

DEPARTAMENT DE GENÈTICA

ESTUDIO DE FACTORES GENÉTICOS DE LOS SISTEMAS
RELACIONADOS CON ESTRÉS OXIDATIVO EN LA
HIPERTENSIÓN

MARIA LUISA MANSEGO TALAVERA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2009

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 30 de juny de 2009 davant un tribunal format per:

- Dr. Antonio Coca Payeras
- Dr. Jose M. Pascual Izuel
- Dr. Guillermo Zalba Goñi
- Dra. Gemma Rojo Martínez
- Dra. Carmen Nájera Mortes

Va ser dirigida per:

Dr. F. Javier Chaves Martínez

Dr. Josep Redón Mas

©Copyright: Servei de Publicacions
Maria Luisa Mansego Talavera

Dipòsit legal: V-841-2010

I.S.B.N.: 978-84-370-7576-1

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Estudio de Factores Genéticos de los Sistemas Relacionados con Estrés Oxidativo en la Hipertensión

Genética de la Hipertensión: Importancia de los Sistemas Implicados en Estrés Oxidativo.

Tesis Doctoral presentada por:
M^a Luisa Mansego Talavera,
para la obtención del grado de
Doctora en Ciencias Biológicas.

Dirigida por los directores:
Dr. D. F. Javier Chaves Martínez y
Dr. D. Josep Redón Mas.

VALENCIA, 2009

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Felipe Javier Chaves Martínez, doctor en Ciencias Biológicas, licenciado en Biología y especialista en Genética, y Josep Redón Mas, catedrático de medicina de la Universitat de València.

Hacen constar,

Que la tesis doctoral titulada **Estudio de factores genéticos de los sistemas relacionados con estrés oxidativo en la hipertensión**, presentada por M^a Luisa Mansego Talavera, dirigida por el Dr. F. Javier Chaves Martínez y el Profesor Dr. Josep Redón Mas, representa una gran aportación al tema y reúne los méritos suficientes para ser presentada y defendida ante el tribunal correspondiente.

Y para que conste donde proceda, firmamos la presente en València, 13 de febrero de 2009.

Firma del codirector de la tesis
Dr. F. Javier Chaves Martínez

Firma del codirector de la tesis
Dr. Josep Redón Más

*Si vas a emprender el viaje hacia Ítaca,
pide que tu camino sea largo,
rico en experiencias, en conocimiento.*

.....

*Ítaca te regaló un hermoso viaje.
Sin ella el camino no hubieras emprendido.
Mas ninguna otra cosa puede darte.*

Konstantino P. Kavafis-Ítaca-

*A la memòria
de la meua avia*

Agraïments

Cronològicament els meus agraïments han d'anar dirigits als meus pares, i als pares dels meus pares. Gràcies per confiar en mi, en les meues aventures i desventuras, donar-me el vostre suport i afecte, sou la meua guia de vida. A la meua germana, Ñeira gràcies per ensenyar-me tant i estar ací sempre malgrat la distància, la meua lluitadora. Per descomptat a la resta de la meua família som molts i no acabaria però no puc evitar donar-vos les gràcies per la vostra generositat, inesgotable i carinyosa. Us estime.

Als meus directors Javier Chaves i Josep Redón, gràcies per brindar-me aquesta oportunitat i confiar en mi per a desenvolupar aquest projecte. Per demostrar-me que es pot i s'ha de gaudir amb "el treball", gràcies per la vostra il·lusió contagiosa i sobretot gràcies per ser un exemple tant professional com personal.

