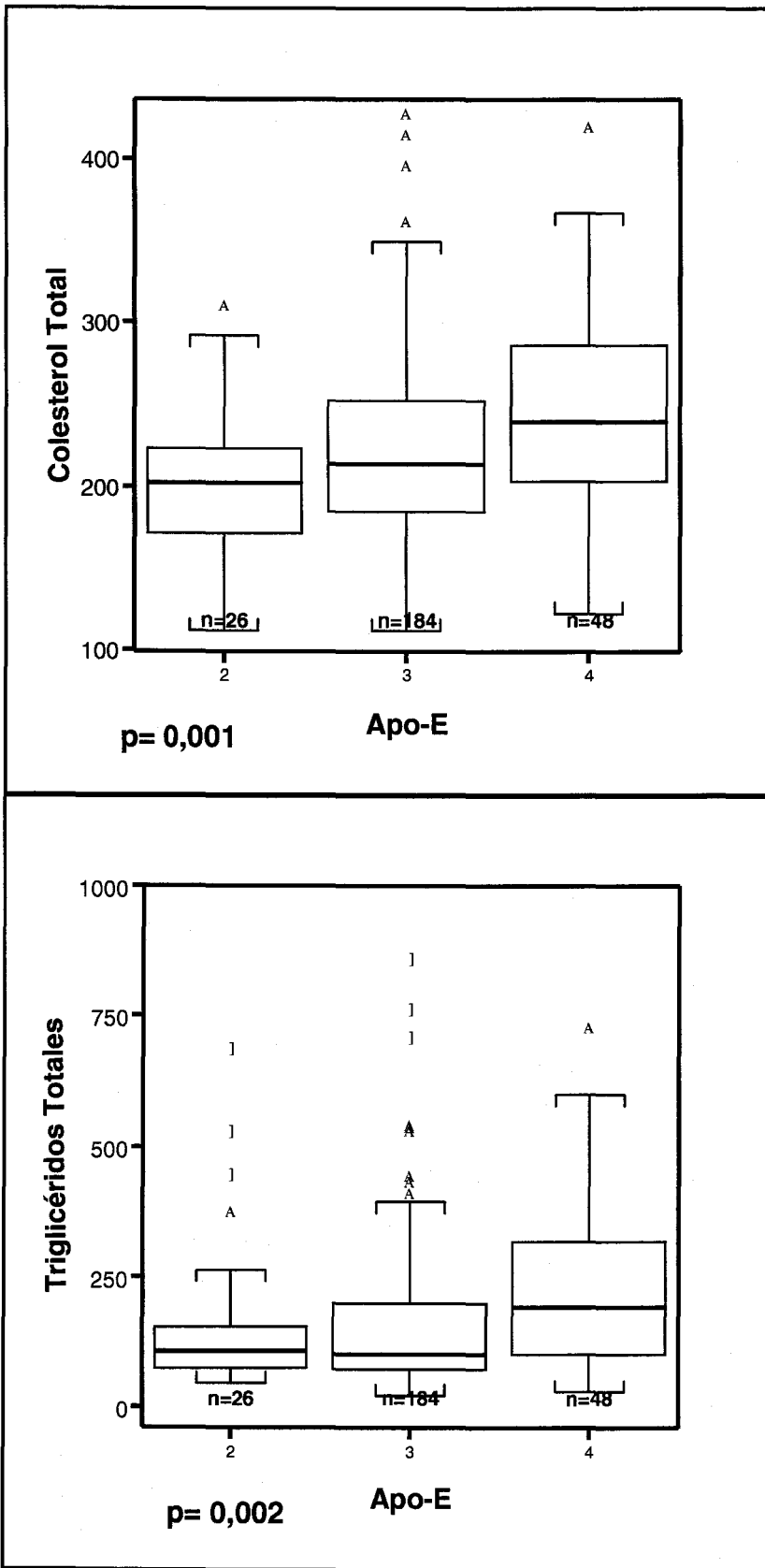


Fig. 12: Polimorfismo de la apo E. Colesterol y Triglicéridos

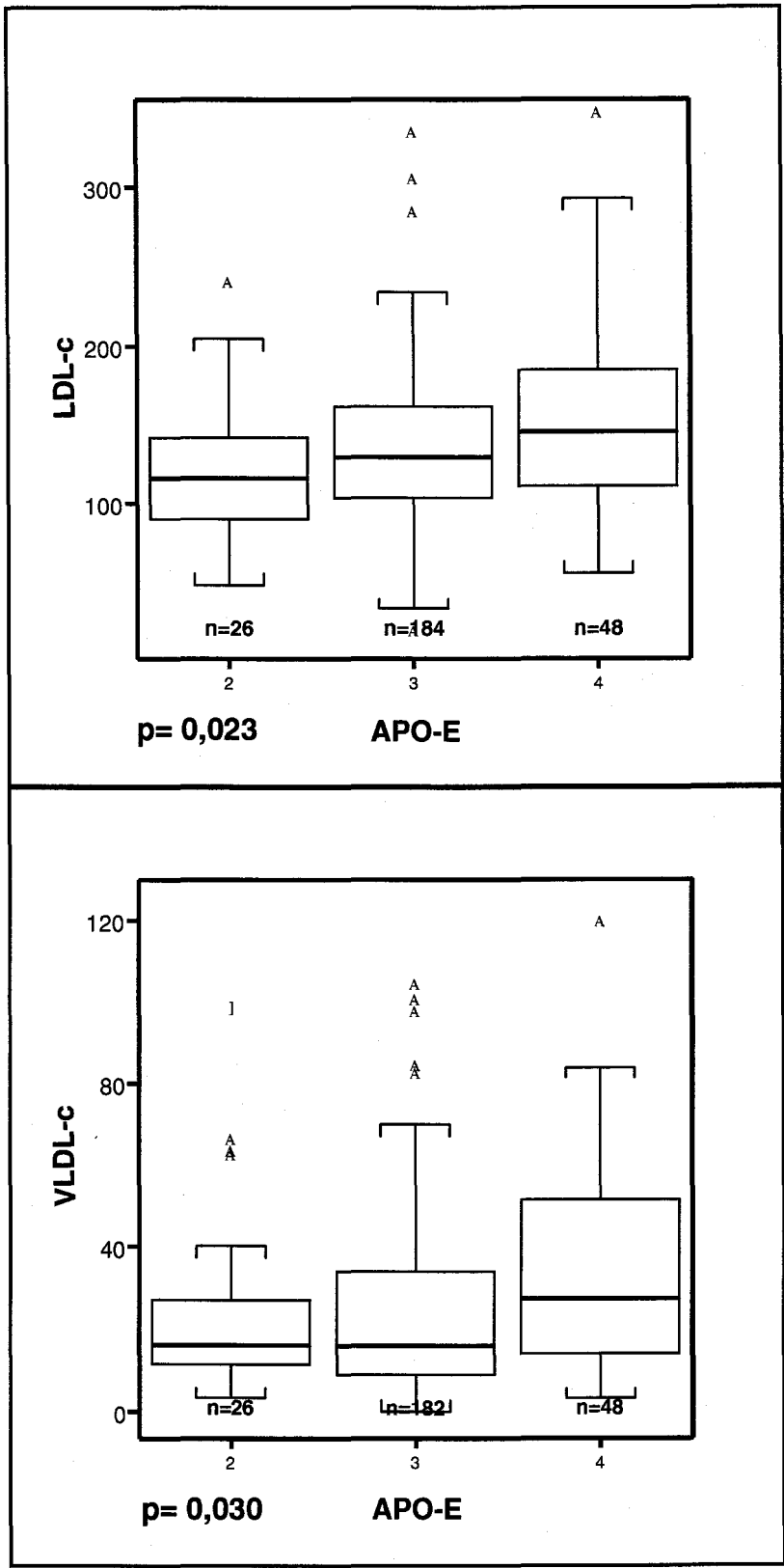


Fig. 13: Polimorfismo de la apo E. VLDL-C y LDL-C.

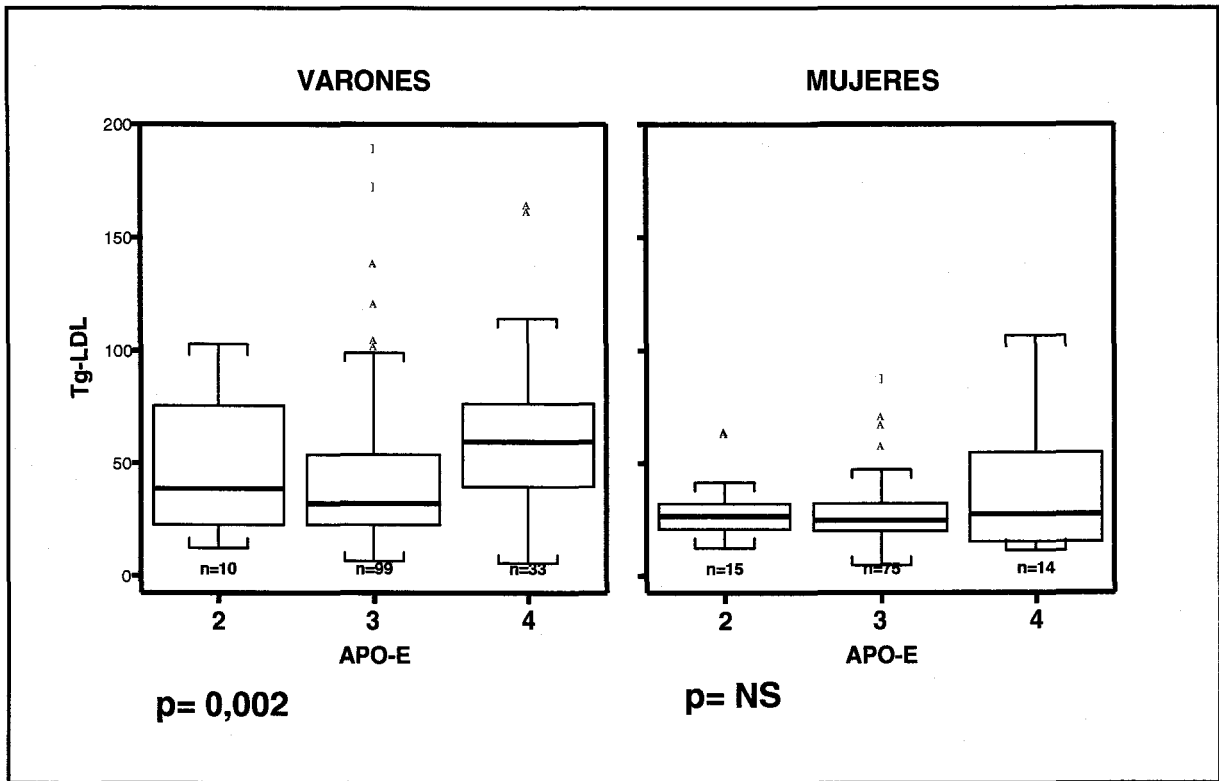


Fig. 14: Polimorfismo de la apo E. Tg-LDL.

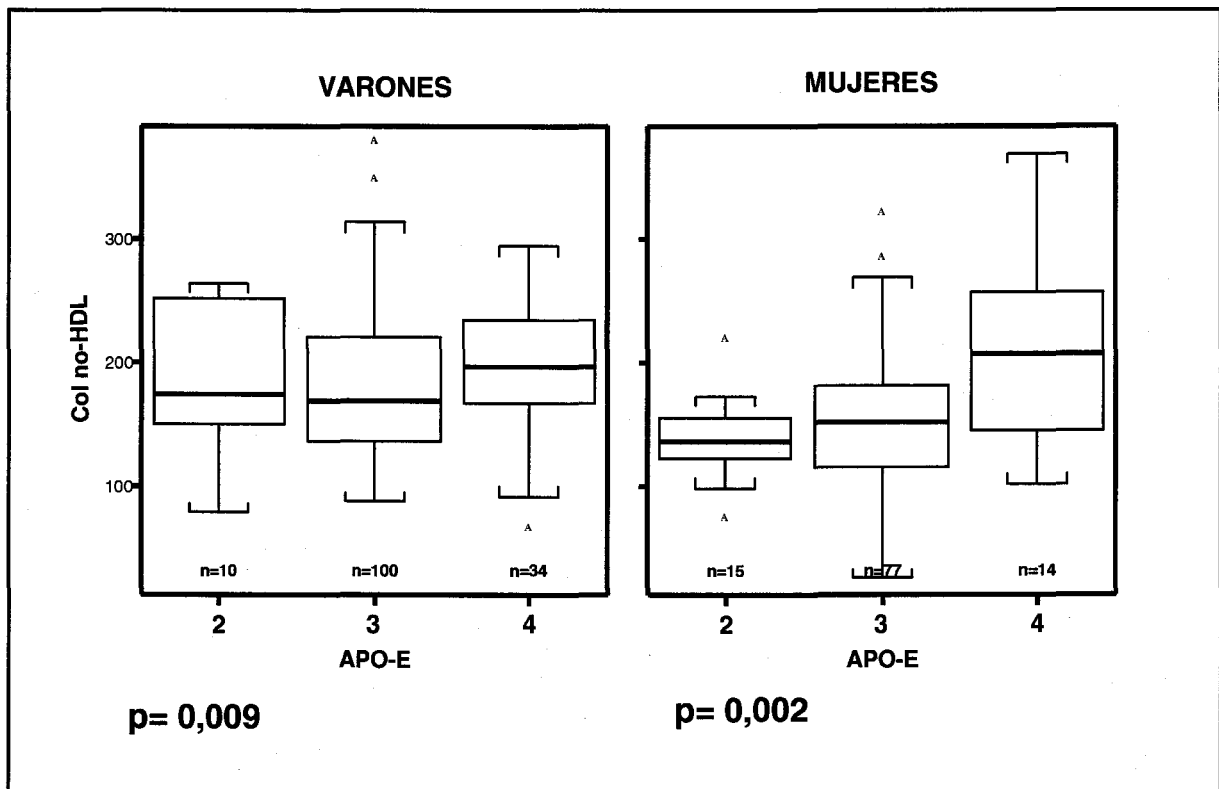


Fig. 15: Polimorfismo de la apo E. Col no-HDL.

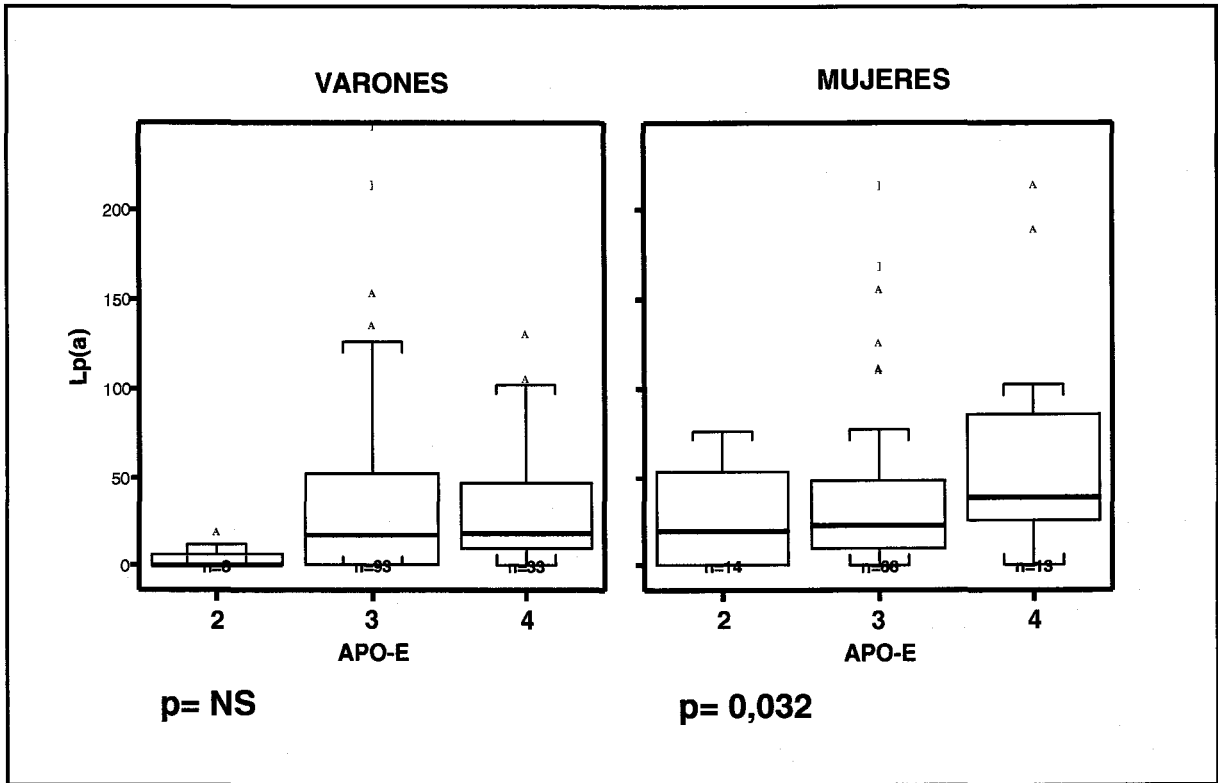


Fig. 16: Polimorfismo de la apo E. Lipoproteína a.

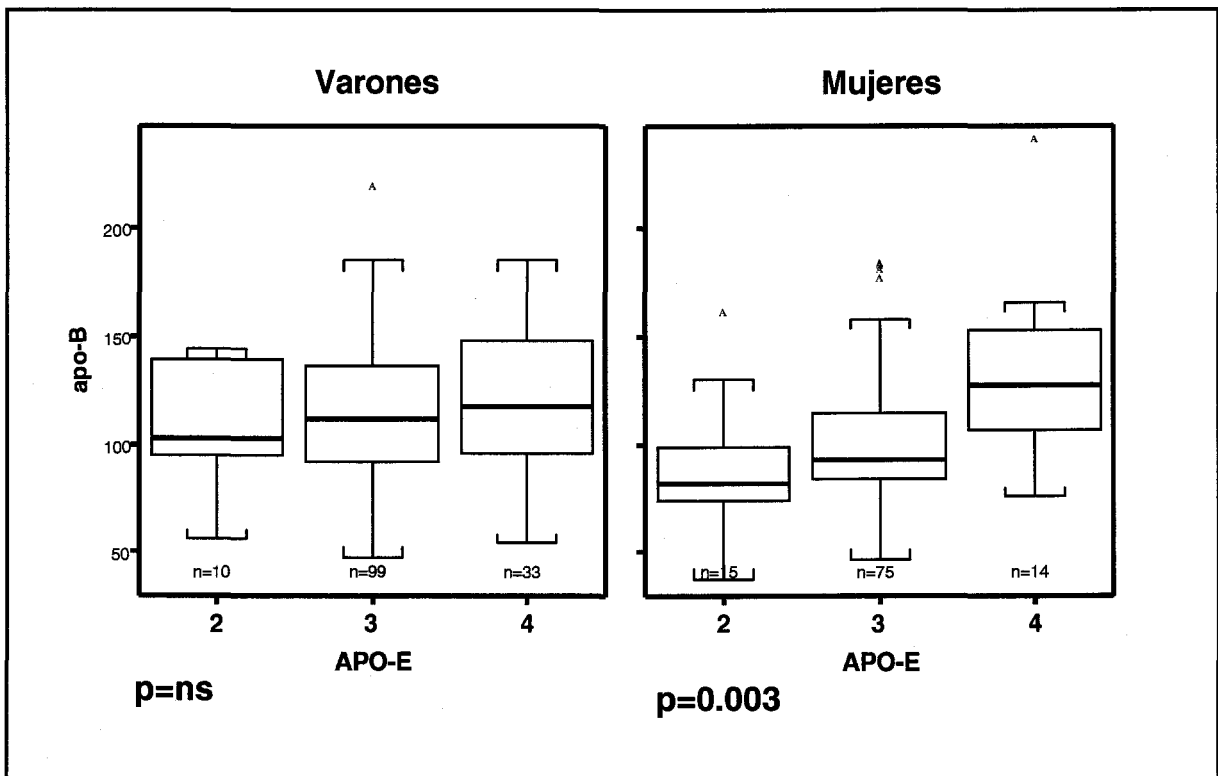


Fig. 17: Polimorfismo de la apo E. Apoproteína B.