Als meus companys i amics de laboratori, la meua altra xicoteta família formada a força de suport, afecte, riures i hores, que van ser hores. Vero, gràcies per brindar-me l'oportunitat d'aprendre al teu costat, cadascuna té els seus mètodes, però el resultat és be paregut, que faria jo sense tu. Mil gràcies, Tani, per ajudar-me en les qüestions científiques i no tan científiques, pel riure, per compartir eixes xicotetes joies musicals que ens alegren l'ànima. Ana Barbara, gràcies per compartir aquests anys ací i perdó per haver patit els meus primers "pinitos" amb els gels de agarosa. Pablo, gràcies per la teua inestimable ajuda amb les referències bibliogràfiques i informàtiques. I per descomptat a la resta d'aquesta família que ha anat creixent en aquests anys. Aupa eixa "Unidad de Genotipazo"! Carmen, Charo, M^a José, Rebeca, Victoria, Cris (tu tens doble) i Sergio. Gràcies a tots per la teràpia de grup, per aquests moments de patxaran dinant i pel bon rotllo. Aquest camí no haguera sigut el mateix sense vosaltres, mil gràcies per la vostra paciència d'aquests últims mesos.

Gràcies al Dr. Juan Carlos Escudero per la seua important col·laboració en aquest estudi, el seu rigor al llarg del treball i per tractar-nos tan bé a Valladolid.

Gràcies al laboratori de Dr. Guillermo Sáez per la col·laboració amb les mesures dels paràmetres d'estrès oxidatiu, mil gràcies Jorge pel contacte.

Gràcies al laboratori del departament de Medicina per la col·laboració amb les extraccions de ADN de les mostres de Valladolid i de Sagunt, gracies Úrsula, Pili i Rosa.

A Concha Règia, poc s'espera ella que li dedique aquestes paraules, però sense ella, no haguera començat aquesta “andanza”. Gràcies per oferir-me l'estancia i la possibilitat de conèixer Mèxic, “la casa azul” i a les choluteques. Nata gràcies per les correccions i les hores de somni no recuperades.

“And with a little help from my friends”. No podia perdre l'ocasió per a agrair als amics de tota la vida, i els que han anat arribant amb els anys. Gràcies per la seua comprensió i per les hores intercanviades entre el laboratori i vosatres, per ajudar-me a créixer i a trobar el meu lloc, per donar-me molts dies feliços i estar al meu costat en els no tan feliços, Gracies: María, Antonio, Emilio, M^aCarmen, Iñaki, Jose Luis, Elena, Ignacio, Espe, Alberto, Alberto, Yaiza. Menció especial per a Carlos i Cris, gràcies per la injecció de riure, per la complicitat, per eixos xicotets detalls de la vida diària, que són els que importen, per ser la meua vàlvula d'escapi fins i tot d'explosió i pels sms vespertins del divendres pel matí. Sergio per descomptat que tu no podies faltar, el millor del “Clot”, per molts anys. Ali i Carmen, per eixos anys a la universitat, ja tant lluny i sobretot pels de després.

Gràcies a tots els que em van preguntar quan anava a acabar la tesi, la vostra insistència em va donar forces.

I finalment, i no per això menys important, a Vicente,eskerrik asko, maitia, Nire iparraIzateko. Nahiago izango zaitut.

Abreviaturas

8-oxo-dG,	8-Hidroxi 2-desoxiguanosina.
ADN,	Ácido desoxirribonucleico.
ADNc,	Ácido desoxirribonucleico complementario.
Algoritmo EM,	Algoritmo de mínima expectación.
ARNm,	Ácido ribonucleico mensajero.
B2M,	Gen o proteína beta 2 microglobulina.
CAT,	Gen o proteína catalasa.
CuZnSOD,	Proteína cobre-zinc superóxido dismutasa, citosólica.
CYBA,	Gen o proteína citocromo b-245, polipéptido alfa o p22phox.
CYBB,	Gen o proteína citocromo b-245, polipéptido beta o p91phox.
dNTP	Dinucleótidos trifosfatos.
EcSOD,	Proteína cobre-zinc superóxido dismutasa, extracelular.
EDTA,	Ácido etilendiaminotetraacético.
EO,	Estrés oxidativo.
EROs,	Especie reactiva del oxígeno.
EUA	Excreción urinaria de albúmina.
g, mg, µg, ng, Kg	Gramo, miligramo, microgramo, nanogramo, kilogramo.
G6PDH,	Gen o proteína glucosa 6- fosfato deshidrogenasa.
GAPDH,	Gen o proteína gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenada.
GCLC,	Gen o proteína glutamato cisteina ligasa, subunidad catalítica.
GCLM,	Gen o proteína glutamato cisteina ligasa, subunidad reguladora.
GPX1,	Gen o proteína glutatión peroxidasa 1, celular.
GPX2,	Gen o proteína glutatión peroxidasa 2, gastrointestinal.
GPX3,	Gen o proteína glutatión peroxidasa 3, plasma.
GPX4,	Gen o proteína glutatión peroxidasa 4, fosfolipídica.
GPX5,	Gen o proteína glutatión peroxidasa 5, epididimal.
GPX6,	Gen o proteína Glutatión peroxidasa 6, olfatoria.
GSH,	Glutatión reducido.
GSR,	Gen o proteína glutatión reductasa.
GSS,	Gen o proteína glutatión sintasa.
GSSG,	Glutatión oxidado.
H₂O₂,	Peróxido de hidrógeno.
HO·,	Radical hidroxilo.
HPLC,	Cromatografía líquida de alta definición.