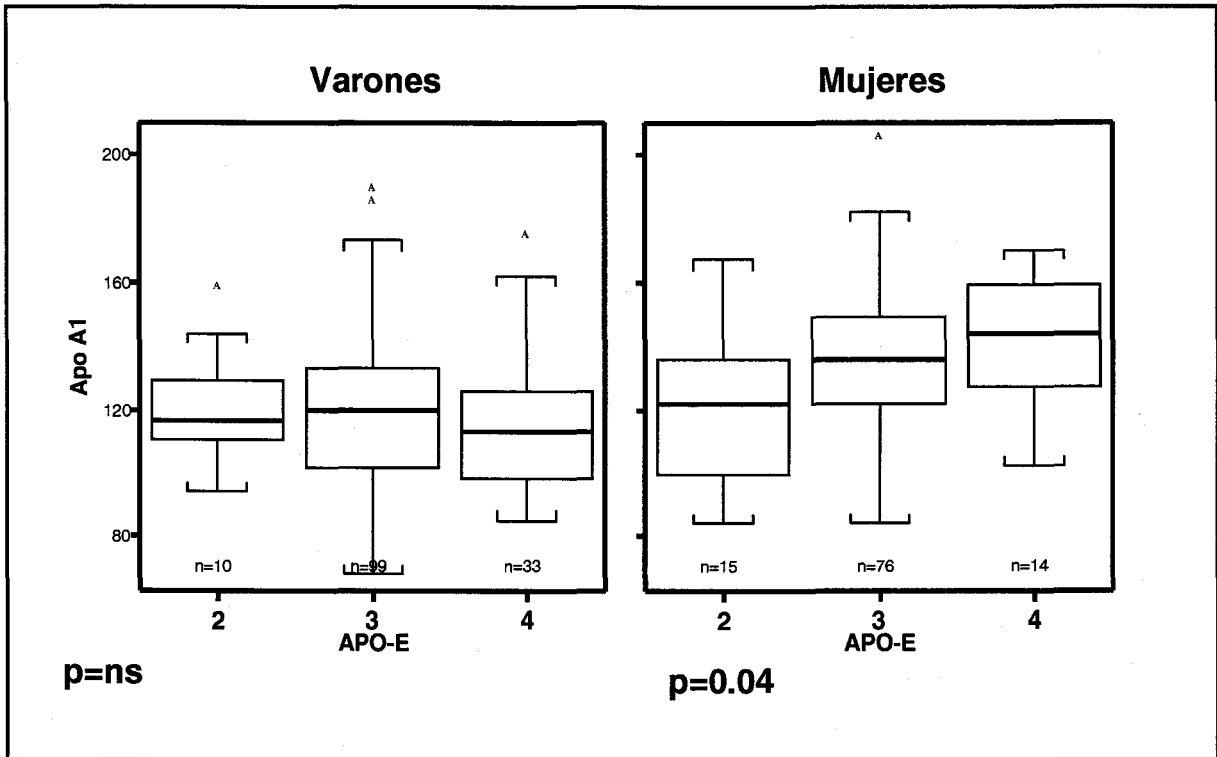


Fig. 18: Polimorfismo de la apo E. Apoproteína A1.

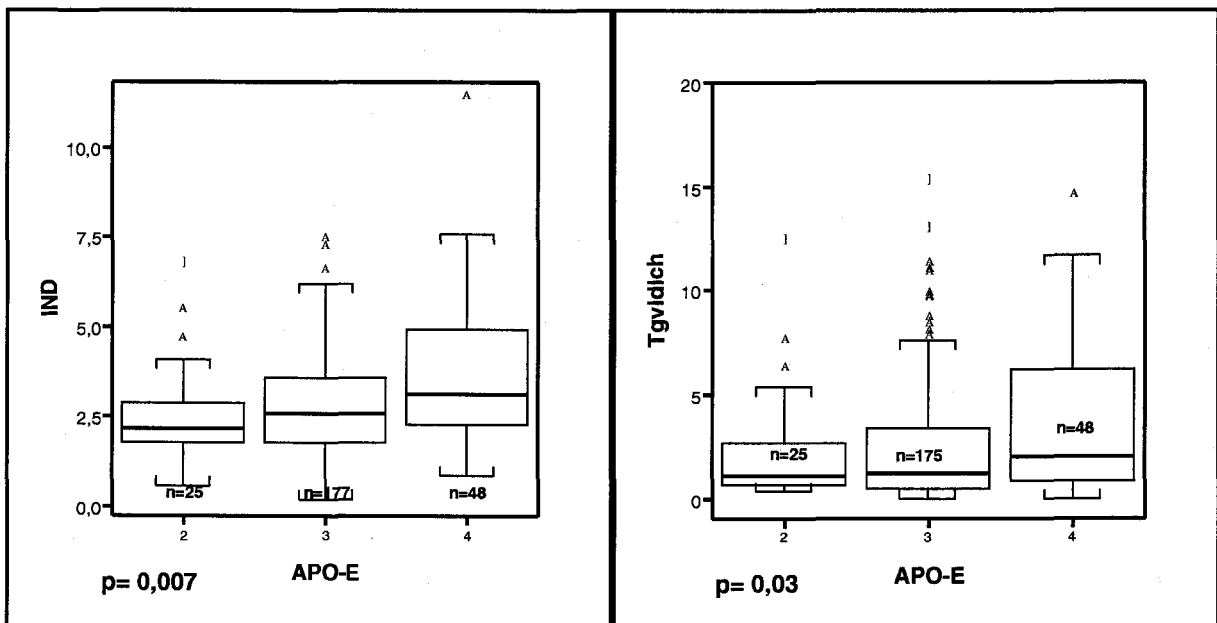


Fig. 19: Metabolismo Hidrocarbonado y apo E4 en varones.

	APOE	U Mann-Whitney	Rango promedio	p
G0	E3	1533,5	65.49	NS
	E4		71.40	
G60	E3	1478,5	67.76	NS
	E4		60.99	
G120	E3	1573,0	65.22	NS
	E4		68.24	
IN0	E3	1427,5	63.37	NS
	E4		71.51	
IN60	E3	1589,0	65.05	NS
	E4		66.76	
IN120	E3	1631,0	65.49	NS
	E4		65.53	
GAR	E3	556,5	44.16	NS
	E4		43.28	
INAR	E3	477,0	42.31	NS
	E4		48.69	
HOMA	E3	1422,0	62.97	NS
	E4		68.91	
XBETA	E3	1487,5	63.66	NS
	E4		66.92	

Tabla 8: Metabolismo hidrocarbonado y apo E4 en varones.

	APOE	U Mann-Whitney	Rango promedio	p
G0	E3	294,5	41.03	0,012
	E4		59.46	
G60	E3	345,0	39.57	NS
	E4		50.86	
G120	E3	350,5	39.65	NS
	E4		50.46	
IN0	E3	323,0	39.25	0,05
	E4		52.43	
IN60	E3	403,0	40.43	NS
	E4		46.71	
IN120	E3	415,5	40.61	NS
	E4		45.82	
GAR	E3	249,9	32.29	NS
	E4		30.45	
INAR	E3	238,0	32.51	NS
	E4		29.30	
HOMA	E3	274,0	38.53	0,031
	E4		53.92	
XBETA	E3	391,5	41.74	NS
	E4		37.12	

Tabla 9: Metabolismo hidrocarbonado y apo E4 en mujeres.

	APOE	U Mann-Whitney	Rango promedio	p
G0	E2	387,0	65.80	NS
	E3		53.91	
G60	E2	269,0	67.88	NS
	E3		51.77	
G120	E2	287,0	65.63	NS
	E3		51.96	
IN0	E2	288,0	64.50	NS
	E3		51.50	
IN60	E2	288,5	64.44	NS
	E3		51.51	
IN120	E2	228,0	72.00	NS
	E3		50.88	
GAR	E2	141,5	27.08	NS
	E3		40.01	
INAR	E2	210,0	38.50	NS
	E3		38.50	
HOMA	E2	257,0	67.38	NS
	E3		50.71	
XBETA	E2	352,0	55.50	NS
	E3		51.71	

Tabla 10: Metabolismo hidrocarbonado y apo E2 en varones.

	APOE	U Mann-Whitney	Rango promedio	p
G0	E2	411,0	51.14	NS
	E3		42.63	
G60	E2	410,0	36.79	NS
	E3		42.47	
G120	E2	397,5	35.89	NS
	E3		42.65	
IN0	E2	402,0	46.79	NS
	E3		40.41	
IN60	E2	429,0	44.86	NS
	E3		40.81	
IN120	E2	392,5	47.46	NS
	E3		40.27	
GAR	E2	278,0	36.33	NS
	E3		32.25	
INAR	E2	272,5	36.79	NS
	E3		32.14	
HOMA	E2	388,0	47.79	NS
	E3		40.21	
XBETA	E2	464,0	40.64	NS
	E3		41.68	

Tabla 11: Metabolismo hidrocarbonado y apo E2 en mujeres.

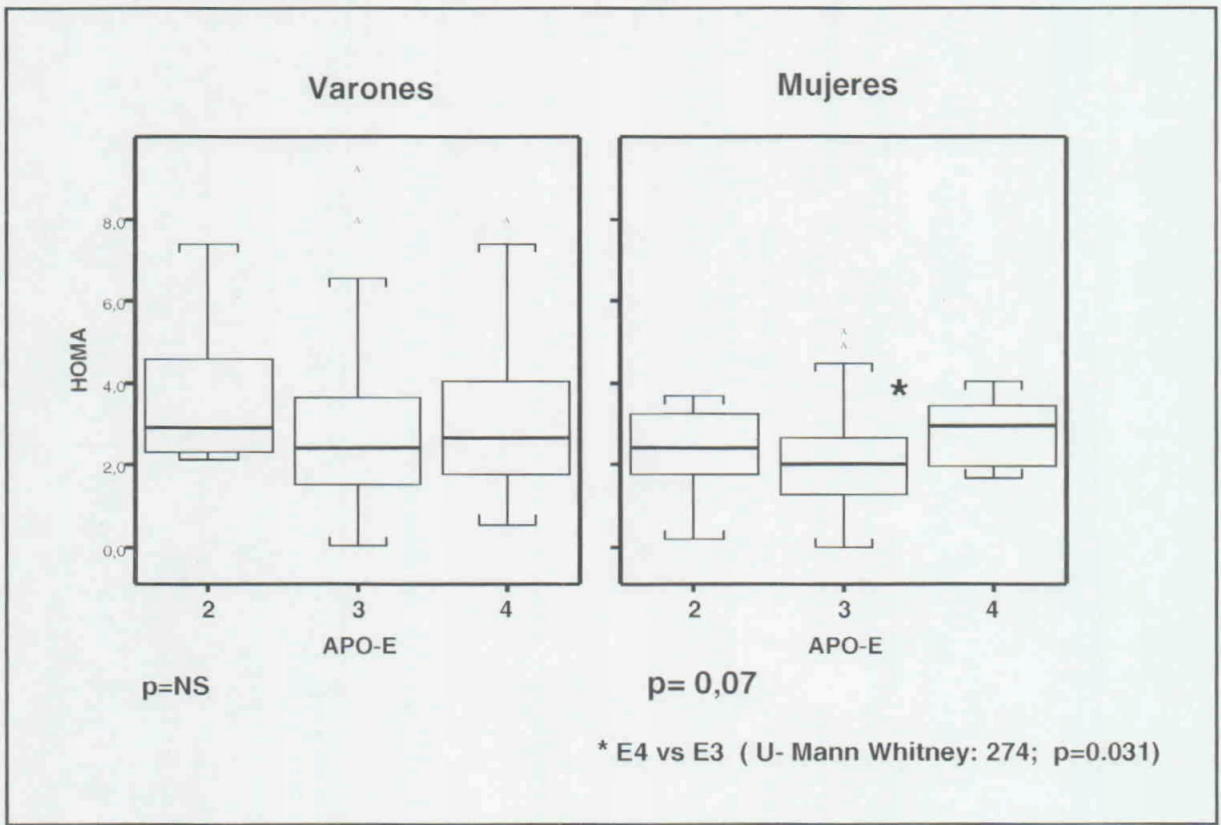


Fig. 20: Polimorfismo de la apo E. HOMA.

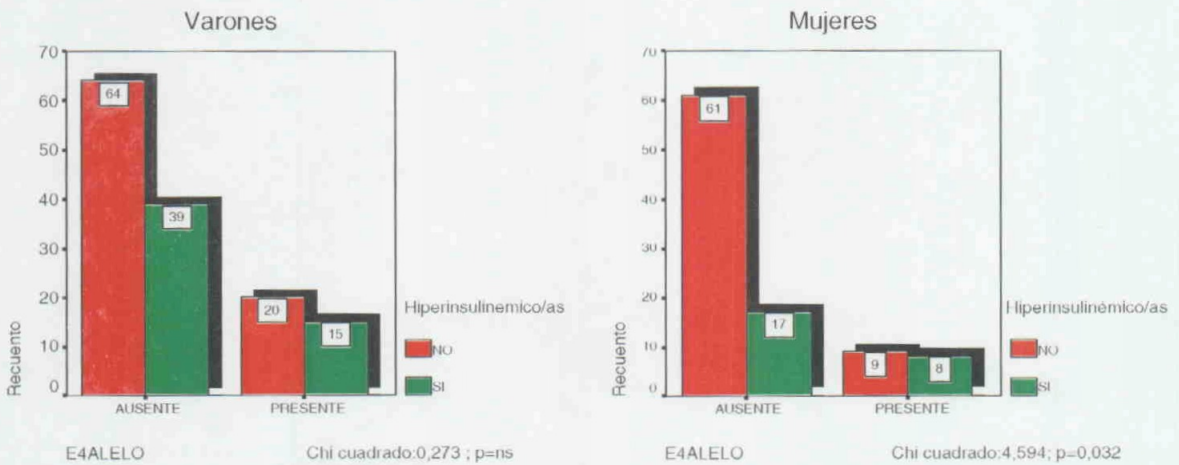


Fig. 21: Polimorfismo de la apo E. HTA y alelo E4.

CONTRA-CLM y Apo E en hombres				CONTRA-CLM y Apo E en mujeres			
	APOE	Chi-cuadrado	Rango promedio		APOE	Chi-cuadrado	Rango promedio
Na/LI	E2	1,22	70,11	NaLI	E2	1,2	56,64
	E3		72,80		E3		46,85
	E4		63,79		E4		50,50
Col-m	E2	6,84	76,25 **	Col-m	E2	2,9	47,93
	E3		47,85		E3		34,02
	E4		55,00		E4		34,65
PI	E2	0,5 a	53,38	PI	E2	0,5	38,50
	E3		51,69		E3		34,09
	E4		48,61		E4		37,30
PE	E2	0,7	43,50	PE	E2	3,29	31,00
	E3		52,76		E3		34,68
	E4		52,61		E4		46,65
PS	E2	1,63	62,13	PS	E2	1,7	37,50
	E3		50,85		E3		33,99
	E4		49,96		E4		42,10
PC	E2	6,3	26,5 *	PC	E2	2,7	48,29
	E3		54,69		E3		34,42
	E4		52,86		E4		35,95
SM	E2	0,47	50,94	SM	E2	5,1	19,71
	E3		53,43		E3		38,40
	E4		48,88		E4		34,45
LPC	E2	0,1	53,81	LPC	E2	2,6	45,00
	E3		51,49		E3		34,91
	E4		50,83		E4		32,00
CPH	E2	5,1	73,25	CPH	E2	1,9	46,29
	E3		48,51		E3		34,85
	E4		54,29		E4		35,00

a. * p= 0,04; ** p= 0,03

Tabla 12: Contra y composición lipídica de membrana.

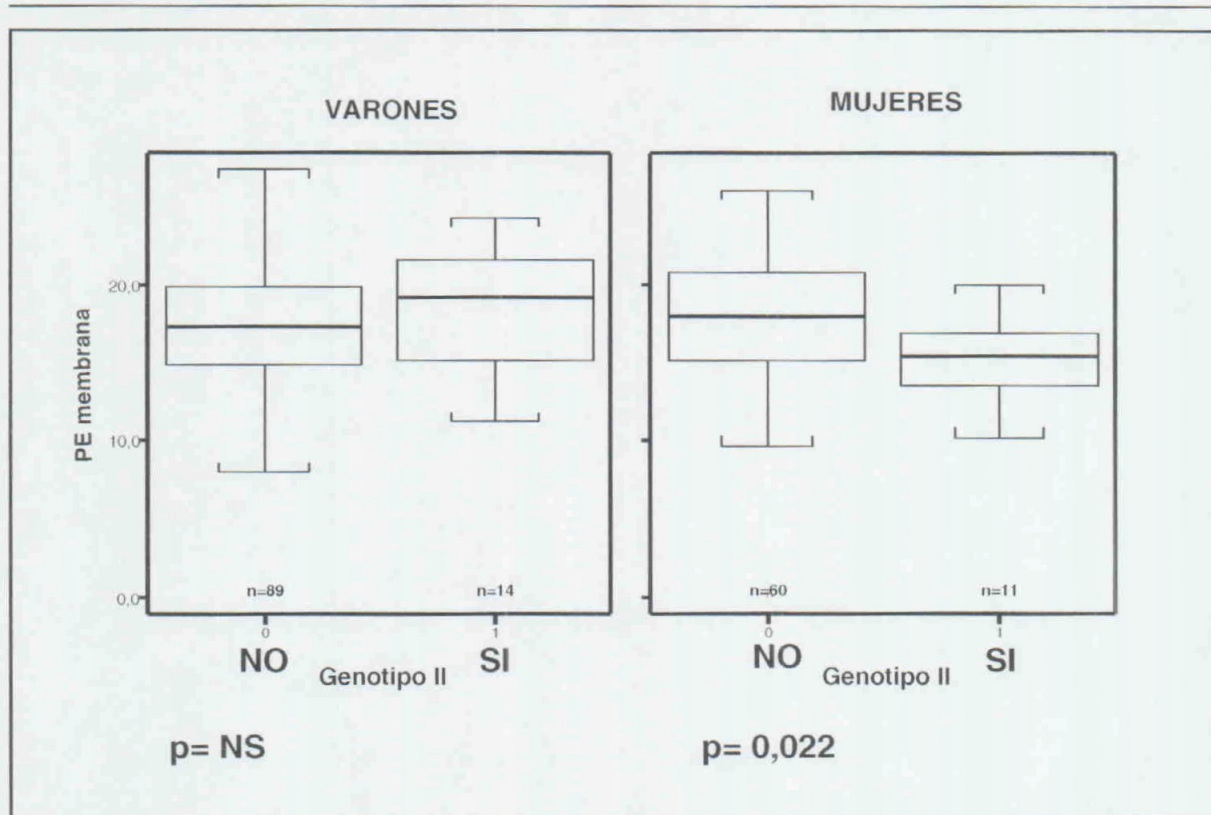


Fig. 22: Composición lipídica de membrana.