HTAe,	Hipertensión arterial esencial.
HWE,	Equilibrio Hardy-Weinberg.
IMC	Índice de masa corporal.
KDa,	Kilo dalton.
LD,	Desequilibrio de ligamiento.
LogEUA,	Logaritmo de la excreción urinaria de albúmina.
M, mM, μM,	Molar, milimolar, micromolar.
MAF,	Frecuencia del alelo minoritario.
mALB,	Microalbuminuria.
MDA,	Malondialdehído.
Min.,	Minutos.
MnSOD,	Proteína manganeso superóxido dismutasa, mitocondrial.
N,	Concentración normal.
NADP,	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
NADPH ,	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido.
NCF1,	Gen o proteína factor citosólico de neutrófilos 1 o p47phox.
NCF2,	Gen o proteína factor citosólico de neutrófilos 1 o p67phox.
NCF4,	Gen o proteína factor citosólico de neutrófilos 1 o p40phox.
NO,	Óxido nítrico.
O²⁻,	Radical superóxido.
OGG1,	Gen o proteína 8-oxoguanina ADN glicosilasa.
ONOO[·],	Radical peroxinitrito.
OR,	Odds ratio.
PAD,	Presión arterial diastólica.
PAS,	Presión arterial sistólica.
Pb,	Par de bases.
PCR,	Reacción en cadena de la polimerasa.
r.p.m.,	Revoluciones por minuto.
RAC1,	Gen o proteína pequeña de unión a GTP, rac1.
RAC2,	Gen o proteína pequeña de unión a GTP, rac2.
SD,	Desviación estándar.
SE,	Error estándar.
seg.,	Segundos.
SNP,	Polimorfismo de un solo nucleótido.
SOD1,	Gen de la proteína cobre-zinc superóxido dismutasa, citosólica.
SOD2,	Gen de la proteína manganeso superóxido dismutasa, mitocondrial.

SOD3,	Gen de la proteína cobre-zinc superóxido dismutasa, extracelular.
TBE,	Tris/EDTA/Borato.
TE,	Tris/EDTA.
TR1,	Proteína tiorredoxina reductasa 1, citosólica.
TR2,	Proteína tiorredoxina reductasa 2, mitocondrial.
Tris,	Tris(hidroximetil)aminometano.
TRX,	Proteína tiorredoxina, citosólica.
TRX2,	Proteína tiorredoxina 2, mitocondrial.
TXN,	Gen de la proteína tiorredoxina, citosólica.
TXN2	Gen de la proteína tiorredoxina 2, mitocondrial.
TXNRD1,	Gen de la proteína tiorredoxina reductasa 1, citosólica.
TXNRD2,	Gen de la proteína tiorredoxina reductasa 2, mitocondrial.
TXNRD3,	Gen de la proteína tiorredoxina reductasa 3, citosólica.
U,	Unidad.
UTR,	Región no traducida.
XDH	Gen de la proteína Xantina Oxidorreductasa.

Glosario

ADN polimerasa: Cualquier enzima que sea capaz de sintetizar nuevas cadenas de ADN a partir de un ADN patrón.