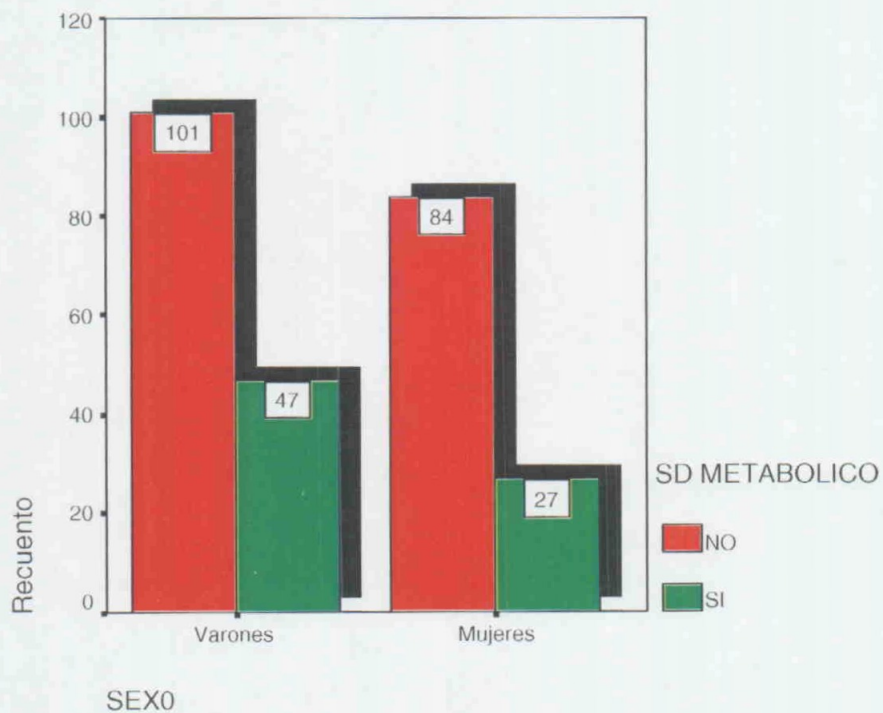


Fig. 23: Presencia de SMB por sexos.

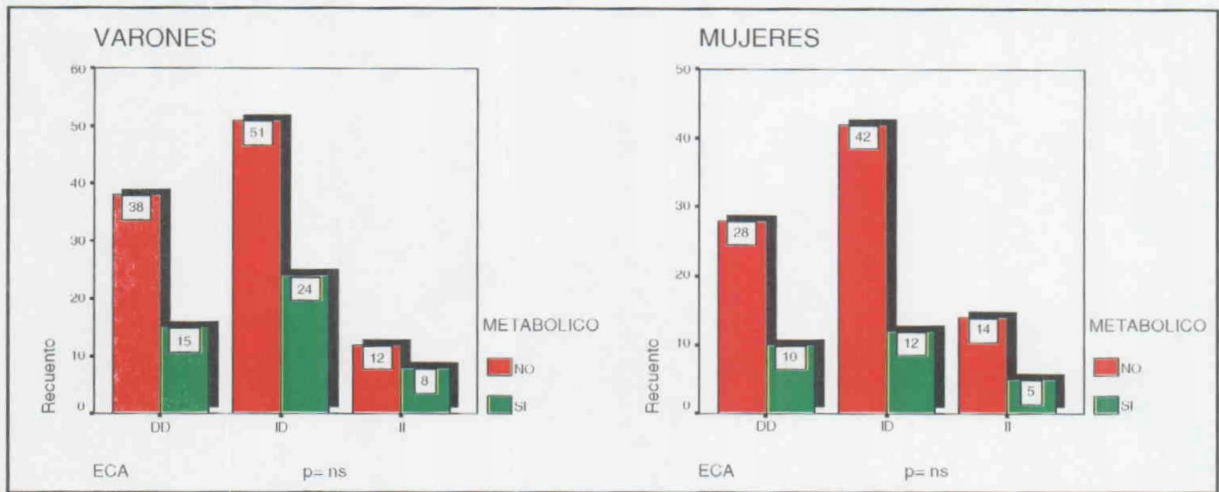


Fig. 24: Presencia de SMB o no en función del polimorfismo I/D de la ECA y por sexos.

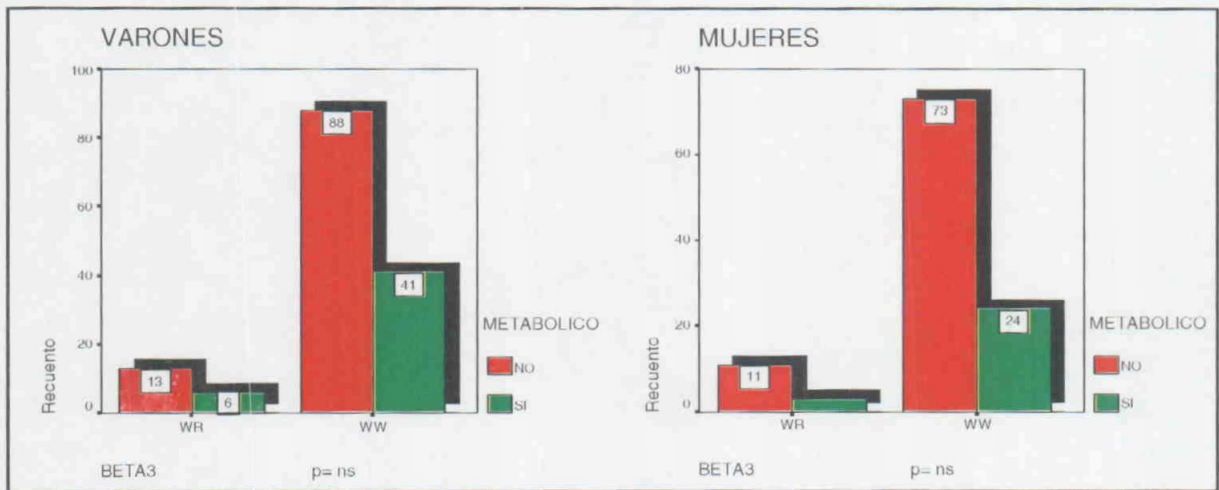


Fig. 25: Presencia de SMB o no en función del polimorfismo RB3A y por sexos.

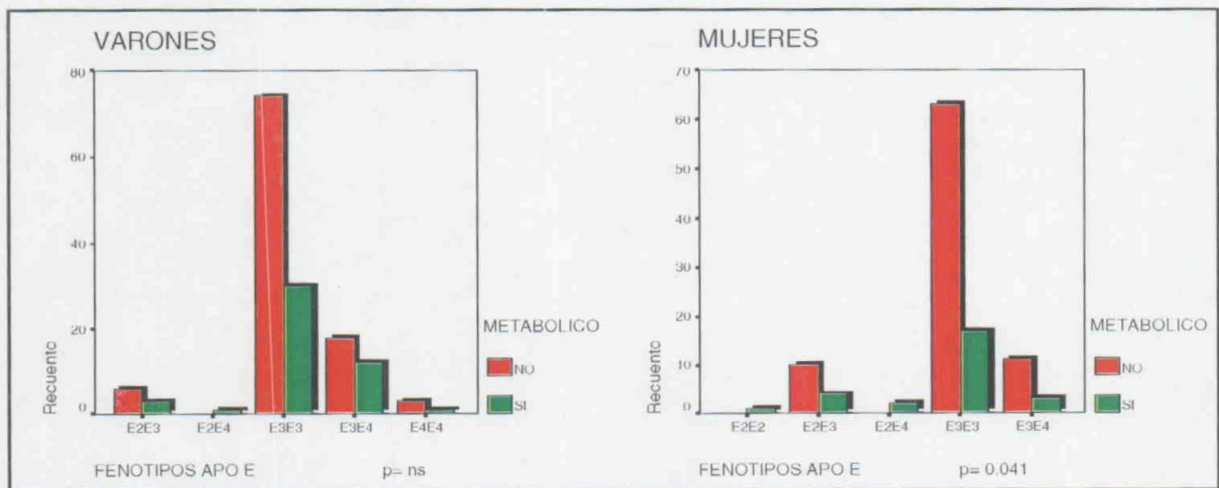


Fig. 26: Presencia de SMB o no en función de los genotipos de la apo E y por sexos.

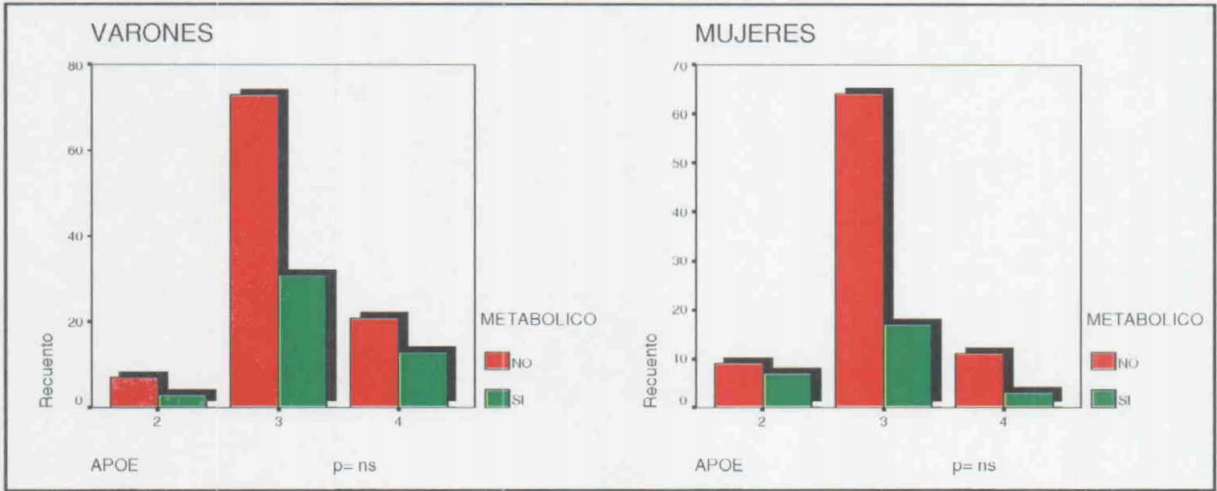


Fig. 27: SMB y apo E en función del sexo.

DISCUSIÓN

En este estudio hemos analizado la relación entre diversos polimorfismos genéticos asociados a la enfermedad cardiovascular y la presencia de alteraciones fenotípicas propias del síndrome metabólico como son la hipertensión arterial, el perfil lipídico aterogénico y la resistencia a la insulina. Y por otra lado, queríamos comprobar si estos polimorfismos, a través o no de estas alteraciones metabólicas, se relacionaban con alteraciones en la composición lipídica de la membrana y la actividad del transportador de membrana de sodio/litio. Para ello, se han estudiado hipertensos ligeros de reciente comienzo, en los que se supone una baja prevalencia de resistencia a la insulina y características fenotípicas de síndrome metabólico; y por tanto, con menor probabilidad de alteraciones en la composición de membrana.

Respecto a los dos primeros polimorfismos estudiados, hemos encontrado que los hipertensos varones con el genotipo II del gen del ECA presentaban mayores valores de PAD respecto al resto de genotipos. La presión arterial no se relacionó con el polimorfismo WR del RB3A ni con la apo-E. Respecto al polimorfismo I/D de la ECA, Zee et al, encuentran una asociación similar con el alelo I en una población hipertensa australiana (164). Estos hallazgos entran en conflicto con los más recientemente publicados que hacen referencia a la asociación del alelo D con la presencia de HTA en varones (171, 317). Y sobre todo, con aquellos estudios que han puesto de manifiesto la ausencia de relación entre el polimorfismo I/D de la ECA con la presencia de HTA o enfermedad cardiovascular (318,319). Diversos autores apuntan que los resultados dispares en diversas etnias pueden deberse a diferencias en la distribución de genotipos en las poblaciones control. En relación a esto, un estudio realizado en población española, por el grupo español de genética e HTA de la SEH-LELHA donde se incluyeron hipertensos de 5 unidades de toda España, incluida la nuestra, no halló asociación alguna entre este polimorfismo y la HTA (320), tras incluir por separado hombres y mujeres; ni tampoco efecto aditivo con el polimorfismo del angiotensinógeno, poniendo en entredicho la participación del sistema RAA en la patogénesis de la enfermedad hipertensiva.

Lo que parece claro es que el polimorfismo del gen de la ECA es un polimorfismo regulador, que no tiene carácter patogénico, por lo que se comportaría como marcador y que la asociación con la HTA puede estar sujeta a variabilidad interindividual o interracial. Sin embargo en nuestro trabajo hay datos que apoyan la relación entre el alelo I con el desarrollo de enfermedad metabólica como es el hecho de asociarse de forma precoz al desarrollo de resistencia a la insulina, con mayores niveles de glucemia basal, tanto globalmente como aisladamente en varones. Además, la mayor edad de las mujeres con el genotipo DD, que por otro lado eran más obesas, apoyan la hipótesis de un mayor déficit de alelos I en esta población hipertensa como consecuencia de pérdidas de genotipos II [en años, II vs ID+DD: P50(P75-25): 45 (16); U-Mann Whitney:553; p =0.012 para mujeres y P50 (p75-25): 44(17); U-Mann Whitney: 1091; p=0,28 para varones]. Estos resultados apuntan la hipóte-

sis que el sistema renina-angiotensina-aldosterona podría participar en la regulación metabólica de los hidratos de carbono, bien a través de los efectos deletéreos de la angiotensina-II o regulando el metabolismo del adipocito sobre los ácidos grasos libres, elemento patogénico clave en el síndrome de resistencia a la insulina.

En este estudio no encontramos una asociación entre el polimorfismo I/D de la ECA y la existencia de SMB, sin embargo en un trabajo cuyos resultados no se han publicado, si encontramos dicha asociación en varones con genotipo II junto más alteraciones del metabolismo hidrocarbonado tras la SOG(321). Cada vez más hay más evidencia de la participación del sistema RAA en la regulación metabólica a raíz de los estudios que han demostrado la existencia de un sistema renina-angiotensina local en el adipocito humano. Se especula que este sistema local pueda participar en la patogénesis de trastornos relacionados con obesidad como hipertensión arterial o síndrome metabólico (322). En esta línea, Vasku A et al (323) han descrito una relación estrecha entre 3 polimorfismos del gen de angiotensinógeno con la presencia de obesidad en hipertenso frente a controles. También se ha visto una sobreexpresión de otros genes pertenecientes al sistema como el receptor AT1 en tejido adiposo visceral de sujetos con sobrepeso y normales(10). Especialmente importante es el hecho de que se ha demostrado mediante estudios in vivo e in vitro que el metabolismo y desarrollo del tejido adiposo son regulados por la actividad de la angiotensina II (324). Finalmente, apoyando esta interrelación SRAA-Obesidad-SMB hay estudios que demuestran que el alelo I se encuentra sobreexpresado en pacientes hipertensos con SMB mediado por una mayor prevalencia de alteraciones del metabolismo de la glucosa en forma de hiperinsulinismo, intolerancia hidrocarbonada o diabetes mellitus (325,326,327). En estos trabajos se demuestra que los sujetos homocigóticos para el alelo I presentaban un mayor grado de resistencia a la insulina y un mayor riesgo potencial para el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2.

El conjunto de diabetes mellitus tipo 2, dislipemia e hipertensión constituyen el llamado síndrome metabólico y la obesidad, sobre todo la central o visceral, parece ser un nexo de unión importante entre todas estas alteraciones. Otros de los genes candidatos para el desarrollo de resistencia a la insulina y/o síndrome metabólico es el RB3AD. En nuestro trabajo no encontramos relación entre este polimorfismo y las cifras de PA, insulina o glucemia en los 3 puntos de la curva de SOG ni en los índices de resistencia a la insulina: HOMA o % BETA. Tampoco fuimos capaces de encontrar asociación con la presencia o no de obesidad (IMC>30), como también ha ocurrido en otras poblaciones (328, 329). A pesar de no encontrar relación con algunos elementos del SMB, los hipertensos varones con mutación WR del RB3A presentaban un perfil lipídico muy aterogénico, con mayores niveles Tg y colesterol no-HDL, así como con mayores concentraciones plasmáticas de Col- total y col-LDL. Este perfil lipídico desfavorable llevó a relacionar al polimorfismo con un índice aterogénico más elevado entre los varones. Las diferencias

eran las opuestas en la población femenina, con una distribución similar de alelos por sexos, y desaparecían cuando se analizaban globalmente los hipertensos. Esta diferencia de comportamiento del perfil lipídico puede estar explicada por un hipotético dimorfismo sexual de este polimorfismo como ocurre con el de la ECA, por la influencia de otros polimorfismos genéticos o bien por el factor de confusión de la presencia de estrógenos entre un grupo de mujeres relativamente jóvenes. Apoyando esta hipótesis, se han descrito diferencias del comportamiento del RB3A en función del sexo; así, Kawamura et al (330) en una población japonesa-americana encuentran diferencias en la obesidad central y en índices de resistencia a la insulina sólo entre los sujetos varones y no entre las mujeres. En el Québec Family Study también se demostró como los polimorfismos genéticos asociados a los receptores adrenérgicos se asocian más claramente a varones obesos que a mujeres (331).

Resultados muy similares se han encontrado en un estudio realizado en población española por Corella y colaboradores (332) en el que encuentran diferencias asociadas al sexo en cuanto a obesidad y al fenotipo asociado ésta. Así en esta población mediterránea, los varones con la mutación WR presentaban cifras superiores de IMC, triglicéridos y colesterol total, este último después de ajustar por el peso, mientras las mujeres presentaban mayores niveles de glucemia basal y una interacción con el polimorfismo Hind-III de la lipoproteinlipasa. La influencia sinérgica de otros genes sobre el perfil metabólico también ha quedado demostrada, además del de la lipoproteinlipasa, con los genes del receptor sustrato tipo 1 de la insulina(301) o con el de la di-yododinasa humana tipo 2 (333). En nuestro trabajo, posiblemente la prevalencia en mayor proporción del genotipo E4 de la apo E entre los varones ha podido influir en estas diferencias. Cuando analizamos los sujetos portadores de ambas mutaciones (n= 8), las diferencias se magnifican en los hipertensos varones (CT: U M-Whitney: 119; p= 0.003. Tg: 130.5; p= 0.004. HDL-C : 170.5; p=0.01; No- HDLc: 88.5; p=0.001 y Apo-B: 119; p=0.003). En mujeres la mayor prevalencia del alelo e2 da lugar aun efecto protector. Aunque 2 estudios más, uno en población danesa (334) y otro en una cohorte china (335) han encontrado efectos negativos de este polimorfismo sobre el perfil lipídico, éste habitualmente no se ha modificado en relación a este polimorfismo en la mayoría de las publicaciones (290, 336, 337). Estas discrepancias posiblemente estén justificadas por los diferentes tamaños muestrales, por el origen étnico o geográfico y por la edad de los sujetos, o por las interacciones gen a gen o genético-ambientales.

Estas discrepancias entre trabajos vuelven a repetirse cuando se intenta relacionar la mutación Trp64Arg del RB3A con la predisposición para desarrollar un fenotipo metabólico. En nuestro trabajo no hemos podido encontrar esta relación pero recientemente muchos trabajos demostrado la participación de esta mutación en el desarrollo, tanto de alteraciones lipídicas propias de resistencia a la insulina como en el desarrollo precoz de diabetes y sus complicaciones (302). Las características de

nuestra población podría haber sido idónea para alcanzar esta conclusión, ya que son hipertensos de reciente comienzo, con una edad relativamente joven y sin la potencial influencia de medicación, a pesar de encontrar una alta prevalencia de SMB (en torno al 40%). Por ello se hace necesario estudios epidemiológicos prospectivos, funcionales y con sujetos de alto riesgo vascular, estratificados por edad y sexo, para intentar dilucidar la participación de este polimorfismo en desarrollo precoz de complicaciones metabólicas y diabetes mellitus. Es posible que este gen pueda interactuar con otros factores ambientales o genéticos contribuyendo a la modulación de parámetros metabólicos y de la presencia o no de obesidad. Estos efectos pueden ser particularmente evidentes en poblaciones que desarrollan rápidas modificaciones en los estilos de vida. Otro punto poco estudiado es la influencia de este polimorfismo sobre la actividad del CONTRA y la composición lipídica de la membrana. Este polimorfismo no tuvo influencia sobre estos parámetros, en contra de los resultados de un trabajo previo de nuestro grupo (108), posiblemente debido a la corta evolución clínica de los pacientes y la heterogeneidad de la muestra seleccionada.

Un dato interesante a destacar de nuestro trabajo es que independiente de los 3 genes estudiados, la población masculina estudiada presentaba un peor perfil lipídico caracterizado por mayores niveles de colesterol LDL y menores de HDL-colesterol fundamentalmente y además un mayor actividad de CONTRA. Sin embargo cuando analizamos la presencia de características clínicas de SMB no hubo diferencias por sexo, sí en cambio en relación la existencia de obesidad que fue mucho más prevalente entre las mujeres. Esta mayor incidencia de obesidad entre el sexo femenino se relacionó con una mayor número de alelo e2 entre éstas. Mucho más, cuando entre las mujeres, el alelo e2 se asoció a las características fenotípicas del síndrome metabólico y fue mayor la proporción de alelo e2 entre las mujeres que cumplían criterios de síndrome metabólico. Se realizó un estudio de regresión simple, y se mantuvo la relación entre e2-obesidad independientemente de sexo, edad e IMC, aunque el modelo de regresión sobre explicaba un 30% de la asociación.

En este sentido, la presencia del alelo e2 está asociado tanto a cambios pro- como anti-aterogénicos en la composición plasmática de lipoproteínas. El potencial aterogénico del alelo e2 parece estar asociado a los sujetos homocigóticos 2/2 y a la presencia de otros factores como obesidad, diabetes o envejecimiento. En algunas poblaciones del norte de Europa, tanto el e4 como e2 se relacionaron con la presencia de enfermedad coronaria (338) y también se ha indicado que el alelo e2 de la apo-E puede ser un factor de riesgo para una superior morbilidad cerebrovascular (339,340). El nexo de unión entre este mayor riesgo vascular entre los portadores del alelo e2 pudieran ser una predisposición de éste para el desarrollo de obesidad central, resistencia a la insulina o diabetes mellitus. Recientemente los resultados del estudio Framingham han evidenciado un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular entre varones portadores de alelo e2 (OR: 1,59; p=0,004), por lo que parece

que la interacción alelo e2-enfermedad cardiovascular podría depender de la predisposición de este alelo para inducir obesidad central y desarrollo de síndrome metabólico. Apoyando esta hipótesis, en el estudio EARS, un estudio multicéntrico en el que participaron 1994 jóvenes de 11 países (341), se pudo demostrar como en los sujetos con alelo e2 tanto la obesidad como el tener un índice cintura-cadera elevado interaccionan más fuertemente para producir unos niveles de LDL-c y apo-B más elevados. El análisis multivariante indicó que los factores externos modificables explican 3 veces más la variación interindividual de colesterol total y LDL-c en los sujetos apo e2 que en el resto. Resultados similares se han encontrado en algún otro estudio pero sólo en mujeres (342). Sin embargo, se ha encontrado más elementos de relación entre la obesidad y el alelo e4. Así, Oh et al (343) encontraron que el alelo e4 estaba asociado a la presencia de obesidad independientemente del metabolismo lipídico entre mujeres con antecedentes familiares de diabetes, no entre los varones; y Uusitupa y colaboradores (344), en una población finlandesa, demuestran como las mujeres obesas e4 presentan mayores niveles de presión arterial, mayores concentraciones plasmáticas de insulina y mayores índices de resistencia a la insulina. Por tanto parece claro que son necesarios más estudios que intenten identificar interacciones gen-ambiente para ayudarnos a establecer estrategias de intervención sobre diversas subpoblaciones dianas (obesos, diabéticos, "metabólicos"...)

Al igual que en otros estudios, observamos como el alelo e4 se acompañó de un perfil lipídico más desfavorable sobre todo en base a mayores niveles de colesterol total, colesterol-LDL y apo-B sobre todo entre los varones; mientras que los niveles de triglicéridos elevados se presentó en una mayor proporción entre los homo y heterocigóticos para el alelo e2. Las diferencias encontradas en función del sexo del polimorfismo de la apo-E, están ya descritas en la literatura. Así en el Copenhagen City Heart Study (345), los autores demostraron como el genotipo de la apo-E podría modificar el riesgo de cardiopatía isquémica de forma diferente en hombre y mujeres. Los varones e3/e4 y e4/e4 eran especialmente susceptibles a la cardiopatía isquémica, no así las mujeres. En el metaanálisis de Wilson, que incluía a 181 mujeres con cardiopatía isquémica de 9 estudios, la asociación del alelo e4 con la incidencia de CI fue llamativa entre los hombre mientras que entre las mujeres los resultados no fueron convincentes. En nuestro estudio los índices aterogénicos entre los portadores del alelo e4 fueron llamativamente más elevados entre los varones que entre las mujeres. Muy recientemente, un trabajo dirigido por el grupo de Corella y colaboradores (346) en una población española, pudo demostrar como el alelo e4 se asociaba tanto a mayores niveles de LDL-c como a un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular, independientemente del sexo de los sujetos estudiados. También en este estudio los sujetos del grupo E2 cuando se comparaba con los otros 2 grupos, presentaban una mayor tendencia a la hipertriglicéridemia ($p=0,019$) y a menores concentraciones de

HDL-colesterol y apo-A1. También encontramos concentraciones llamativamente más elevadas de Lp(a) entre las mujeres-e4. Este hallazgo es especialmente relevante entre las mujeres, porque se sabe que las concentraciones de esta lipoproteína, fuertemente aterógena, está matizado por la presencia de estrógenos y por tanto, estos mayores niveles podrían estar condicionados genéticamente por este polimorfismo.

En nuestro trabajo, existió una asociación entre el alelo e4 y la presencia de resistencia a la insulina medida por el índice HOMA en función del sexo. Tanto hombres como mujeres e4, pero sobre todo éstas últimas, mostraban índices HOMA más elevados pero la diferencia no llegó a ser significativa ($p=0,07$, para las mujeres-e4). No encontramos diferencias con el índice %Beta ni con el área bajo la curva para glucemia o insulina. Esta mayor resistencia a la insulina entre las mujeres-e4 quedo reafirmada cuando comprobamos como éstas presentaban mayores concentraciones de glucemia basal y cuando el porcentaje de hiperinsulinémicas era muy superior en este subgrupo ($p=0,03$). Resultados similares al nuestro, encuentran Uusitupa et al (344) que observan como las mujeres obesas-e4 presentan mayores cifras de PA, mayores índices insulina/glucosa y mayores concentraciones basales de insulina. En un estudio canadiense (347) se encontró correlación entre el área bajo la curva de glucosa y la cantidad de grasa abdominal sólo entre los sujetos con el alelo e4. Mientras que, Valdez et al (348) encontraron significativamente más elevada la insulina basal en los hipertensos-e4. En nuestro trabajo, la obesidad no fue el principal determinante de esta resistencia a la insulina ya que el alelo e4 no se asoció a ésta. En algún estudio multiétnico en población anciana, también se ha encontrado esta asociación positiva con el alelo e4 (349). Se podría concluir que el fenotipo de la apo E modifica significativamente los cambios lipídicos y metabólicos inducidos por la obesidad central en el síndrome plurimetabólico. Esta relación puede sugerir que la determinación de fenotipos de la apo E y de insulina tras una sobrecarga oral pueden ser útiles para identificar precozmente aquellos individuos con riesgo elevado para el desarrollo de hipertensión arterial.

Respecto a la influencia de los genes estudiados sobre la composición lipídica de la membrana y el CONTRA, los resultados de nuestro estudio, al igual que la mayoría publicados, son escasos. No encontramos relación o influencia de los genes de la ECA ni del RB3A sobre estos parámetros de membrana. Los resultados más evidentes han aparecido con el alelo e2. Globalmente tanto los varones como las mujeres hipertensas e2 presentaban una mayor concentración de colesterol de membrana y por el contrario, un menor porcentaje en la composición de otros fosfolípidos de la membrana como la fosfatidilcolina o la esfingomielina. Estos cambios se pueden traducir en una mayor rigidez de la membrana junto a posibles modificaciones en la actividad del CONTRA u otros transportadores de membrana, no analizados en este estudio. Estos resultados pueden ser inesperados ya que las diferencias se deberían encontrar en los individuos portadores del alelo e4, al presentar éstos mayores

diferencias en los lipídicos plasmáticos, que se suponen podrían producir cambios en los lípidos de membrana. Sin embargo, la heterogeneidad de la muestra, la mayor proporción de obesos entre los hipertensos e2 y la posible influencia de factores ambientales como el tabaco, alcohol, etc, que se saben influyen más en estos sujetos, pueden haber hecho que encontremos esta relación. En el otro trabajo de nuestro grupo analizando esta relación, también los resultados fueron significativos por lo que parece poco probable que algunos de estos 3 alelos influyan en la CLM, aunque hacen falta más estudios para poder descartar o confirmar la relación entre el alelo e2 y los cambios de membrana. Respecto al CONTRA, no encontramos asociación entre la actividad de éste con ninguno de los genotipos estudiados, a pesar de las diferencias en la CLM encontradas con el alelo e2 y de las evidencias recientes que han encontrado una menor actividad y velocidad máxima del CONTRA en los individuos portadores del alelo e2 (350).

El trabajo presenta algunas limitaciones que hay que considerar, entre ellas el tamaño muestral, que para intentar establecer relaciones entre diferentes polimorfismos genéticos y características fenotípicas de SMB u obesidad central, se antoja algo corto. Es el caso de la asociación del alelo e2 y obesidad, que no fue concluyente en estudio de regresión lineal simple por este motivo. Por otra parte, nos llamó la atención la falta de normalidad de la muestra posiblemente por la baja prevalencia de alguna de las mutaciones analizadas y porque algunas variables biológicas no fueron determinadas en todos los casos. Esto nos obligó a utilizar tests estadísticos no paramétricos, más difíciles de interpretar y con una potencia estadística menor que los test clásicos paramétricos. Además la población seleccionada era de un área geográfica única, por lo que no podemos extrapolar las conclusiones a otras áreas geográficas de nuestro país y por supuesto de nuestro entorno mediterráneo.

Otro de los aspectos a destacar es la utilización del modelo HOMA como modelo simplificado de resistencia a la insulina. Si bien existen muchos trabajos en los que se compara favorablemente al modelo homeostático con otros más ortodoxos y validados como son el clamp euglucémico o el modelo mínimo, el HOMA tiene sus limitaciones. Dado que la secreción y resistencia a la insulina son procesos dinámicos y complejos, el medir concentraciones sólo basales puede llevarnos sólo a una aproximación fisiopatológica. A pesar de esto, en las conclusiones del San Antonio Study, el modelo HOMA puede tan útil como un test de sobrecarga oral de glucosa en estudios epidemiológicos en los que las muestras en ayunas sólo sean las disponibles.

En cuanto a los criterios del síndrome metabólico, éstos han cambiado con el tiempo desde que Reaven describiera el síndrome, pero hemos escogido los más reciente. Ya que la selección de pacientes comenzó antes de disponer de estos criterios, no disponíamos de la medida de la cintura como índice de obesidad central y su lugar utilizamos el IMC > de 30, que es un marcador grosero de obesidad y no discrimina la localización de la grasa, si central o no, visceral o no. Un parámetro

muy útil para medir este tipo de obesidad hubiera sido el perímetro de la cintura ya que se ha demostrado como un marcador de disfunción vascular, incluso en sujetos sanos (351) y algunos autores lo proponen como imprescindible, junto a los niveles de triglicéridos, para la identificación de los sujetos con un potencial riesgo aterogénico y diabético (352). Por tanto el porcentaje de pacientes con SMB y la falta de asociación de los polimorfismos con la presencia de SMB pueden ser o estar matizadas por la ausencia de medición de este parámetro.

En resumen, hemos estudiado la influencia de diversos genotipos sobre el perfil lipídico y metabólico de hipertensos de reciente comienzo y hemos podido demostrar como tanto la mutación Tpr64Arg del receptor beta-3 adrenérgico y el alelo e4 de la apolipoproteína E tienen influencia sobre el metabolismo lipídico y que esto se puede traducir en una mayor resistencia a la insulina y cambios estructurales en la membrana plasmática del hematíe. La influencia de factores genéticos en población hipertensa de reciente comienzo con características fenotípicas de síndrome metabólico es manifiesta, existiendo un perfil cardiovascular diferente en función del sexo, más deletéreo entre las mujeres de nuestra serie, incluso en estadios iniciales de la enfermedad. Sobre la relación entre el genotipo e2 y obesidad, hacen falta más estudios funcionales, prospectivos a largo plazo para confirmar nuestros hallazgos. En cuanto a los polimorfismos del gen de la ECA y del receptor beta 3-adrenérgico parece cada vez más claro que influyen poco en el desarrollo de hipertensión o resistencia a la insulina. Respecto al síndrome metabólico, se están buscando genes candidatos que marquen una predisposición para su desarrollo y aunque el gen de la apolipoproteína E puede ser uno de ellos, la evidencia científica existente apoya la hipótesis de una herencia poligénica (leptina, TNF alfa, PPAR gamma, etc) con participación de varios sistemas endocrinos a varios niveles (lipólisis, metabolismo de ácidos grasos libres, receptor de insulina o sensibilidad periférica a ésta); todo ello matizado por la existencia de unos factores ambientales (sobrepeso, tabaquismo, sedentarismo) imprescindibles para el desarrollo del síndrome metabólico.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

1. La prevalencia del genotipo DD de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) fue elevada entre nuestros hipertensos (35,1%) frente al genotipo ID (49,8%). La mutación Trp64Arg del receptor beta3-adrenérgico ocurrió en un 12,7%. Por otra parte, la presencia del alelo e2 fue 10,8 % frente al alelo e4 que fue del 20,1%. El genotipo habitual e3/e3 se presentó con una prevalencia del 71%. Encontramos diferencias en el riesgo cardiovascular en función del sexo de los individuos hipertensos. Así, los varones hipertensos presentaban un perfil lipídico más aterogénico, con un mayor grado de resistencia a la insulina medida por HOMA y una mayor actividad del contrartransporte sodio/litio. Esta diferencia del riesgo cardiovascular se asoció a una mayor prevalencia del alelo e4 entre los varones.

2. El alelo e4 de la apolipoproteína E se asoció fuertemente a un perfil lipídico más aterogénico, niveles superiores de apoproteínas y lipoproteína (a); así como un mayor grado de hiperinsulinismo y de un índice HOMA más elevado. Por el contrario, el alelo e2 mostró un perfil lipídico más favorable a pesar de asociarse a índices de masa corporal más elevados y aparecer más frecuentemente entre el subgrupo de obesos. También la mutación Trp64Arg se comportó de forma similar entre los varones hipertensos respecto al metabolismo lipídico.

En nuestro estudio el genotipo II del gen de la ECA se relacionó con una mayor grado de resistencia a la insulina, expresado por mayores cifras de presión arterial diastólica y mayores concentraciones de glucemia basal, entre los varones.

3. La presencia de síndrome metabólico fue elevada entre nuestros hipertensos de reciente comienzo (35%) y encontramos una asociación entre este síndrome y la presencia del alelo e2 de la apo E, sobre todo entre las mujeres.

4. No hubo influencia de los genotipos estudiados sobre el contrartransporte sodio/litio. En cambio, los hipertensos-e2 mostraban mayores concentraciones de colesterol de membrana, en sustitución por otros fosfolípidos y un mayor cociente colesterol/fosfolípidos; lo que expresa una mayor rigidez o menor fluidez de la membrana plasmática del hematíe.

REFERENCIAS

Introducción:

1. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988;37:1595-1607.
- 2.- Lind L, Lithell H. Decreased peripheral blood flow in the pathogenesis of the metabolic syndrome comprising hypertension, hiperlipemia and hyperinsulinemia. *Am Heart J* 1993;125:1494-1497.
- 3.-Baron AD, Brechtel-Hook G, Johnson A, Hardin D. Skeletal muscle blood flow. A possible link between insulin resistance and blood pressure. *Hypertens* 1993;21:129-135.
- 4.- Andersson EA; Mark AL. The vasodilator action of insulin. Implications for the insulin hypothesis of hypertension. *Hypertens* 1993;21:136-141.
- 5.- Nilsson PM, Lind L, Andersson PE, Hanni A, Berne C; Baron J, Lithell H. On the use of ambulatory blood pressure recording and insulin sensitivity measurements in support of the insulin-hypertension hypothesis. *J Hypertension* 1994;12(8):965-969.
- 6.- Montilla C, Muñiz-Grijalvo O, Villar J, Ruiz-Gutierrez V, Stiefel P, Serreras JL. Erythrocyte membrane cholesterol and phospholipids composition in hypertensive vs normotensives. Abstract book of the 1^o International Congress of the ISSFAL (International Society for the study of fatty acids and lipids), Lugano (Switzerland)1993;116.
- 7.- Muriana FJG, Montilla C, Villar J, Ruiz-Gutierrez V. Transbilayer movement of erythrocyte membrane cholesterol in human essential hypertension. *J Hypertension*1995;13:619-623.

Resistencia a la insulina e HTA:

- 8.- De Fronzo RA, Ferranini E. Insulin resistance: a multifaceted síndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dislipemia and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diab Care* 1991; 14: 173-94.
- 9.- Reaven GM, Lithell H, Landsberg L. Hypertension and associated metabolic abnormalities: the role of insulin resistance and the sympathoadrenal system. *New Engl J Med* 1996; 334: 374-81.
- 10.- Stern M, Haffner S. Body fat distribution and hiperinsulinemia as risk factor for diabetes and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis* 1986;6: 123-129.
- 11.- Desprech JP, Lamarch B, Mauriège P, Cantin B, Dagenais GR, Moorjani S, et al. Hyperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease. *N Eng J Med* 1996; 334: 952-957.
- 12.- Abassi F, McLaughlin T, Lamendola C, Lipinska I, Toffler G, Reaven GM. Comparison of plasminogen activator inhibitor-1 concentration in insulin-resistant versus insulin-sensitive healthy women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999, 19:2818-2821.
- 13.- Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity is an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26 years follow-up of participants in the Framingham Heart study. *Circulation* 1983; 67: 968-77.
- 14.- Ferrannini E, Natali A, Bell P, Cavallo-Perin P, Lalic N, Mingrone G. Insulin resistance and hypersecretion in obesity. *J Clin Invest* 1997; 100: 1166-1173.