ADN: Ácido desoxirribonucleico, una cadena doble de nucleótidos unidos entre sí (en los que el componente azúcar es la desoxirribosa), que es la molécula fundamental en la transmisión de los genes.

ADNc o ADN complementario: ADN transcrito de una molécula de ARN por un enzima llamada transcriptasa inversa.

Alelo dominante: Alelo que expresa su efecto fenotípico aún cuando esté en heterocigosis con un alelo recesivo (ver este término). Es decir, si A es dominante sobre a , entonces AA y Aa tienen el mismo fenotipo.

Alelo recesivo: Alelo cuyo efecto fenotípico no se expresa en condición heterocigótica porque es ocultado por el alelo dominante.

Alelo: Una de las formas alternas de un gen que puede existir en un locus.

Base: Unidad química que caracteriza a un nucleótido. En el ADN, las bases son: adenina (A), guanina (G), timina (T) y citosina (C). Las bases del ARN son adenina, guanina, uracilo (U) y citosina.

Bases nitrogenadas: Moléculas que son componentes importantes de los ácidos nucleicos; están constituidas por una estructura de anillo que contiene nitrógeno. Los puentes de hidrógeno que unen las bases sirven de enlace a las dos cadenas de ADN para formar la doble hélice.

Cebador: Fragmento corto de ADN o de ARN hibridado con un ADN de cadena simple, y al cual pueden agregarse más nucleótidos mediante la polimerasa de ADN.

Codominancia: Es la situación en que un individuo heterocigótico exhibe el fenotipo de ambos alelos de un gen específico.

Deleción: Es una clase especial de variación genética en que se pierde parte del ADN de un cromosoma.

Desnaturalización: Es la separación de las dos cadenas de la doble hélice del ADN, o la ruptura severa de una molécula compleja sin que se destruyan los enlaces principales de sus cadenas.

Electroforesis: Técnica que separa los componentes de una mezcla de moléculas (proteínas, ADN, ARN) según su tamaño, como resultado de un campo eléctrico en un gel que sirve de soporte.

Fenotipo: Forma en que se manifiesta un carácter (o grupo de caracteres) en un individuo determinado; o la apariencia externa perceptible de un genotipo específico.

Frecuencia alélica: Es una medida de la presencia continua o asidua de un alelo en una población, o de la proporción que representa de todos los alelos de un gen.

Genotipo: Composición específica de alelos de toda la célula o, más comúnmente, de determinado gen o de un conjunto de genes.

Haplotipo: Constitución alélica específica de cierto número de loci en un bloque de ligamiento definido.

Herencia citoplasmática: Herencia de los genes encontrados en los organelos del citoplasma (los cloroplastos o las mitocondrias).

Herencia: Proceso en que se transmiten los rasgos genéticos de los progenitores a sus progenies.

Hibridación: En biología molecular, es la unión de secuencias complementarias de ADN y/o de ARN para formar una estructura de doble cadena.

Homólogo: Correspondiente o similar en estructura, posición u origen.

Inserción: Anormalidad cromosómica en la que se inserta una secuencia de ADN en un gen, lo que distorsiona la estructura y la función normal de ese gen.

Ligamiento genético: Es la medida de la desviación respecto de una asociación que se produciría al azar para dos alelos en 2 polimorfismos distintos. Se mide por D' , r^2 y LOD.

Ligasa: Tipo de enzima que puede unir de nuevo un enlace fosfo-diéster roto de un ácido nucleico.

Locus (pl. loci): Sitio específico de un cromosoma donde está localizado un gen o un trozo definido de ADN.

Marcador genético: Un alelo, una banda en un gel o un carácter que sirve experimentalmente como sonda para identificar a un individuo o alguna de sus características.

Nucleótido: Molécula compuesta por una base nitrogenada, un azúcar y un grupo de tipo fosfato. Los nucleótidos son los componentes elementales de los ácidos nucleicos.

Oligonucleótido: Segmento corto de ADN sintetizado artificialmente.