- 15.- Jones DW, Kim JW, Andrew ME, Kim SJ, Hong YP. Body mass index and blood pressure in Korean men and women: The Korean National Blood Pressure Survey. *J Hypertens* 1994; 12: 1433-37.
- 16.- Ferranini E, Buzzigoli G, Bonadonna R, Iorcio MA, Oleggini M, Graziadei L, et al. Insulin resistance in essential hypertension. *New Engl J Med* 1987; 317: 350-57.
- 17.- Pollare T, Lithell H, Berne C. Insulin resistance is a characteristic feature of primary hypertension independent of obesity. *Metabolism* 1990; 39: 167-74.
- 18.- Natali A, Santoro D, Palombo C, Cerri M, Ghione S, Ferranini E. Impaired insulin action on skeletal muscle metabolism in essential hypertension. *Hypertension* 1991; 17: 170-78.
- 19.- Reaven GM, Hoffman BB. A role of insulin in the aetiology and course of hypertension?. *Lancet* 1987; 22: 435-750.
- 20.- Denker PS, Pollock VE. Fasting serum insulin levels in essential hypertension. A meta-analysis. *Arch Intern Med* 1992; 152: 1649-1651.
- 21.- Zavaroni I, Mazza S, Dall'aglio E, Gasparini P, Passeri M, Reaven GM. Prevalence of hyperinsulinaemia in patients with high blood pressure. *J Intern Med* 1992; 231: 235-240.
- 22.- Lind L, Berne C, Lithell H. Prevalence of insulin resistance in essential hypertension. *J Hypertens* 1995; 13: 1457-1462.
- 23.- Lissner L, Bengtsson DG, Lapidus L, Kristjanssen K, Wedel H. Fasting insulin in relation to subsequent blood pressure changes and hypertension in women. *Hypertension* 1992; 20: 797-801.
- 24.- Haffner SM, Ferrannini E, Hazuda HP, Stern MP. Clustering of cardiovascular risk factors in confirmed prehypertensive individuals. *Hypertension* 1992; 20: 38-45.
- 25.- Liese AD, Mayer EJ, Brancati FL, Heiss G. Elevated fasting insulin predicts incident hypertension in the atherosclerosis risk in communities study. *Circulation* 1996; 94: 1214.
- 26.- Allemann Y, Horber FF, Colombo M, Ferrari P, Shaw S, Jaeger, et al. Insulin sensitivity and body fat distribution in normotensive offspring of hypertensive parents. *Lancet* 1993; 341: 327-331.
- 27.- Taittonen L, Uhari M, Nuutinen M, et al. Insulin and blood pressure among healthy children. *Am J Hypertens* 1996; 9: 193-199.
- 28.- Tsuruta M, Hashimoto R, Adachi H, Imaizumi T, Nomura G. Hyperinsulinaemia as a predictor of hypertension: an 11-year follow-up study in Japan. *J Hypertens* 1996; 14: 483-488.
- 29.- Shimamoto K, Hirata A, Fukuoka M, Higesiura K, Miyazaki Y, Shiiki M, Masuda A, et al. Insulin sensitivity and the effects of insulin on renal sodium handling and pressor systems in essential hypertensive patients. *Hypertension* 1994; 23 (suppl 1):1-29, 1-33.
- 14.- 30.- Daly PA, Landsberg L. Hypertension in obesity and NIDDM: role of insulin and sympathetic nervous system. *Diab Care* 1991; 14: 240-48.
- 31.- Rocchini AP, Moorhead C, Deremer S, Goodfriend TL, Ball DL. Hyperinsulinemia and aldosterone and pressor responses to angiotensin-II. *Hypertension* 1990; 15: 861-66.
- 32.- Geffner M, Golde DW. Selective insulin action

on skin, ovary and heart in insulin resistant states. *Diab Care* 1988; 11: 500-05.

- 33.- Hilton PJ. Cellular sodium transport in essential hypertension. *New Eng J Med* 1986; 314: 222-39.
- 34.- Mbanya JCN, Thomas TH, Wilkinson R, Alberti K, Taylor R. Hypertension and hiperinsulinemia: a relation in diabetes but not essential hypertension. *Lancet* 1988; 1:733-4.
- 35.- Tolins JP, Shultz PJ, Raji L, Brown DM, Mauer SM. Abnormal renal hemodynamic response to reduced renal perfusion pressure in diabetic rats:role of NO. *Am J Physiol* 1993; 265 (6 Pt 2): F886-95.
- 36.- Steinberg HO, Brechtel G, Johnson A, Fineberg N, Baron AD. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. *J Clin Invest* 1994; 94: 117-29.
- 37.- Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 1989; 997-1000.
- 38.- Vollenweider P, Randin D, Jegquier E, Nicod P, Tappy L, Scherrer U. Impaired insulin-induced sympathetic neural activation and vasodilation in skeletal muscle in obese humans. *J Clin Invest* 1994; 93: 2365-71.
- 39.- Hall JE, Brands MW, Zappe DH, Dixon Wn, Mizelle HL, Reinhart GA. Hemodynamic and renal response to chronic hyperinsulinaemia in obese, insulin-resistant dogs. *Hypertension* 1995; 25: 994-1002.
- 40.- Chen W, Srinivasan SR, Elkasabany A, Ellsworth DL, Boerwinkle E, Berenson GS. Combined effect of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (G894) and insulin resistance status on blood pressure and familial risk of hypertension in young adult: the Bogalusa heart study. *Am J Hypertens* 2001; 14: 1046-1052.
- 41.- Masuo K. Prevalence of hiperinsulinemia in young nonobese Japanese men. *Hypertension* 1997; 15: 157-65.
- 42.- Nilsson PM, Lind L, Andersson PE, Hanni A, Berne C, Baron J, Lithell H. On the use of ambulatory blood pressure recording and insulin sensitivity measurements in support of the insulin-hypertension hypothesis. *J Hypertension* 1994; 12 (8):965-69.
- 43.- Swislocki ALM, Hoffman BB, Reaven GM. Insulin resistance, glucose intolerance and hiperinsulinemia in patients with hypertension. *Am J Hypertension* 1989; 2: 419-23.
- 44.- Jarret RJ. In defense of insulin: a critique of syndrome X: *Lancet* 1992; 340: 469-71.
- 45.- Haffern SM. Epidemiology of hypertension and insulin resistance syndrome. *J Hypertens* 1997; 15 (suppl 1):S25-S30.
- 46.- Saad MF, Lillioja S, Nyomba BL, et al. Racial differences in the relation between blood pressure and insulin resistance. *N Eng J Med* 1991; 324: 733-739.
- 47.- Reaven GM. Treatment of hypertension: focus on prevention of coronary heart disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 537-540.
- 48.- Lind L, Andersson PE, Andren B, Hanni A, Lithell HO. Left ventricular hypertrophy in hypertension is associated with the insulin resistance metabolic syndrome. *J Hypertens* 1995; 13(4): 433-38.
- 49.- Denker PS, Pollock VE. Fasting serum insulin levels in essential hypertension: a metaanalysis.

Arch Intern Med 1992; 152: 1649-51.

50.- El-Gharbawy AH, Kotchen JM, Grim CE, Kaldunsky M, Hoffmann RG, Pausova Z. Predictors of target organ damage in hypertensive blacks and whites. *Hypertension* 2001; 38: 761-766.

RI y relación génica:

- 51.- Tuck ML, Sowers J, Dornfeld L, Kledzik G, Maxwell M. The effect of weight reduction on blood pressure, plasma renin activity, and plasma aldosterone concentrations. *N Eng J Med* 1981; 302: 930-933.
- 52.- Cooper R, Forrester, Ogunbiyi O, Juffinda J. Angiotensinogen levels and obesity in four black populations. *J Hypertens* 1998; 16: 571-576.
- 53.- Egam BM, Stepniakowski K, Goodfriend TL, Renin and aldosterone are higher and the hyperinsulinemic effects of salt restriction greater in subjects with risk factor clustering. *Am J Hypertens* 1994; 7: 886-893.
- 54.- Berntorp K, Lindgärde F, Mattiason I. Long-term effects on insulin sensitivity and sodium transport in glucose-intolerant hypertensive subjects when beta-blockade is replaced by captopril treatment. *J Hum Hypertens* 1992; 6: 291-298.
- 55.- Buchanan TA, Thawani H, Kades W, Modrall JG, Weaver FA, Laurel C, et al. Angiotensin II increases glucose utilization during acute hyperinsulinemia via a hemodynamic mechanism. *J Clin Invest* 1993; 92:720-726.
- 56.- Jones BH, Standridge MK, Taylor JW; Moustaid N. Angiotensinogen gene expression in adipose tissue: analysis of obese models and hormonal and nutritional control. *Am J Physiol* 1997; 273: R236-R242.
- 57.- Sharma P. Meta-analysis of the ACE gene in ischaemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 64: 227-230.
- 58.- Cong ND, Hamaguchi K, Saikawa T, Hara M, Sakata T. The I/D polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene but not the angiotensinogen gene is associated with insulin response to oral glucose in Japanese. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 220: 46-51.
- 59.- Chiu KC, McCarthy JE. The insertion allele at the angiotensin-I-converting enzyme gene locus is associated with insulin resistance. *Metabolism* 1997; 46: 395-399.
- 60.- Thomas GN, Tomlinson B, Chan J, Tomlinson B, Cockram CS, Critchley JA. Renin-angiotensin system gene polymorphisms, blood pressure, dyslipidemia, and diabetes in Hong Kong Chinese: a significant association of the ACE insertion/deletion polymorphism with diabetes. *Diabetes Care* 2001; 24(2): 356-361.
- 61.- Thomas GN, Young RP, Tomlinson B, Woo KS, Tomlinson B, Critchley JAJH. Renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms and hypertension in Hong Kong Chinese. *Clin Exp Hypertens* 2000; 23: 87-97.
- 62.- Goldstain P, Guzdek A, Kruszelnicka-Kwiatkowska O, et al. Hyperinsulinaemia inhibits secretion of apo AI more efficiently than secretion of apo AII and apo E (insulin and secretion of apo-proteins). *Z Gastroenterol* 1996; (suppl 3); 3: 46-48.

63.- Dembinska-Kiec A, Kawecka-Jaszcz K, Kwasiak M, Guevara I, Pankiewicz J, Malczewska-Malec M, Iwanejko J, Hartwich J, Zdzienicka A, Stochmal A, Leszczynska-Golabek I. Apo E isoforms, insulin output and plasma lipid levels in essential hypertension. *Eur J Clin Invest* 1998 Feb;28(2):95-9.

64.- Iwanejko J, Kwasiak M, Wybranska I, et al. Heterogeneity of high-density lipoprotein particles and insulin output during oral glucose tolerance test in men with coronary artery disease. *Acta Diabetol* 1996; 33: 58-61.

65.- Stiefel P, Montilla C, Muñiz-Grigalvo O, Garcia-Lozano R, Alonso A, Miranda ML, Pamies E, Villar J. Apolipoprotein E gene polymorphism is related to metabolic abnormalities, but does not influence erythrocyte membrane lipid composition or sodium-lithium countertransport activity in essential hypertension. *Metabolism* 2001; 50(2): 157-160.

66.- Widen E, Lehto M, Kanninen T, Walston J, Shuldiner AR, Groop LC. Association of a polymorphism in the beta-3-adrenergic-receptor gene with features of the insulin resistance syndrome in finns. *NEJM* 1995; 333: 348-351.

67.- Walston J, Silver K, Bogardus B, Knowler WC, Celi FS, Austin A, et al. Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the beta-3-adrenergic-receptor gene. *NEJM* 1995; 333: 343-7.

68.- Rissanen J, Kuopusjarvi J, Pihlajamaki J, Sipilainen R, Heikkinen S, Vanhala M, et al. The Trp64Arg polymorphism of the beta-3-adrenergic receptor gene. Lack of association with NIDDM and features of insulin resistance syndrome. *Diabetes Care* 1997; 20(8): 1319-23.

69.- Wu DA, Bu X, Warden CH. Quantitative trait locus mapping of human blood pressure to agentic region at or near the lipoprotein lipase gene locus on chromosome 8p22. *J Clin Invest* 1996; 97: 508-514.

70.- Benecke H, Topak H, Von zur Muhlen A, Schuppert F. A study of genetics of obesity: influence of polymorphisms of the beta-3-adrenergic receptor and insulin receptor substrate 1 in relation to weight loss, waist to hip ratio and frequencies of common cardiovascular risk factors. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000; 108 (2): 86-92.

71.- De Fronzo RA, Tobin JB, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin resistance. *Am J Physiol* 1979; 237: E214-23.

72.- Godsland IF, Stevenson JC. Insulin resistance: syndrome or tendency. *Lancet* 1995; 346: 100-103.

73.- Bergman RN, Ider YZ, Bowden CR, Cobelli C. Quantitative estimation of insulin sensitivity. *Am J Physiol* 1979; 236: E667-77.

74.- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412-19.

75.- Dowse GK, Qin H, Collins VR, Zimmet PZ, Alberti KG, Gareeboo H. Determinants of estimated insulin resistance and beta-cell function in Indian, Creole and Chinese Mauritians: the Mauritius NCD study group. *Diabetes Res Clin Pract* 1990; 10: 265-279.

76.- Levy JC, Matthews DR, Hermans MP. Correct

homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program. *Diabetes Care* 1998; 21(12): 2191-2192.

77.- Quon MJ. Limitations of the fasting glucose to insulin ratio as an index of insulin sensitivity *J Clin Endocrin Metabol* 2001; 86(10): 4615-4617.

Bibliografía del CONTRA:

78.- Canessa M, Adragna N, Solomon HS, Connolly TM, Tostecon DC. Increased sodium-lithium countertransport in red cells of patients with essential hypertension. *N Eng J Med* 1980; 302: 722-776.

79.- Adragna N, Canessa M, Solomon H, Slater E, Tosteson DC. Red cell lithium-sodium countertransport and sodium-potassium cotransport in patients with essential hypertension. *Hypertension* 1982; 4: 795-804.

80.- Williams RR, Hunt SC, Kuida H, Smith JB, Ask KO. Sodium-lithium countertransport in erythrocytes of hypertension prone families in Utah. *Am J Epidemiol* 1983;118:338-344.

81.- Persky V, Ostrow D, Langenberg P, Ruby E, Bresolin L, Stamler J. *J Hypertens* 1990; 8 (2): 121-8.

82.- Laurenzi M, Cirillo M, Panarelli W, Trevisan M, Stamler R, Dyer AR, Stamler J. Baseline sodium-lithium countertransport and 6-year incidence of hypertension. The Gubbio Population Study. *Circulation* 1997;95: 581-7.

83.- Strazzullo P, Siani A, Cappuccio FP, Trevisan M, Ragone E, Russo L, Iacone R, Farinero E. Red blood cell sodium-lithium countertransport and risk of future hypertension: the Olivetti Prospective Heart Study. *Hypertension* 1998 Jun;31(6):1284-9.

84.- Yap L, Arrazola A, Soria F, Diez J. Is there increased cardiovascular risk in essential hypertensive patients with abnormal kinetics of red blood cell sodium-lithium countertransport?. *J Hypertens* 1989, 7: 667-673.

85.- Mongeau JG; Mauran P, Poirot G, Davignon A. Longitudinal study of various transport abnormalities as an index of severity in children and adolescents from essential hypertension. *J hypertens* 1990; 8:657-62.

86.- Sherif K, Barrett M, Kushner H, Falkner B. The association of RBC sodium-lithium countertransport (Vmax) with left ventricular mass in African American women. *J Hum Hypertens*2000;14(3):213-9.

87.- Lopes de Faria JM, Silveira LA, Morgano M, Pavin EJ, Lopes de Faria JB. Erythrocyte sodium-lithium countertransport and proliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(6):1482-5.

88.- Giordano M, Castellino P, Solini A, Canessa ML, DeFronzo RA. Na⁺/Li⁺ and Na⁺/H⁺ countertransport activity in hypertensive non-insulin-dependent diabetic patients: role of insulin resistance and antihypertensive treatment. *Metabolism* 1997; 46 (1 1) : 1 3 1 6 - 2 3 .

89.- De la Sierra A, Coca A, Aguilera Mt, Urbano-Marquez A. Na⁺-Li⁺ countertransport in essential hypertension. *J Hypertens* 1988, 6:931-937.

90.- Muriana FJG, Garcia-Donas MA, Villar J, Ruiz-Gutierrez V. Distribution of erythrocyte membrane cholesterol in human essential hypertension. *J Hypertens* 1994,12:1383-1386.

- 91.-Doria A, Fioretto P, Avogaro A, Carraro A, Morocutti A, Trevisan R, Frigato F, Crepaldi G, Viberti G, Nosadini R. Insulin resistance is associated with high sodium-lithium countertransport in essential hypertension. *Am J Physiol* 1991; 261: E684-91.
- 92.- Canessa M. Erythrocyte sodium-lithium countertransport: another link between essential hypertension and diabetes. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1994; 3:511-517.
- 93.-Carr S, Mbanya JC, Thomas T, Keavey P, Taylor R, Alberti KG, Wilkinson R. Increase in glomerular filtrate rate in patients with insulin-dependent diabetes and elevated erythrocyte sodium-lithium countertransport. *N Eng J Med* 1990; 322: 500-505.
- 94.- Doria A, Fioretto P, Avogaro A, Carraro A, Morocutti A, Trevisan R, et al. Insulin resistance is associated with high sodium-lithium countertransport in essential hypertension. *Am J Physiol* 1991; 261: E684-91.
- 95.- Mangili R, Bending JJ, Scott G, Li LK, Gupta A, Viberti G. Increased sodium-lithium countertransport activity in red cells of patients with insulin-dependent diabetes and nephropathy. *N Eng J Med* 1988; 318:146-50.
- 96.- Krolewski AS, Canessa M, Warram JH, Laffel LM, Christlieb AR, Knowlton WC, et al. Predisposition to hypertension and susceptibility to renal disease in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Eng J Med* 1988; 318:140-45.
- 97.- Carr S, Mbanya JC, Thomas T, Keavey P, Taylor R, Alberti KG, Wilkinson R: Increase in glomerular filtration rate in patients with insulin-dependent diabetes and elevated erythrocyte sodium-lithium countertransport. *N Eng J Med* 1990;322: 500-505.
- 98.- Sechi LA, Melis A, Pala A, Marigliano A, Sechi G, Tedde R. Serum insulin, insulin sensitivity, and erythrocyte sodium metabolism in normotensive and essential hypertensive subjects with and without overweight. *Clin Exp Hypertens* 1991, 13 (2):261-276.
- 99.-Spector A, Yoreck MA. Membrane lipid composition and cellular functions. *J Lipid Res* 1985; 26: 1015-1032.
- 100.- Carr SJ, Sikand K, Moore D, Norman RI. Altered membrane microviscosity in essential hypertension: relationship with family history of hypertension and sodium-lithium countertransport activity. *J Hypertens* 1995 Jan;13(1):139-46.
- 101.- Murriana FJ, Montilla C, Stiefel P, Villar J, Ruiz-Gutierrez V. The rate of transbilayer movement of erythrocyte membrane cholesterol is correlated with sodium-lithium countertransport. *Life Sci* 1996;59(23):1945-9.
- 102.- Murriana FJ, Villar J, Ruiz-Gutierrez V. Erythrocyte membrane cholesterol distribution in patients with untreated essential hypertension: correlation with sodium-lithium countertransport. *J Hypertens* 1996 Apr;14(4):443-6.
- 103.- Carr SJ, Thomas TH, Laker MF, Wilkinson R. Lipid lowering therapy leads to a reduction in sodium-lithium countertransport activity. *Atherosclerosis* 1991 Apr;87(2-3):103-8.
- 104.- Woods JW, Watson BS. Red-cell sodium lithium countertransport in sons of normotensive and hypertensive parents: a follow-up study. *N Eng J Med* 1984;310:1191.
- 105.- Ferrari P, Siccoli MM, Fontana MJ, Bianchetti MG. Abnormalities in insulin sensitivity, vascular resistance and erythrocyte cation transport are independent genetic traits in familial hypertension. *Blood Press* 1999;8(2):102-9
- 106.- Hasstedt SJ, Wu LL, Ash KO, Kuida H, Williams RR. Hypertension and sodium-lithium countertransport in Utah pedigrees: evidences for major-locus inheritance. *Am J Hum Genet* 1988;43: 14-22.
- 107.- Kammerer CM, Cox LA, Mahaney MC, Rogers J, Shade RE. Sodium-lithium countertransport activity is linked to chromosome 5 in baboons. *Hypertension* 2001 Feb;37(2 Part 2):398-402.
- 108.- Pamies-Andreu E, García-Lozano R, Palmero-Palmero C, García-Morillo S, Alonso-Arcas A, Stiefel P, Carneado de la Fuente J, Villar J. Genetic Variation in the beta-3 adrenergic receptor in essential hypertension. *Life Sciences* 67 2000; 391-397.
- 109.- Stiefel P, Montilla C, Muñoz-Grijalvo O, García-Lozano R, Alonso A, Miranda ML, Pamies E, Villar J. Apolipoprotein E gene polymorphism is related to metabolic abnormalities, but does not influence erythrocyte membrane lipid composition or sodium-lithium countertransport activity in essential hypertension. *Metabolism* 2001; 50(2): 157-60.
- 110.- Hardman TC, Wierzbicki AS, Croft P, Feher M, Cox A, Lant AF. Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphism and the erythrocyte sodium-lithium countertransporter (SLC) phenotype in hypertension. *J Hum Hypertens* 1996 Jun;10(6):429-30.
- 111.- Tournoy KG, Delanghe JR, Duprez DA, De Buyzere ML, Verbeeck RM, Vergauwe DA, Leroux-Roels GG, Clement DL. Genetic polymorphisms and erythrocyte sodium-lithium countertransport in essential hypertension. *Clin Chim Acta* 1996; 225 (1):39-55.
- 112.- Orlov SN, Pausova Z, Gossard F, Gaudet D, Tremblay J, Kotchen T, Cowley A, Larochelle P, Hamet P. Sibling resemblance of erythrocyte ion transporters in French-Canadian sibling-pairs affected with essential hypertension. *J Hypertens* 1999 Dec;17(12 Pt 2):1859-65.
- 113.- Ragone E, Strazzullo P, Siani A, Iacone R, Russo L, Sacchi A, Cipriano P, Mancini M, Zhao G, Yuan XY, Li DY, Gong L. Ethnic differences in red blood cell sodium/lithium countertransport and metabolic correlates of hypertension: an international collaborative study. *Am J Hypertens* 1998 Aug;11(8 Pt 1):935-41.
- 114.- Hardman TC, Croft P, Morrish Z, Anto-Awoakye K, Lant AF. Kinetic characteristics of the erythrocyte sodium-lithium countertransporter in black normotensive subjects compared with three other ethnic groups. *J Hum Hypertens* 1998 Jan;12(1):29-34.

Composición Lipídica de la Membrana celular:

- 115.- Singer SJ, Nicholson GL: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972, 175:720-731.
- 116.- Stubb CD, Smith AD. The modification of

- mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim Biophys Acta* 1984; 779:89-137.
- 117.- Sanderman H. Regulation of membrane enzymes by lipids. *Biochim Biophys Acta* 1978;515:209-235.
- 118.- Rothman JE, Lenard J. Membrane asymetry. *Science* 1977;195:734-753.
- 119.- Liscun L, Faust JR. Compartmentation of cholesterol within the cell. *Curr Opin Lipidology* 1994; 5: 221-226.
- 120.- Schoereder F, Jefferson JR, Kier Ab et al. Membrane cholesterol dynamics: cholesterol domains and kinetic pools. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991; 1066:183-192.
- 121.- Vazquez CM, Zannetti R, Ruiz-Gutierrez V: Lipid composition and fluidity in the jejunal brush-border membrane of spontaneously hypertensive rats. Effects on activities of membrane-bound proteins. *Biosci Rep* 1996;16:217-226.
- 122.- Cooper RA: Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease. *N Engl J Med* 1977; 297:371-377.
- 123.- Dominiczak AF, Lazar DF, Das AK, Bohr DF: Lipid bilayer in genetic hypertension. *Hypertension* 1991; 18:748-757.
- 124.- Dominiczak AF, Davidson AO, Bohr DF: Plasma membrane in hypertension: microviscosity and calcium stabilization. *Hypertens Res* 1994; 17: 79-86.
- 125.- Shinitzky M. Membrane fluidity and cellular functions, in Shinitzky M (ed): *Physiology of membrane fluidity*. CRC Press, Boca Raton, 1984, pp 1-51.
- 126.- Zachowski A: Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J* 1993; 294:1-14.
- 127.- Carr SJ, Thomas TH, Laker MF, Wilkinson R: Elevated sodium-lithium countertransport: a familial marker of hyperlipidemia and hypertension?. *J Hypertension* 1990;8:139-146.
- 128.- Jänning F. Structural order of lipids and proteins in membranes: evaluation of fluorescence anisotropy data. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:6361-6365.
- 129.- Cooper RA, Leslie MH, Fischkoff S, Shinitzky M, Shatill J. Factors influencing the lipid composition and fluidity of red cell membranes in vitro: production of red cells possessing more than two cholesterol per phospholipid. *Biochemistry* 1978, 17:327-331.
- 130.- Roelofsen B, Van Meer G, Opdenkamp JA. The lipids of red cell membranes. Composition, structural and functional aspects. *Scan J Clin Lab Invest* 1981, 41 (156):111-115.
- 131.- Muzulu SI, Bing RF, Norman RI. Human erythrocyte membrane fluidity and calcium pump activity in primary combined hyperlipidaemia. *Clin Sci* 1995; 88:307-310.
- 132.- Le Quan Sang KH, Mazeud A, Astarie C, Kitagawa S, Matsubayashi M, Kotani K. Aymetry of membrane fluidity in the lipid bilayer of blood platelets: fluorescence study with dyphenylhexatriene and analogs. *J Membr Biol* 1991; 119:221-227.
133. Ishizaki M, Teraoka K, Tsuritani I, Honda R, Ishida M, Yamaha Y. Erythrocyte Na/K-ATPase and membrane and serum lipid profiles: as related to alcohol, body mass index and blood pressure. *Clin Exp Hypertens* 1994; 16:741-759.
- 134.- Devynck MA; Kunes J, Le Quan Sang KH, Zicha J. Membrane microviscosity and plasma triacylglycerols in rats. *Clin Sci* 1998;94:79-85.
- 135.- Engelmann B, Duhm J, Schönthier Um, Streich S. Relations of sodium-lithium countertransport kinetics to plasma and red cell membrane phospholipids in hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 1993; 99:151-63.
- 136.- Fernández Moyano A. Alteraciones de los sistemas de trasporte de sodio en sujetos hiperlipémicos relacionables con la presencia de hipertensión arterial. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla 1998. 1-121.
- 137.- Gottlieb MH. Rates of cholesterol exchange between human erythrocytes and plasma lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1980;60: 530-538.
- 138.- Diez J, Arrazola A, Yap L, et al. Discriminación de un subgrupo de enfermos hipertensos con elevado riesgo de cardiopatía. *Hipertensión* 1988; 5:94.
- 139.- Engelhard V, Esko J, Strom D, Glaser M. Modification of adenilate cyclase activity in LM cells by manipulation of membrane phospholipids composition in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 1976;73:4482-4486.
- 140.- Montilla C. Composición Lipídica de la membrana eritrocitaria y estudio del transporte iónico transmembrana en hipertensos versus controles. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla. 1994, 1-210.
- 141.- Rico MA. Composición lipídica de la membrana y factores hemorreológicos en pacientes hipercolesterolémicos. Tesis Doctoral Universidad de Sevilla. 1996.
- 142.- Martinez M, Vaya A, Marti R, Gil L, Lluch I, Carmena R, Azanar J. Erythrocyte membrane cholesterol/phospholipid changes and haemorheological modifications in familial hypercholesterolemia treated with lovastatin. *Thromb Res* 1996;83 (6):375-88.
- 143.- Rabini RA, Polenta M, Staffolani R, tocchini M, Signore R, testa I, Mazzanti L. effect of hydroxymethylglutaryl-coA reductasa inhibitors on the functional properties of erythrocyte membranes. *Exp Mol Pathol* 1993;59(1):51-57.
- 144.- Corrocher R, Ruzzenente O, Brugnara C, Bertinato L, Mazzi M, et al. Elevation of red cell sodium-lithium countertransport in hyperlipidemias. *Life Sci* 1985;36:649-655.
- 145.- Strazzullo P, Cappuccio FP, Trevisan M, Siani A, Barba G, Ragone E et al. The relationship of erythrocyte sodium-lithium countertransport to blood pressure and metabolic abnormalities in a sample of untreated middle aged male workers. *J Hypertens* 1993,11:815-822.
- 146.- Rutherford PA, Thomas TH, Laker MF, Wilkinson R. Plasma Lipids affect maximum velocity not sodium affinity of human sodium-lithium countertransport: distinction from essential hypertension. *Eur J Clin Invest* 1992;22:719-724.
- 147.- Pagnan A; Corrocher R, Ambrosio GB, Ferrari S, Guarini P, Piccolo D, et al. Effects of an olive-oil-rich diet on erythrocytes membrane lipid composition and cation transport systems. *Clin Sci* 1989;76:87-93.
- 148.- Villar J, Montilla C, Muñoz-Grijalvo O, Murria-

na FG, Stiefel P, Ruiz-Gutierrez V et al. Erythrocyte Na-Li countertransport in essential hypertension: correlation with membrane lipid levels. *J Hypertens* 1996;14:969-973.

149.- Ollerenshaw JD, Heagerty AM, Bing RF, Swales JD. Abnormalities of erythrocyte membrane fatty acid composition in human essential hypertension. *J Hum Hypertens* 1987;1:9-12.

150.- Foucher C, narce M, Nasr L, Delachambre MC, Poisson JP. Liver microsomal membrane fluidity and microsomal desaturase activities in adult spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1997;15:863-869.

151.- Denvynck MA; Pernollet MG; Nunez AM, Aragon I, Montenay-Garestier T, Helene C. Diffuse structural alterations in cell membranes of spontaneously hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:5057-5060.

152.- Tsuda K, Tsuda S, Minatogawa Y, Iwahashi H, Shima H, Yoshikawa H, et al. Membrane fluidity of erythrocytes and its relevance to renin profile in essential hypertension. *Jpn Circ J* 1988;52:1301-1308.

153.- Orlov Sn, Gulak PV, Litvinov IS, Postnov YV. Evidence of altered structure of the erythrocyte membrane in spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci* 1982;63:43-45.

154.- Aneschi M, Coata G, Cosmi V. Erythrocyte membrane composition in pregnancy-induced hypertension: evidence for an altered lipid profile. *Brith J Obstet Gynaecol* 1992;99:503-507.

155.- Corrocher R, Pagnan A. effect induced by olive-rich diet on erythrocytes membrane lipids and sodium-potassium transports in postmenopausal hypertensive woman. *J Endocrinol Invest* 1992;15:369-376.

156.- Murriana FJG, García-Donas MA, Villar J, Ruiz-Gutiérrez V. Distribution of erythrocyte membrane cholesterol in human essential hypertension. *J Hypertens* 1994;12:1383-1386.

157.- Vazquez CM, Mate A, De la Hermosa MA, Planas JM, Ruiz-Gutierrez V. Abnormalities in Lipid Composition of brush border membranes isolated from renal cortex of spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypert* 2001;14:578-584.

158.- Okamoto H, Kawaguchi H, Yasuda H, Minami M, Saito H. changes in renal microsomal lipids in spontaneously hypertensive rats. *Prog Lipid Res* 1986;25:317-320.

159.- Chi Y, Gupta RK. Alterations in Herat and kidney membrane phospholipids in hypertension as observed by P nuclear magnetic resonance. *Lipids* 1998;33:375-390.

Bibliografía del gen de la ECA:

160.- Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Convol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86: 1343-1346.

161.- Tired L, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, Cambien F, et al. Evidence from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 197-205.

162.- Costerousse O, Allegrini J, López M, Alhenc-Gelas F. Angiotensin I-converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. *Biochem J* 1993; 290: 33-40.

163.- Danser AHJ, Schalekamp MADH, Bax WA, Van der Brink AM, Saxena PR, Riegger GA. Angiotensin -converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism. *Circulation* 1995;92:1387-88.

164.- Zee RYL, Lou Y, Griffiths LR, Morris BJ. Association of a polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene with essential hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;184:9-15.

165.- Chiang FT, Lai ZP, Cherm TH, Tseng CD, Hsu KL, Lo HM, et al. Lack of association of the angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism with essential hypertension in a chinese population. *Am J Hypertens* 1997; 10:197-201.

166.- Forrester T, McFarlane-Anderson N, Bennett FI, Wilks R, Cooper R, Rotimi C, et al. The angiotensin converting enzyme and blood pressure in jamaicans. *Am J Hypertens* 1997; 10: 519-524.

167.- Vassilikiotti S, Doumas M, Doumas S, Petidis K, Karagiannis A, Balaska K, et al. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism is not related to essential hypertension in a greek population. *Am J Hypertens* 1996; 9(7):700-702.

168.- Hingorani AD, Jia H, Stevens PA, Hopper R, Dickerson JEC, Brown MJ. Renin-angiotensin system gene polymorphism s influence blood pressure and the response to angiotensin converting enzyme inhibition. *J Hypertens* 1995; 13: 1602-1609.

169.- Beige J, Zilch O, Hohenbleicher H, Ringel J, Kunz R, Distler A, et al. Genetic variants of the renin -angiotensin system and ambulatory blood pressure in essential hypertension. *J Hypertens* 1997;15:503-508.

170.- O'Donnell CJ, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, Ordovas JM, Schaefer EJ, Myers RH, Levy D. Evidence for Association and Genetic Linkage of the Angiotensin-Converting Enzyme Locus With Hypertension and Blood Pressure in Men but Not Women in the Framingham Heart Study. *Circulation* 1998 97: 1766-1772.

171.- Higaki JH, Baba S, Katsuya T, Sato N, Ishikawa K, Mannani T, et al. Deletion allele of angiotensin-converting enzyme gene increases risk of essential hypertension in Japanese men. The Suita Study. *Circulation* 2000;101:2060-2065.

172.- Nagano Y, Oshima T, Hiraga H, Matsuura H, Kajiyama G, Kambe M. DD genotype of the angiotensin-I-converting enzyme gene is a risk factor for early onset of essential hypertension in Japanese patients. *J Lab Clin Med* 1998; 131(6):502-6.

173.- Steffansson B, Ricksten A, Rymo L, Aurell M, Herlitz H. Angiotensin-converting enzyme gene i/D polymorphism in malignant hypertension. *Blood Press* 2000; 9(2-3):104-9.

174.- Pamies E, Palmero C, García-Lozano R, Stiefel P, Miranda ML, Martín-Sanz MV, Villar J, Núñez A, Carneado J. Influencia de los Polimorfismos M235T del angiotensinogeno e I/D de la enzima conversiva de la angiotensina sobre la hipertensión arterial y otros factores de riesgo cardiovascular. *Med Clin (Barc)* 1999;113:164-168.

175.- Fernández-Llama P, Poch E, Oriola J, Botey A, De la Sierra A, Revert L, et al. Polimorfismos genéticos del sistema renina-angiotensina e hipertensión arterial esencial. *Med Clin (Barc)* 199;112:561-564.

176.- Martínez E, Puras A, Escribano J, Sanchis C, Carrion L, Artigao M, et al. Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphisms, serum ACE activity and blood pressure in a Spanish-Mediterranean population. *J Hum Hypertens* 2000;14(2):131-5.

177.- Julve R, Chaves FJ, Rovira E, Pascual JM, Miralles A, Armengod ME, Redón J. Polymorphism insertion/deletion of the ACE gene and ambulatory blood pressure circadian variability in a essential hypertension. *Blood Press Monit* 2001;6(1):27-32.

Regulación de la Presión arterial:

178.- Hilbert P, Lindpaintner K, Beckmann JS, Serikawa T, Soubrier F, Dubay C, et al. Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature* 1991;353(6344):521-9.

179.- Higashimori K, Zhao Y, Higaki J, Kamitani A, Katsuya T, Nakura J, et al. Association analysis of a polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene with essential hypertension in the Japanese population. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;191(2):399-404.

180.- Jeunemaitre X, Lifton RP, Hunt SC, Williams RR, Lalouel JM. Absence of linkage between the angiotensin-converting enzyme locus and human essential hypertension. *Nat Genet* 1992;1(1):72-5.

181.- Duru K, Farrow S, Wang JM, Lockette W, Kurtz T. Frequency of a deletion polymorphism in the gene for angiotensin converting enzyme is increased in African-Americans with hypertension. *Am J Hypertens* 1994;7(8):759-62.

182.- O'Donnell CJ, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, Ordovas JM, Schaefer EJ, et al. Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study. *Circulation* 1998; 97(18):1766-1772.

183.- Julier C, Delepine M, Keavney B et al. Genetic susceptibility for human familial essential hypertension in a region of homology with blood pressure linkage on rat chromosome 10. *Molecular Genetics* 1997; 6(12):2077-85.

184.- Padmanabhan N, Padmanabhan S, Connell JMC. Genetic basis of cardiovascular disease-the renin-angiotensin-aldosterone system as a paradigm. *JRAAS* 2000;1:316-324.

185.- Krege JH, Kim HS, Moyer JS, Jennette JC, Peng L, Hiller Sk, et al. Angiotensin-converting enzyme gene mutations, blood pressures and cardiovascular homeostasis. *Hypertension* 1997;29(1 part 2):150-7.

Fenotipos Intermedios de ECA:

186.- Ueda S, Elliot HL, Morton JJ, Connell JM. Enhanced pressor response to angiotensin I in normotensive men with the deletion genotype (DD) for angiotensin-converting enzyme. *Hypertension*

1995;25(6):1266-9.

187.- Buikema H, Pinto YM; Rooks G, Grandjean JG, Schunkert H, van Gilst WH. The deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene is related to phenotypic differences in human arteries. *Eur Heart J* 1996;17(5):787-94.

188.- Perticone F, Ceravolo R, Maio R, Ventura G, Zingone A, Perrotti N, et al. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with endothelium-dependent vasodilation in never treated hypertensive patients. *Hypertension* 1998;31(4):900-5.

189.- Arcaro, G; Solini, A; Monauini, T; Cretti, A; Brunato, B; Lechi, A et al. ACE genotype and endothelium-dependent vasodilatation of conduit arteries and forearm microcirculation in humans. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2001; 21(8):1313-1319.

190.- Oren I, Brook JG, Gershoni-Baruch R, Kepten I, Tamir A, Linn S, Wolfowitz E. The D allele of the angiotensin-converting enzyme gene contributes towards blood LDL-cholesterol levels and the presence of hypertension. *Atherosclerosis* 1999 Aug;145(2):267-71.

191.- Nakahara K, Matsushita S, Matsuoka H, Inamatsu T, Nishinaga M, Yonawa M, Aono T, Arai T, Ezaki Y, Orimo H. Insertion/deletion polymorphism in the angiotensin-converting enzyme gene affects heart weight. *Circulation* 2000 Jan 18;101(2):148-51.

192.- Panahloo A, Andres C, Mohamed-Ali V, Gould MM, Talmud P, Humphries SE, et al. The insertion allele of the ACE gene I/D polymorphism: a candidate gene for insulin resistance?. *Circulation* 1995;92:3390-3395.

193.- Sheu WH, Lee WJ, Jeng CY, Young MS, Ding YA, Chen YT. Angiotensinogen gene polymorphism is associated with insulin resistance in nondiabetic men with or without coronary heart disease. *Am Heart J* 1998;136: 125-131.

194.- Ferrannini E, Seghieri G, Muscelli E. Insulin and the renin-angiotensin-aldosterone system: influence of ACE inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994;24(Suppl 3):S61-S69.

195.- Ambrosioni E, Bacchelli S, Degli ED, Borghi C. ACE-inhibitors and atherosclerosis. *Eur J Epidemiol* 1992;8:129-133.