Par de bases: Las dos bases de nucleótidos que están situadas en diferente cadena de una molécula de ácido nucleico y que se mantienen unidas por enlaces de hidrógeno. Las bases pueden emparejarse de dos maneras: adenina con timina (en el ADN) o con uracilo (en el ARN), y guanina con citosina (en ADN y ARN).

Par de genes heterocigótico: Par de genes que tiene dos alelos diferentes en los dos cromosomas de un individuo diploide; por ejemplo, Aa o A1A2.

Par de genes homocigótico: Par de genes en que hay alelos idénticos en ambas copias del cromosoma; por ejemplo, AA o aa.

Patrón: Molécula que sirve como modelo para sintetizar otra molécula; por ejemplo, una molécula de ADN de cadena simple puede usarse como plantilla para sintetizar la cadena de nucleótidos complementaria.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. Método para amplificar una secuencia de ADN en grandes cantidades mediante una polimerasa estable al calor y con cebadores apropiados, los cuales dirigen la amplificación de la región del ADN que interesa.

Polimerasa: Término genérico para los enzimas que llevan a cabo la síntesis de un ácido nucleico, usando un patrón de ácido nucleico pre-existente y los nucleótidos apropiados (es decir, ribonucleótidos para el ARN y desoxirribonucleótidos para el ADN).

Polímero: Molécula compuesta por subunidades repetidas.

Polimorfismo: es una variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población.

Secuencia de ADN: Orden de las bases de los nucleótidos en la molécula de ADN.

Secuenciar: Determinar el orden de los nucleótidos en una molécula de ADN o de ARN, o el orden de los aminoácidos en una proteína.

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido. Polimorfismos que resultan de la sustitución de una sola base entre secuencias homólogas.

Tag-SNP: es un polimorfismo representativo de una región del genoma con un alto desequilibrio de ligamiento (la asociación no aleatoria de alelos en dos o más loci). Es posible identificar una variación genética sin genotipar todos los polimorfismos de una región cromosómica.

Transcripción: Es la síntesis del ARN complementario, usando una secuencia de ADN molde.

Transcriptasa inversa: Enzima que, cuando dispone de un cebador de ADN, cataliza la síntesis de una cadena de ADN complementaria a partir de un patrón de ARN.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Hipertensión arterial	3
1.1.1. Prevalencia	3
1.1.2. Definición y Clasificación	3
1.1.3. Microalbuminuria	7
1.2. Estrés Oxidativo	9
1.2.1. Concepto de Estrés Oxidativo y Radicales Libres	9
1.2.1.1. Tipos de Especies Reactivas	10
1.2.1.2. Efectos de los Radicales Libres	11
1.2.2. Sistemas Productores de Estrés Oxidativo	13
1.2.2.1. Xantina Oxidorreductasa	14
1.2.2.2. Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Oxidasa	14
1.2.3. Sistemas Protectores frente Estrés Oxidativo	16
1.2.3.1. Sistemas de Defensas Enzimáticas	16
1.2.3.2. Sistemas de Captadores de Especies Reactivas	17
1.2.3.2.1. Sistema Glutación	17
1.2.3.2.2. Sistema Tiorredoxina	19
1.2.3.2.3. Otras Sustancias Captadoras de Especies Reactivas	20
1.3. Estrés Oxidativo e Hipertensión	21
1.4. Regulación Genética de Estrés Oxidativo en Hipertensión	24
1.5. Enfermedades Complejas - Partida del Estudio Genético de la Hipertensión y Daño Renal Asociado	25
2. Hipótesis	31
3. Objetivos	32
4. Metodología	35
4.1. Diseño de la Tesis	35
4.1.1. Población Control	35
4.1.2. Población Hipertensa	36
4.1.3. Población General de Valladolid / Estudio Hortega	37
4.2. Evaluación Clínica y Medidas Bioquímicas	38
4.3. Determinación de Parámetros de Estrés Oxidativo	40
4.3.1. Determinación de Glutación Reducido, Glutación Oxidado y Malondialdehído	40
4.3.2. Determinación de 8-Hidroxi 2-Desoxiguanosina	41
4.4. Estudio de niveles de ARNm mediante RT-PCR en Tiempo Real	42