196.- Hemmes MMI, O'Shaughnessy IM, Kelly TM, Labelle P, Egan BM, Kissebach AH. Insulin-resistance lipolysis in abdominally obese hypertensive individuals: role of the renin-angiotensin system. *Hypertension* 1996; 28:120-126.

197.- Katsuya T, Horiuchi M, Chen YDI, Koike G, Pratt RE, Dzau VJ; Reaven GM. Relation between deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and insulin resistance, glucose intolerance, hyperinsulinemia and dyslipidaemia. *Arterios Thromb Vasc Biol* 1995;15:779-782.

198.- Chiu KC, McCarthy JE. The insertion allele at the angiotensin-I-converting enzyme gene locus is associated with insulin resistance. *Metabolism* 1997;46:395-399.

199.- Huang XH, Rantalaiho V, Wirta O, Pasternac A, Koivula T, Hiltunen T, et al. Relationship of the angiotensin-converting enzyme gene polymorphism to glucose intolerance, insulin resistance, and hy-

pertension in NIDDM. *Hum Genet* 1998;102(3):372-8.

200.- Perticone F, Ceravolo R, Iacopino S, Cloro C, Ventura G, Maio R, et al. Relationship between angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and insulin resistance in never-treated hypertensive patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(1):172-178.

201.- Jeng JR, Shieh SM, Harn HJ, Lee MM, Sheu WH, Jeng CY. Angiotensin-I-converting enzyme gene polymorphism and insulin resistance in patients with hypertension. *J Hypertens* 1997;15(9):963-968.

202.- Yamamoto J, Kageyama S, Sakurai T, Ishibashi K, Mimura A, Yokota K, et al. Insulin resistance and angiotensin-converting enzyme polymorphism in Japanese hypertensive subjects. *Hypertens Res* 1999;22(2): 81-84.

203.- Ryan AS, Nicklas BJ, Berman DM, Ferrell RE. The insertion/deletion polymorphism of the ACE gene is related to insulin sensitivity in overweight women. *Diabetes Care* 2001 Sep;24(9):1646-52.

204.- Nagi DK, Foy CA, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Grant PJ, Knowler WC. Angiotensin-1-converting enzyme (ACE) gene polymorphism, plasma ACE levels, and their association with the metabolic syndrome and electrocardiographic coronary artery disease in Pima Indians. *Metabolism* 1998; 47:622-626.

Bibliografía de ECA y patología cardiovascular:

205.- Wierzbicki AS, Nimmo L, Feher MD, Cox A, Foxton J, Lant F. Association of angiotensin I-converting enzyme DD genotype with hypertension in diabetes. *J Hum Hypertens* 1995; 9: 671-673.

206.- Pujia A, Gnasso A, Irace C, Dominijanni A, Zingone A, Perrotti N, et al. Association between ACE-D/D polymorphism and hypertension in type II diabetic patients. *J Hum Hypertens* 1994;8:687-691.

207.- Hiraga H, Oshima T, Watanabe M. Angiotensin I converting enzyme gene polymorphism and salt sensitivity in essential hypertension. *Hypertension* 1996;27(part 2): 569-572.

208.- Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992;359: 641-644.

209.- Samani NJ, Thompson JR, O'Toole L, Chaner K, Woods KL. A meta-analysis of the association of deletion allele of the angiotensin-converting enzyme gene with myocardial infarction. *Circulation* 1996; 94:708-712.

210.- Espinosa JS, Rueda E, Muñoz E et al. Asociación entre el polimorfismo inserción/delección del gen codificador de la enzima conversiva de angiotensina e infarto de miocardio en pacientes jóvenes. *Med Clin (Barc)* 1998;110:488-491.

211.- Schunkert H, Hense HW, Holmer SR et al. Association between a deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *N Eng J Med* 1994;330:1634-1638.

212.- Iwai N, Ohmichi N, Nakamura Y, Kinoshita M. DD genotype of the angiotensin-converting enzyme

gen is a risk factor for left ventricular hypertrophy. *Circulation* 1994;90:2622-2628.

213.- Lechin M, Quiñones MA, Omran A Hill R, Yu QT, Rakowski H, et al. Angiotensin-I-converting enzyme polymorphism and left ventricular hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 1995; 92: 1808-1812.

214.-Watanabe Y, Ishigami T, Kawano Y, Umahara T, Nakamori A, Mizushima S, et al. Angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism and carotid plaques in Japanese. *Hypertension* 1997;30 (part 2):569-573.

215.- Marian AJ, Yu QT, Workman R, Greve G, Roberts R. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. *Lancet* 1993;342:1085-1086.

216.-Mattu RK, Needham EWA, Galton DJ, Frangos E, Clark AJL, Caulfield M. A DNA variant at the angiotensin-converting enzyme gene locus associates with coronary artery disease in the Caerphilly heart study. *Circulation* 1995;91:270-274.

217.- Kario K, Kanai N, Saito K, Nago N, Takefumi M, Shimada K. Ischemic stroke and the gene for angiotensin-converting enzyme in Japanese hypertensives. *Circulation* 1996;93:1630:1633.

218.- Marre M, Bernadet P, Gallois PY, Savagner F, Guyene TT, Hallab M, et al. Relationship between angiotensin I converting enzyme gene polymorphism, plasma levels and diabetic retinal and renal complications. *Diabetes* 1994;43:384-388.

219.- Yoshida H, Kuriyama S, Atsumi Y, et al. Angiotensin I converting enzyme gene polymorphism in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Kidney Int* 1996;50: 567-664.

220.- Rovira E, Chaves FJ, Julve R, Pascual JM, Miralles A, Armengod ME, Redón J. Polimorfismo inserción/delección del gen codificador de la enzima conversiva de la angiotensina y microalbuminuria en la hipertensión arterial. *Med Clin (Barc)* 1999;112(19):726-730.

221.- Morris BJ, Zee RYL, Schrader AP. Different frequencies of angiotensin-converting enzyme genotypes in older hypertensive individuals. *J Clin Invest* 1994;94: 1085-1089.

222.- Van Essen GG, Rensma PL, De Zeeuw D, Sluiter WJ, Scheffer H, Apperloo AJ et al. Association between angiotensin converting enzyme gene polymorphism and failure of renoprotective therapy. *Lancet* 1996;347:94-95.

223.- Busjahn A, Knoblauch H, Knoblauch M, Bohlander J, Menz M, Faulhaber HD, et al. Angiotensin-converting enzyme and angiotensinogeno gene polymorphisms, plasma levels, cardiac dimensions. A twin study. *Hypertension* 1997;29(part 2):165-170.

224.- Ueda S, Elliott HL, Morton JJ, Connell JMC. Enhanced pressor response to angiotensin I in normotensive men with the deletion genotype (DD) for angiotensin-converting enzyme. *Hypertension* 1995;25:1266-1269.

225.- Dieguez-Lucena JL, Aranda-Lara P, Ruiz-Galdón M, García-Villanova J, Morell-Ocaña M, Reyes-Engel A. Angiotensin I-converting enzyme genotypes and angiotensin II receptors. Response to therapy. *Hypertension* 1996;28:98-103.

226.- Ohmichi N, Iwai N, Uchida Y, Shichiri G, Nakamura Y, Kinoshita M. Relationship between the

response to the angiotensin converting enzyme inhibitor imidapril and the angiotensin converting enzyme genotype. *Am J Hypertens* 1997;10:951-955.

227.- Kurtand L, Melhus H, Karlsson J, Kahan T, Malquist K, Ohman P, et al. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism predicts blood pressure response to angiotensin II receptor type 1 antagonist treatment in hypertensive patients. *J Hypertens* 2001; 19(10):1783-1787.

228.- Lindpaintner K, Pfeffer MA, Kreutz R et al. A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med* 1995;332:706-711.

229.- Lindpaintner K, Lee M, Larson MC et al. Absence of association or genetic linkage between the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular mass. *N Eng J Med* 1996;334:1023-1028.

230.-Staessen JA, Wang JG, Ginocchio G, Petrov V, Saavedra AP, Soubrier F, et al. The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and cardiovascular-renal risk. *J Hypertens* 1997; 15:1579-1592.

231.- Eichner JE, Christiansen VJ, Moore WE, Terence Dunn S, Schechter E. Angiotensin-converting enzyme gen polymorphism in a cohort of coronary angiography patients. *Atherosclerosis* 2001;154: 673-679.

232.- Mannani T, Katsuya T, Baba S, Inamoto N, Ishikawa K, Higaki J, et al. Low potenciality of angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism as a useful predictive marker for carotid atherogenesis in a large general population of a Japanese city. The Suita study. *Stroke* 2001; 32: 1250-1256.

233.- Barley J, Blackwood A, Carter ND, Crews DE, Cruickshank JK, Jeffery S et al. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism: association with ethnic origin. *J Hypertens* 1994; 12: 955-957.

234.- Barley J, Blackwood A, Miller M, Markandu ND, Carter ND, Jeffrey S et al. Angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism, blood pressure and the renin-angiotensin system in Caucasian and Afro-Caribbean peoples. *J Hum Hypertens* 1996;10:31-35.

235.- Williams SM, Addy JH, Phillips III JA, Dai M, Kpodonu J, Afful J et al. Combinations of variations in multiple genes are associated with hypertension. *Hypertension* 2000;36:2-6.

Bibliografía de la apo-E:

236.- Mahley RW. Atherogenic hyperlipoproteinaemia. The cellular and molecular biology of plasma lipoproteins altered by dietary fat and cholesterol. *Med Clin North Am* 1982; 66:375-400.

237.- Sing CF, Davignon J. Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. *Am J Hum Genet* 1985;37: 268-285.

238.- Kesaniemi YA, Ehnholm C, Miettinen TA. Intestinal cholesterol absorption efficiency in man related to apoprotein E phenotype. *J Clin Invest* 1987;80:578-581.

239.- Weintraub MS; Eisenberg S, Breslow JL. Dietary fat clearance in normal subjects is regulated by

genetic variation in apolipoprotein E. *J Clin Invest* 1987;80:1571-1577.

240.- Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 1-21.

241.- Lahoz C y Ordoñas JM. Apo-E: lípidos plasmáticos, cardiopatía isquémica y enfermedad de Alzheimer. *Med Clin (Barc)*1997; 109: 31-36.

242.- Gregg RE, Zech LA; Schaefer EJ, Brewer HB Jr. Type III hyperlipoproteinemia: defective metabolism of an abnormal apolipoprotein E. *Science* 1981; 211:584-585.

243.- Gregg RE, Zech LA; Schaefer EJ, Stark D, Wilson D, Brewer HB Jr. Abnormal in vivo metabolism of apolipoprotein E4 in humans. *J Clin Invest* 1986;78:815-821.

244.- Utermann G. Apolipoproteins, quantitative lipoprotein traits and multifactorial hyperlipidaemia. In: *Molecular approach to human polygenic disease.* ((Ciba Foundation Symposium 130). 1987. Wiley, Toronto, pp 52-69.

245.- Utermann G, Kindermann I, Kaffamk H, Steinmetz A. Apolipoprotein E phenotypes and hyperlipidemia. *Human Genet* 1984;65:232-236.

246.- Lussier-Cacan S, Bouthillier D, Davignon J. Apo E allele frequency in primary endogenous hypertriglyceridemia (type IV) with and without hyperapobetalipoproteinemia. *Arteriosclerosis* 1985;5:639-643.

247.- Day I, Wilson DI. Genetics and cardiovascular risk. *BMJ* 2001; 323(7326):1409-1412.

248.-National Center for Biotechnology information. OMIM: online mendelian inheritance in man. 107741. apolipoprotein E; apo e. www.ncbi.nlm.nih.gov/80/htbin-post/Omim/dispim?107741.

249.- Mahley RW, Innerarity TL. Lipoprotein receptor and cholesterol homeostasis. *Biochem Biophys Acta* 1983;737:197-222.

250.- Davignon J. Apolipoprotein E polymorphism, dyslipemia and atherosclerosis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 1991; 1:53-56.

251.- Srinivasan SR, Ehnholm C, Wattigney WA, Bao W, Berenson GS. The relation of apolipoprotein E polymorphism to multiple cardiovascular risk in children: the Bogalusa Heart Study. *Atherosclerosis* 1996; 123: 33-42.

252.- Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Johnson S, Ordoñas JM, Schaefer MM, Castelli WP et al. Effects of gender and menopausal status on the association of apolipoprotein E phenotype with plasma lipoprotein levels. Results of the Framingham Offspring study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994;14:1105-1113.

253.- Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Johnson S, Ordoñas JM, Schaefer MM, Castelli WP, et al. Effects of gender and menopausal status on the association of apolipoprotein E phenotype with plasma lipoprotein levels. Results of the Framingham Offspring Study. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1994;14:1105-1113.

254.-Dallongeville J, Lussier-Cacan S, Davignon H. Modulation of plasma triglyceride levels by apo E phenotype: a meta-analysis. *J Lipid Res* 1992;33:447-454.

255.- Corella D, Guillén M, Portolés O, Sabater A, Cortina S, Folch J, et al. Polimorfismos en el gen de la apolipoproteína E y riesgo de hipercolesterole-

- mia: un estudio de casos y controles en una población laboral de Valencia. *Med Clin (Barc)* 2000;115:170-175.
- 256.- Luc G, Bard JM, Arvelier D, Evans A, Cambou JP, Bingham A, et al. Impact of apolipoprotein E polymorphism in lipoproteins and risk of myocardial infarction. The ECTIM study. *Arterioscler Thromb* 1994;14: 1412-1419.
- 257.- De Knijff P, Kaptein A, Boomsma D, Princen HMG, Frants RR, Havekes LM. Apolipoprotein E polymorphism affects plasma levels of lipoprotein (a). *Atherosclerosis* 1991;90:169-174.
- 258.- Tiret L, De Knijff P, Hans-Jurgen M, Ehnholm C, Nicaud V, Havekes LM. Apo E polymorphism and predisposition to coronary heart disease in youths of different European populations. The EARS study. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1617-1624.
- 259.- Hammon M, Bauters C, Amant C, McFadden EP, Helbecque N, Lablanche JM, et al. Relation between the deletion polymorphism of the angiotensin I converting enzyme gene and late luminal narrowing after coronary angioplasty. *Circulation* 1995;92:296-299.
- 260.- Batalla A, Alvarez R, Reguero JR, Hevia S, Iglesias-Cubero G, Alvarez V, Cortina A, Gonzalez P, Celada MM, Medina A, Coto E. Synergistic effect between apolipoprotein E and angiotensinogen gene polymorphisms in the risk for early myocardial infarction. *Clin Chem* 2000 Dec;46(12):1910-5.
- 261.- Peña R, Mostaza JM, Lahoz C, Jimenez J, Subirats E, Pinto X, et al. Polimorfismo de la apolipoproteína E y enfermedad coronaria. *Med Clin (Barc)* 2001; 116:681-685.
- 262.- Kuusieto J, Mykkanen L, Kervinen K, Kesaniemi YA, Laasko M. Apolipoprotein E4 phenotype is not an important risk factor for coronary heart disease or stroke in elderly subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1280-1286.
- 263.- Basun H, Corder EH, Guo Z, Lannfelt L, Corder LS, Manton KG, et al. Apolipoprotein E polymorphism and stroke in a population sample aged 75 years or more. *Stroke* 1996;27:1310-1315.
- 264.- Kessler C, Spitzer C, Stauske D, Mende S, Stadtmuller J, Walther R, et al. The apolipoprotein E and beta-fibrinogen G/A-455 gene polymorphisms are associated with ischemic stroke involving large-vessel disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2880-2884.
- 265.- Terry JG, Howard G, Mercun M, Bond GM, Crouse JR III. Apolipoprotein E polymorphism is associated with segment-specific extracranial carotid artery intima-media thickening. *Stroke* 1996;27:1755-1759.
- 266.- Schmidt R, Schmidt H, Fazekas F, Schumacher M, Niederkorn K, Kapeller P, et al. Apolipoprotein E polymorphism and silent microangiopathy-related cerebral damage. Results of the Austrian Stroke Prevention Study. *Stroke* 1997 May;28(5):951-956.
- 267.- Isbir T, Agachan B, Yilmaz H, Aydin M, Kara I, Eker D, Eker E. Interaction between apolipoprotein-E and angiotensin-converting enzyme genotype in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimer's Dis Other Demen* 2001 Jul;16(4):205-210.
- 268.- McCarron MO, Muir KW, Weir CJ, Dyker AG, Bone I, Nicoll JAR, et al. The apolipoprotein E e4 allele and outcome in cerebrovascular disease. *Stroke* 1998;29:1882-1887.
- 269.- Utermann G. Apolipoprotein E polymorphism in health and disease. *Am Heart J* 1987; 113: 433-440.
- 270.- Valdez R, Howard BV, Stern MP, Haffner SM. Apolipoprotein E polymorphism and insulin levels in a biethnic population. *Diabetes Care* 1995; 18(7): 992-1000.
- 271.- Hülya Yilmaz, Turgay Isbir*, Bedia Açhan, Makbule Aydin. Is 4 allele of apolipoprotein associated with more severe end-organ damage in essential hypertension?. *Cell Biochem Funct* 2001 Sep;19(3):191-5.
- 272.- Weiss D, Kools JJ, Taylor WR. Angiotensin II-induced hypertension accelerates the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Circulation* 2001 Jan 23;103(3):448-54.
- 273.- Yang R, Powell-Braxton L, Ogaoawara AK, Dybdal N, Bunting S, Ohneda O, et al. Hypertension and endothelial dysfunction in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(11); 2762-8.
- 274.- Trieu VN, Uckum FM: Male-associated hypertension in LDL-R deficient mice. *Biochem Biophys Res Comm* 1998;247:277-279.
- 275.- Chiang AN, Chang CP, Chou YC, Huang KY, Hu HH. Differential distribution of apolipoprotein E in young and aged spontaneously hypertensive and stroke-prone rats. *J Hypertens* 1999; 17(6):793-800.
- 276.- Katsuya T, Sato N, Asai T, Fukuda M, Takiuchi S, Fu Y, et al. Association of polymorphism in the promoter region of the apolipoprotein E gene with diastolic blood pressure in normotensive Japanese. *Hypertens Res* 2000; 23(3):271-5.
- 277.- Uusitupa M, Sarkkinen K, Antero Kesaniemi Y. Apolipoprotein E phenotype and blood pressure. *Lancet* 1994; 343:57.
- 278.- De Knijff P, Boomsma DI, Feskens EJM, Jespersen J, Johansen LG, Kluff C, et al. Apolipoprotein E phenotype and blood pressure. *Letter. Lancet* 1994; 343; 1234-5.
- 279.- Isbir T, Yilmaz H, Bihorac A, Akoglu E. Mild-to-moderate hypertension and apolipoprotein E gene polymorphism. *Am J Hypertens* 1997; 10(7): 827-828.

Polimorfismo Beta-3:

- 280.- Lönnqvist F, Krief S, Strosberg D, Nyberg B, Emorine LJ, Arner P. Evidence for a functional beta-3-adrenoreceptor in man. *Br J Pharmacol* 1993; 110: 929-936.
- 281.- Lönnqvist F, Thörne A, Nilsell K, Hoffstedt J, Arner P. A pathogenic role of visceral fat beta-3-adrenoreceptor in obesity. *J Clin Invest* 1995; 95: 1109-1116.
- 282.- Colberg SR, Simoneau JA, Thaete FL, Kelley DE. Skeletal muscle utilization of free fatty acids in women with visceral obesity. *J Clin Invest* 1995; 95: 1846-1853.
- 283.- Emorine LJ, Marullo S, Briend-Sutren MM, Patey G, Tate K, Delavier-Klutchko C, et al. Molecular characterization of the human beta-3-adrenergic receptor. *Science* 1989; 245:1118-21.
- 284.- Van Spronsen A, Nahmias C, Krief S, Briend-Sutren MM, Strosberg AD, Emorine LJ. The promo-

ter and intron/exon structure of the human and mouse beta-3-adrenergic receptor genes. *Eur J Biochem* 1993;213:1117-24.