4.4.1.	Aislamiento de Células Mononucleares y Extracción de ARNm.	42
4.4.2.	Análisis Cualitativo del ARNm.	42
4.4.3.	Cuantificación de los Niveles de ARNm por RT-PCR Cuantitativo en Tiempo Real	43
4.4.3.1.	Transcripción Reversa.	43
4.4.3.2.	Preparación de Estándares.	43
4.4.3.3.	PCR Cuantitativo en Tiempo Real.	45
4.5.	Estudio de Polimorfismos.	49
4.5.1.	Extracción de ADN a partir de Sangre Periférica.	49
4.5.2.	Selección de Variantes Genéticas de Estudio.	49
4.5.3.	Método de Genotipado: SNPlex.	51
4.5.3.1.	Preparación de ADN Genómico.	51
4.5.3.2.	Activación de los Oligonucleótidos y Ensayo de Ligación de Oligonucleótidos.	52
4.5.3.3.	Purificación de los Productos de la Ligación por Digestión con Exonucleasas.	54
4.5.3.4.	Amplificación de los Productos Purificados de la Reacción de la Ligación.	54
4.5.3.5.	Captura de los Amplicones Biotinilados.	55
4.5.3.6.	Hibridación de las Sondas ZipChute™ a las Secuencias ZipCode™.	55
4.5.3.7.	Electroforesis Capilar de las Sondas Zipchutes y Análisis de los Resultados.	56
4.6.	Análisis Estadísticos de los Datos.	57
4.6.1.	Estadística Descriptiva.	57
4.6.2.	Test No Paramétricos.	57
4.6.2.1.	Chi-Cuadrado y equilibrio de Hardy –Weinberg.	57
4.6.3.	Estudio de Asociación y Análisis de Haplotipos.	58
4.6.3.1.	Análisis de Regresión logística.	59
4.6.3.2.	Análisis de Haplotipos.	59
4.6.3.2.1.	Desequilibrio de Ligamiento y Haplotipos.	59
4.6.3.2.2.	Análisis de Asociación de Haplotipos.	60
4.6.3.3.	Evaluación de Falsos Positivos: “False Positive Report Probability”	60
4.6.4.	Interacción Gen-Gen: MDR.	60
4.7.	Búsqueda Fuentes de Información.	61
4.8.	Justificación Ética del Estudio.	61
5.	Resultados.	65
5.1	Estudio de Niveles de Estrés Oxidativo en Hipertensión.	65
5.1.1	Características Generales de la Población de Estudio.	65
5.1.2	Asociación de Parámetros de Estrés Oxidativo en Hipertensión.	66
5.1.3	Relación entre los Parámetros de Estrés Oxidativo en Hipertensión.	68
5.1.4	Asociación de Parámetros Estrés Oxidativo y Microalbuminuria.	69