285.- Collins S, Daniel KW, Rohlfis EM, Ramkumar V, Taylor IL, Gettys TW. Impaired expression and functional activity of the beta-3-adrenergic receptors in adipose tissue of congenitally obese (C57BL/6j/ob/ob) mice. *Mol Endocrinol* 1994;8:518-27.

286.- Susulic S, Frederich RC, Lawitts JA, et al. Knockout of the beta-3-adrenergic receptor gene. In: Program and abstracts of the 77th annual meeting of the endocrine society, June 14-17, 1995, Bethesda, Md.: Endocrine Society, 1995:36. Abstract.

287.- Himms-Hagen J, Cui J, Danforth E Jr, et al. Effect of CL-316,243, a thermogenic beta-3-agonist, on energy balance and brown and white adipose tissues in rats. *Am J Physiol* 1994;266:R1371-R1382.

288.- Connacher AA, Bennet WM, Jung RT. Clinical studies with the beta-3 adrenoceptor agonist BRL26830A. *Am J Clin Nutr* 1992;55:Suppl:248S-261S.

289.- Walston J, Silver K, Bogardus C, Knowler WC, Celi FS, Austin S, et al. Time of onset of insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the beta-3 adrenergic-receptor gene. *N Eng J Med* 1995; 333: 343-7.

290.- Widén E, Lehto M, Kanninen T, Walston J, Shuldiner AR, Groop LC. Association of a polymorphism in the beta-3-adrenergic-receptor gene with features of the insulin resistance syndrome in Finns. *N Eng J Med* 1995; 333: 348-51.

291.- Clément K, Vaisse C, Manning BSJ, Basdevant A, Guy-Grand B, Ruiz J, et al. Genetic variation in the beta-3-adrenergic receptor and increased capacity to gain weight in patients with morbid obesity. *N Eng J Med* 1995; 333: 352-4.

292.- Sipilainen R, Uusitupa M, Heikkinen S, Rissanen A, Laakso M. Polymorphism of the beta-3-adrenergic receptor gene affects basal metabolic rate in obese Finns. *Diabetes* 1997; 46: 77-80.

293.- Borkman M, Storlien LH, Pan DA, Jenkins AB, Chisholm DJ, Campbell LV. The relationship between insulin sensitivity and the fatty-acid composition of skeletal-muscle phospholipids. *N Eng J Med* 1993; 328:238-44.

294.- Storlien LH, Jenkins AB, Chisholm DJ, Pascoe WS, Khouri S, Kraegen EW. Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats: relationship to muscle triglyceride and v-3 fatty acids in muscle phospholipid. *Diabetes* 1991; 40: 280-9.

295.- Baron AD, Brechtel-Hook G, Johnson A, Cronin J, Leaming R, Steimberg HO. Effect of perfusion rate on the time course of insulin-mediated skeletal muscle glucose uptake. *AM J physiol* 1996; 271:E1067-E1072.

296.- Kurabayashi T, Carey DG; Morrison NA. The beta-3 adrenergic receptor gene Trp64Arg mutation is over represented in obese women. Effects on weight, BMI, abdominal fat, blood pressure and reproductive history in an elderly Australian population. *Diabetes* 1996; 45: 1358-1363.

297.- Sakane n, Yoshida T, Umekawa T, Kondo M, Sakai Y, Takahashi T. Beta-3-adrenergic-receptor

polymorphism: a genetic marker for visceral fat obesity and the insulin resistance syndrome. *Diabetologia* 1997; 40: 200-204.

298.-García-Rubí E, Starling R, Tchernof A, Matthews DE, Walston J, Shuldiner AR, et al. Trp64Arg variant of the beta-3-adrenergic adrenoceptor and insulin resistance in obese postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 4002-4005.

299.- Moriarty M, Wing RR, Kuller LH, Ferrell RE. Trp64Arg substitution in the beta 3-adrenergic receptor does not relate to body weight in healthy, premenopausal women. In *J Obes Relat Metab Disord* 1997; 21(9): 826-9.

300.- Odawara M, Sasaki K, Yamashita K. Beta-3 adrenergic receptor gene variant and japanese NIDDM: a pitfall in meta análisis. *Lancet* 1996; 348: 698-699.

301.- Benecke H, Topak H, Von zur Muhlen A, Schuppert F. A study on the genetics of obesity: influence of polymorphism of the beta-3-adrenergic receptor and insulin receptor substrate 1 in relation to weight loss, waist to hip ratio and frequencies of common cardiovascular risk factors. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000; 108(2):86-92.

302.- Ringel J, Kreutz R, Distler A, Sharma AM. The Trp64Arg polymorphism of the beta 3-adrenergic receptor gene is associated with hypertension in men with type 2 diabetes mellitus. *Am J Hypertens* 2000; 13(9): 1027-31.

303.- Tonolo G; Melis MG, Secchi G, Atzeni MM, Angius MF, Carboni A, et al. Association of Trp64Arg beta-3-adrenergic receptor gene polymorphism with essential hypertension in the Sardinian population. *J Hypertens* 1999; 17(1):33-38.

304.- Strazzullo P, Iacone R, Siani A, Cappuccio FP, Russo O, Barba G, et al. Relationship of the Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenoceptor gene to central adiposity and high blood pressure: interaction with age. Cross-sectional and longitudinal findings of the Olivetti Prospective Heart Study. *J Hypertens* 2001;19: 399-406.

Material y Métodos:

305.- Anonymous. The Sixth Report of the Joint National Committee on Prevention Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. *Arch Intern Med* 1997;157:2413-2446.

306.- Anonymous. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001 May 16;285(19):2486-97.

307.- Freidewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, with out of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-502.

308.- Tai MM. A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. *Diabetes Care* 1994;17:152-154.

309.- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin

concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-419.

310.- Ascaso JF, Romero P, Real JT, Priego A, Valdecabres C, Carmena R. Cuantificación de la insulinorresistencia con los valores de insulina basal e índice HOMA en una población no diabética. *Med Clin (Barc)* 2001; 117(14): 530-33.

311.- Rose HG, Oklander M. Improved procedure for the extraction of lipids from human erythrocytes. *J Lipid Res* 1965;6: 428-431.

312.- Peuchant E, Wolff R, Salles E, Jensen R. One-step extraction of human erythrocytes lipids allowing rapid determination of fatty acid composition. *Anal Biochem* 1989;181:341-344.

313.- Canessa M, Adragna N, Solomon HS, Connolly TM, Tosteson DC. Increased sodium-lithium countertransport in red cells of patients with essential hypertension. *N Eng J Med* 1980;302:772-776.

314.- Rigat B, Hubert C, Corvo P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dypeptidyl carboxypeptidase). *Nucleic Acids Res* 1992;184:9-15.

315.- Fogarty DG, Maxwell AP, Doherty CC, Hughes AE, Nevin NC. ACE gene typing. *Lancet* 1994;343:851.

316.- Wenham PR, Price WH, Blundell G. Apolipoprotein E genotyping by on-stage PCR. *Lancet* 1991; 337:1158-1159.

Discusión:

317.- Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. ACE gene polymorphism in cardiovascular disease. Meta-analyses of small and large studies in whites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:484-492.

318.- Matsubara M, Suzuki M, Fujiwara T, Kikuya M, Metoki H, Michimata M, et al. Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism and hypertension: The Ohasama study. *J Hypertens* 2002; 20: 1121-26.

319.- Zaman MM; Yoshiike N, Date C, Yokoyama T, Matsumura Y, Ykemoto S, et al. Angiotensin converting enzyme genetic polymorphism is not associated with hypertension in a cross-sectional sample of a Japanese population: The Shibata study. *J Hypertens* 2001; 19:47-53.

320.- Grupo Español de Genética e Hipertensión arterial de la Sociedad Española de Hipertensión/ Liga Española para la lucha contra la Hipertensión arterial. Polimorfismos genéticos del sistema renina-angiotensina e hipertensión arterial esencial. *Med Clí (Barc)* 2002;118(15):575-9.

321.- JS García Morillo, J Villar, I Vallejo, R Aparicio, D Nieto, J Carneado, P Stiefel, et al. Influencia de los polimorfismos genéticos del gen de la ECA, apo-E y del receptor beta-3 adrenérgico en pacientes hipertensos con síndrome metabólico. VII Reunión Nacional de la SEH-LELHA Madrid-2002.

322.- Engeli S, Gorzelnik K, Kreutz R, Runkel N, Distler A, Sharma AM. Co-expression of renin-angiotensin system genes in human adipose tissue. *Journal of Hypertension* 1999; 17(4):555-60.

323.- Vasku A, Soucek M, Tschöplová S, Stejskalová A. An association of BMI with A (-6) G, M235T and T174M polymorphisms in angiotensinogen ge-

ne in essential hypertension *Journal of Human Hypertension* (2002) 16, 427-430.

324.- Giacchetti G, Faloia E, Mariniello B, Sardu C, Gatti C, Camilloni MA, et al. Overexpression of the renin-angiotensin system in human visceral adipose tissue in normal and overweight subjects. *Am J Hypertens* 2002 May 15:381-8.

325.- Engeli S, Negrel R, Sharma AM. Physiology and Pathophysiology of the Adipose Tissue Renin-Angiotensin System. *Hypertension*. 2000;35:1270.

326.- Ryan AS, Nicklas BJ, Berman DM, Ferrell RE. The insertion/deletion polymorphism of the ACE gene is related to insulin sensitivity in overweight women. *Diabetes Care* 2001; 24(9): 1646-52.

327.- Thomas GN, Tomlinson B, Chan JC, Sanderson JE, Cockram CS, Critchley JA. Renin-angiotensin system gene polymorphisms, blood pressure, dyslipidemia, and diabetes in Hong Kong Chinese: a significant association of the ACE insertion/deletion polymorphism with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2001; 24(2):356-61.

328.- Strosberg AD. Association of beta-3 adrenoceptor polymorphism with obesity and diabetes: current status. *Trend Pharmac Sci* 1997; 18: 449-454.

329.- Santos JL, Perez-Bravo F, Martinez JA, Montalvo D, Albala C, Carrasco E. No evidence for an association between genetic polymorphisms of beta (2)- and beta(3)-adrenergic receptor gene with body mass index in Aymara natives from Chile. *Nutrition* 2002; 18(3):255-8.

330.- Kawamura T, Egusa G, Fujikawa R, Okubo M. Beta(3)-adrenergic receptor gene variant is associated with upper body obesity only in obese Japanese-american men but not in women. *Diabetes Res Clin Pract* 2001; 54(1): 49-55.

331.- Ukkola O, Rankinen T, Weisnagel SJ, Sun G, Perusse L, Chagnon YC, et al. Interaction among the a2- b2- y b3-adrenergic receptor genes and obesity-related phenotypes in the Quebec Family Study. *Metabolism* 2000;49:1063-70.

332.- Corella D, Guillen M, Portolés O, Sorlí JV, Alonso V, Folch J, et al. Gender specific associations of the Trp64Arg mutation in the beta3-adrenergic receptor gene with obesity-related phenotypes in a Mediterranean population: interaction with a common lipoprotein lipase gene variation. *J Intern Med* 2001;250:348-360.

333.- Mentuccia D, Proietti-Pannunzi L, Tanner K, Bacci V, Pollin TI, Poehlman ET, et al. Association between a novel variant of the human type 2 deiodinase gene Thr92Ala and insulin resistance: evidence of interaction with the Trp64Arg variant of the beta-3 adrenergic receptor. *Diabetes* 2002; 51(3): 880-3.

334.- Urhammer SA, Clausen JO, Hansen T, Pedersen O. Insulin sensitivity and body weight changes in young white carriers of the codón 64 amino acid polymorphism of the beta-3 adrenergic receptor gene. *Diabetes* 1996;45:1115-20.

335.- Thomas GN, Tomlinson B, Chan JCM, Young RP, Critchley JAJH. The Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene and obesity in Chinese subjects with components of the metabolic syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24:545-51.

336.- Proenza AM, Poissonnet CM, Ozata M, e al.

- Association of sets of alleles of genes encoding beta3-adrenoreceptor, uncoupling protein 1 and lipoprotein lipase with increased risk of metabolic complications in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24: 93-100.
- 337.- Moriarty M, Wing RR, Kuller LH, Ferrel RE. Trp64Arg substitution in the beta3-adrenergic receptor does not relate to body weight in healthy, postmenopausal women. *In J Obes* 1997; 21: 829.
- 338.- Stengard JH, Zerba KE, Pekkanen J, Ehnholm C, Nissinen A, Sing C. Apolipoprotein E polymorphism predicts death from coronary heart disease in a longitudinal study of elderly finnish men. *Circulation* 1995; 91(2): 265-69.
- 339.- Couderc R, Mahieux F, Bailleul S, Felon G, Mary R, Fermanian J. Prevalence of apolipoprotein E phenotypes in ischemic cerebrovascular disease. A case-control study. *Stroke* 1993,24(5):661-4.
- 340.- Woo D, Sauerbeck LR, Kissela BM, Khoury JC, Szaflarski JP, Gebel J, et al. Genetic and environmental risk factors for intracerebral hemorrhage: Preliminary results of a population-based study. *Stroke* 2002; 33(5): 1190-1196.
- 341.- Boer J, Ehnholm C, Menzel H-J, Havekes LM, Rosseneu M, O'Reilly D, et al. Interaction between lifestyle-related factors and the ApoE polymorphism on plasma lipids and apolipoproteins: The Ears Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(9): 1675-1681.
- 342.- Reilly SL, Ferrell RE, Kottke BA, Sing CF. The gender-specific apolipoprotein E genotype influence on the distribution of plasma lipids and apolipoproteins in the population of Rochester, Minnesota: regression relationship with concomitants. *Am J Hum Genet* 1992; 51:1311-1324.
- 343.- Oh JY, Barret-Connor E. Apolipoprotein E polymorphism and lipid levels differ by gender and family history of diabetes. The Rancho Bernardo Study. *Clinical Genetics* 2001;60(2):132-137.
- 344.- Uusitupa Mj, Karhunen L, Rissanen A, Fransila-Kallunki A, Niskanen L, et al. Apolipoprotein E phenotype modifies metabolic and hemodynamic abnormalities related to central obesity in women. *Am J Clin Nutr* 1996;64:131-6.
- 345.- Frikke-Schmidt R, Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Jensen G, Nordestgaard BG. Apolipoprotein E genotype: epsilon 32 women are protected while epsilon 43 and epsilon 44 men are susceptible to ischemic heart disease. The Copenhagen City Heart Study. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35:1192-9.
- 346.- Sorli JV, Velert R, Guillén M, Portolés O, Ramírez JB, Iborra J, et al. Efecto del polimorfismo de la apolipoproteína E en el perfil lipoproteico y riesgo cardiovascular en una población mediterránea. *Med Clin (Barc)* 2002;118(15):569-74.
- 347.- Despres J-P, Verdon M-F, Moorjani S, Pouliot MC, Nadeau A, Bouchard C, et al. Apolipoprotein E polymorphism modifies relation of hyperinsulinemia to hypertriglyceridemia. *Diabetes* 1993;42:1474-81.
- 348.- Valdez R, Stern MP, Howard BV, Haffner SM. Apolipoprotein E polymorphism and insulin levels in a biethnic population.. *Diabetes Care* 1995;18:993-1000.
- 349.- Pablos-Mendez A, Mayeux R, Ngai C, Shea S, Berglund L. Association of apo E polymorphism with plasma lipid levels in a multiethnic elderly population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(12):3534-3541.
- 350.- Wierzbicki AS, Hardman TC, Cheung J, Lambert-Hammil M, Patel S, Morrish Z, et al. The apolipoprotein E2 alleles modulates activity and maximal velocity of the sodium-lithium countertransport. *Am J Hypertens* 2002;15 (7):633-7.
- 351.- Lemieux I, Almeras N, Mauriege P, Blanchet C, Dewailly E, Bergeron J, et al. Prevalence of "hypertriglyceridemic waist" in men who participated in the Quebec Health Survey: association with atherogenic and diabetogenic metabolic risk factors. *Can J Cardiol* 2002; 18(7):725-32.
- 352.- Brook RD, Bard RL, Rubenfire M, Ridker PM, Rajagopalan S. Usefulness of visceral obesity (waist/hip ratio) in predicting vascular endothelial function in healthy overweight adults. *Am J Cardiol*. 2001 Dec 1;88(11):1264-9.

GLOSARIO

ABREVIATURAS más utilizadas:

ADN: ácido desoxirribonucleico.

Apo-A1: apoproteína A.

Apo-B: Apoproteína B.

Apo-E: apolipoproteína E.

ARN: ácido ribonucleico.

AU: ácido úrico.

CLM: Composición lipídica de la membrana del eritrocito.

Col: colesterol de membrana.

COL: Colesterol total.

COL-HDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad.

COL-LDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad

COL-VLDL: colesterol unido a lipoproteínas de muy baja densidad.

CONTRA: Contratransporte sodio/litio.

CPH: cociente colesterol/fosfolípidos de membrana.

ECA: enzima convertidora de angiotensina.

E2,E3, E4: genotipos de la apolipoproteína E.

e2,e3,e4: alelos de la apolipoproteína E.

G0,60,120: Glucosa en los 3 puntos tras sobrecarga en el momento basal, a los 60 y 120 minutos.

GAR: área bajo la curva de glucosa.

HOMA: modelo homeostático.

HTA: Hipertensión arterial esencial o hipertensos.

H2: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad tipo 2.

H3: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad tipo 3.

IMC: índice de masa corporal.

IN0, 60, 120: Insulina en los 3 puntos tras sobrecarga en el momento basal, a los 60 y 120 minutos.

INAR: área bajo la curva de insulina.

IND: índice aterogénico.

Lp(a): Lipoproteína a.

NS: sin significación estadística.

NHDL: colesterol no unido a lipoproteínas de alta densidad.

p: significación estadística.

PAS: presión arterial sistólica.

PAD: presión arterial diastólica.

PC: fosfatidilcolina.

PE: fosfatidiletanolamina.

PI: fosfatidilinositol.

PS: fosfatidilserina.

RB3A: receptor beta-3-adrenérgico.

RI: Resistencia a la acción periférica de la insulina.

SM: Esfingomielina.

SMB: síndrome metabólico.

SRAA: Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.

TG: Triglicéridos totales.

TG-HDL: triglicéridos unidos a lipoproteínas de alta densidad.

TG-LDL: triglicéridos unidos a lipoproteínas de baja densidad.

TG-VLDL: triglicéridos unidos a lipoproteínas de muy baja densidad.

XBETA: expresa en % de función de la célula beta pancreática según el modelo HOMA.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Señor de la Facultad de Medicina, para pasar la Tesis Doctoral de

por Roberto Pascua Plouillo
Título: Influencia del polimorfismo del gen de la ECA, APO-E, del receptor de la leptina, así como sobre el perfil lipídico en la resistencia a la insulina compar. lip. de la membrana en la HPA en el ciclo de recreo, dorm. en 20
Salvo suiente Am. Saucedo

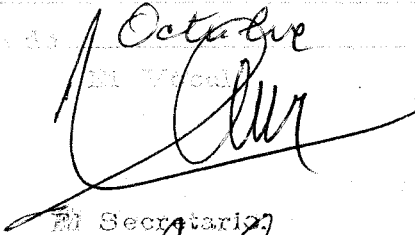
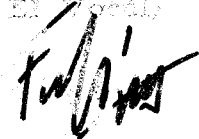
Sevilla, 15 de Octubre

2003

El Vocal

El Vocal

El Vocal



EL PRESIDENTE

El Secretario

El Doctorado