5.1.5	Interacción entre Presión Arterial y Estrés Oxidativo en Presencia de Microalbuminuria.....	70
5.2	Estudio de Niveles de ARNm de Genes Implicados en Estrés Oxidativo.....	71
5.2.1	Características Generales de la Población de Estudio.....	71
5.2.2	Asociación de Niveles de ARNm de Genes de Estrés oxidativo e Hipertensión.....	71
5.2.2.1	Sistemas Productores de Estrés Oxidativo.....	71
5.2.2.2	Sistemas Protectores frente Estrés Oxidativo.....	72
5.2.2.2.1	Sistema Glutación.....	73
5.2.2.2.2	Sistema Tiorredoxina.....	74
5.2.3	Asociación de Niveles de ARNm y Microalbuminuria.....	75
5.2.4	Relación entre los Niveles de ARNm en Hipertensión.....	76
5.2.5	Interacción entre Niveles de ARNm y Parámetros de Estrés Oxidativo.....	76
5.2.6	Sumario de Resultados del Estudio de Niveles de ARNm de Genes Implicados en Estrés Oxidativo.....	77
5.3	Estudio de Polimorfismos Implicados en Estrés Oxidativo.....	78
5.3.1	Población Hipertensa.....	78
5.3.1.1	Características Generales de la Población de Estudio.....	78
5.3.1.2	Asociación de Polimorfismos con Valores de Presión Arterial.....	79
5.3.1.2.1	Análisis de Asociación de los Polimorfismos de Forma Individual.....	79
5.3.1.2.2	Análisis de Asociación de los Haplotipos Obtenidos.....	80
5.3.1.2.3	Interacción Gen-Gen en Hipertensión.....	82
5.3.1.3	Asociación de Polimorfismos con Valores de Microalbúmina y Riesgo de Microalbuminuria.....	82
5.3.1.4	Asociación de Polimorfismos con Marcadores de Estrés Oxidativo y Niveles de ARNm.....	85
5.3.2	Población General de Valladolid.....	86
5.3.2.1	Características Generales de la Población de Estudio.....	86
5.3.2.2	Asociación de Valores de Presión Arterial y Riesgo de Hipertensión.....	87
5.3.2.2.1	Análisis de Asociación de los Polimorfismos de Forma Individual.....	87
5.3.2.2.2	Análisis de Asociación de los Haplotipos Obtenidos.....	87
5.3.2.2.3	Interacción Gen-Gen en Hipertensión.....	88
5.3.2.3	Asociación de Valores de Microalbúmina y Riesgo de Microalbuminuria.....	89

5.3.2.3.1	Análisis de Asociación de los Polimorfismos de Forma Individual.....	89
5.3.2.3.2	Análisis de Asociación de los Haplotipos Obtenidos.....	89
5.3.2.3.3	Interacción Gen-Gen en Microalbuminuria.....	90
5.3.3	Evaluación de Falsos Positivos: “ <i>False Positive Report Probability</i> ”.....	91
5.3.4	Sumario de Resultados del Estudio de Asociación de Polimorfismos de Genes Implicados en Estrés Oxidativo.....	92
6.	Discusión	95
6.1	Discusión de Métodos	95
4.8.1.	Evaluación del Diseño.....	95
4.8.2.	Metodología Empleada.....	96
6.2	Discusión de los Resultados.....	101
6.2.1	Estudio de Niveles de Estrés Oxidativo en Hipertensión.....	101
6.2.2	Estudio de Niveles de ARNm de Genes Implicados en Estrés Oxidativo	103
6.2.3	Estudio de Polimorfismos Implicados en Estrés Oxidativo	107
6.2.3.1	Sistemas Productores de Estrés Oxidativo	107
6.2.3.2	Sistemas Protectores frente Estrés Oxidativo.....	112
6.2.3.3	Interacción entre los Sistemas	117
6.3	Limites y Otras Consideraciones	118
6.4	Resumen y Visión de Futuro	119
7.	Conclusiones.	123
8.	Bibliografía.	127
9.	Anexos	149
	Anexo 1. Características de los Polimorfismos Seleccionados en el Estudio.....	149
	Anexo 2. Verificación de la Reacción de PCR en Tiempo Real.....	151
	Anexo 3. Correlaciones entre los Marcadores de Estrés Oxidativo y los Niveles de ARNm	152

Introducción

1. Introducción

1.1. Hipertensión Arterial

1.1.1. Prevalencia

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la hipertensión (HTA) es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad cardiovascular humana y en el 90% de los casos se desconoce el mecanismo que la inicia (Ezzati *et al.*, 2002). La denominada HTA esencial constituye la enfermedad crónica más frecuente en la sociedad moderna y es también uno de los factores de riesgo cardiovascular primario (Carranza *et al.*, 1995). Recientemente se ha considerado la HTA esencial como un síndrome de anomalías metabólicas y estructurales (genéticas y adquiridas). Dentro de las alteraciones metabólicas han surgido evidencias que indican que las especies reactivas derivadas del oxígeno (EROs) juegan un papel fisiopatológico preponderante en el desarrollo de la hipertensión (Touyz *et al.*, 2005).

Las tasas de prevalencia de HTA encontradas en las diferentes regiones del mundo son muy distintas, así se ha descrito una prevalencia que varía desde el 6% en la India rural (3% en los varones y 7% en las mujeres) a la registrada en Polonia (69% en los varones y 73% en las mujeres) (Kearney *et al.*, 2004). Algunas estimaciones realizadas en el año 2000 situaban la prevalencia de la HTA en el 26% de la población adulta mundial (Kearney *et al.*, 2005). En concreto, en la población general adulta de España la prevalencia de la HTA es aproximadamente de un 35%, llegando al 40% en edades medias y a más del 68% en los mayores de 60 años (Banegas *et al.*, 1998; Banegas *et al.*, 2002).

En consecuencia podemos decir que la prevalencia aumenta con la edad, pero también viene modificada por el origen étnico, por el nivel socioeconómico y el género. En individuos jóvenes y de edad media se ha observado una prevalencia mayor en varones que en mujeres (Liga española para la lucha contra la hipertensión arterial. Sociedad española de hipertensión, 1996; Muniz y Juane, 1995).

1.1.2. Definición y Clasificación

La HTA, considerada como un trastorno de la homeostasis cardiovascular, se define como la elevación mantenida de la presión arterial (PA) por encima de los límites normales.

Tanto el Séptimo Informe del Joint National Committee (JNCVII, 2003) como el Informe de la OMS del mismo año consideran como límites de hipertensión *una PA Sistólica (PAS) de 140 mmHg ó superior y/o una PA diastólica (PAD) de 90 mmHg ó superior, en personas no tratadas con fármacos antihipertensivos.*

Recientemente en la Guía de 2007 para el manejo de la HTA se ha publicado la nueva clasificación de hipertensión arterial en función de las cifras de PA (Tabla 1.1) (Mancia *et al.*, 2007). Prácticamente mantiene la clasificación presentada en la guía de 2003 de la ESH/ESC, excepto en que en esta última no se incorpora el término “prehipertensión” (JNCVII, 2003) por la carga de ansiedad que puede representar. Sin embargo, a lo largo del texto se destaca en repetidas ocasiones que la PA normal-alta (130-139/85-89 mmHg) comporta un mayor riesgo CV que hace necesario, en algunas situaciones, el tratamiento con fármacos antihipertensivos.

Tabla 1.1. Definiciones y clasificación de las cifras de presión arterial (PA) (mm Hg).

Categoría	Sistólica		Diastólica
Óptima	<120	y	<80
Normal	120 - 129	y/o	80 - 84
Normal – Alta	130 - 139	y/o	85 – 89
Hipertensión grado 1	140 - 159	y/o	90 – 99
Hipertensión grado 2	160 - 179	y/o	100 -109
Hipertensión grado 3	≥180	y/o	≥110
Hipertensión sistólica aislada	≥140	y	<90

La hipertensión sistólica aislada debe clasificarse en grados (1, 2, 3) según cifras de presión arterial sistólica en los rangos indicados, siempre que las cifras de diastolita sean < 90 mmHg. Los grados 1, 2 y 3 se corresponden con la clasificación en hipertensión ligera, moderada y grave.

Sin embargo, ya que el diagnóstico de un individuo como hipertenso se basa en clasificaciones que determinan los límites entre normalidad y enfermedad de manera arbitraria, es imprescindible la evaluación individualizada en función del perfil de riesgo cardiovascular de cada paciente; sólo entonces será adecuado establecer la estrategia de control y tratamiento.

En la Tabla 1.2 figuran las variables clínicas que con más frecuencia deben utilizarse para estratificar el riesgo cardiovascular. Básicamente, se trata de factores de riesgo (demográficos, antropométricos, historia familiar de enfermedad cardiovascular precoz, presión arterial, hábito tabáquico, glucosa y lípidos), datos de afectación de órganos diana y diagnóstico de diabetes o de condiciones clínicas asociadas, como se señaló en las guías del 2003 (JNCVIII, 2003).

Tabla 1.2: Factores que influyen en el pronóstico de la HTA.

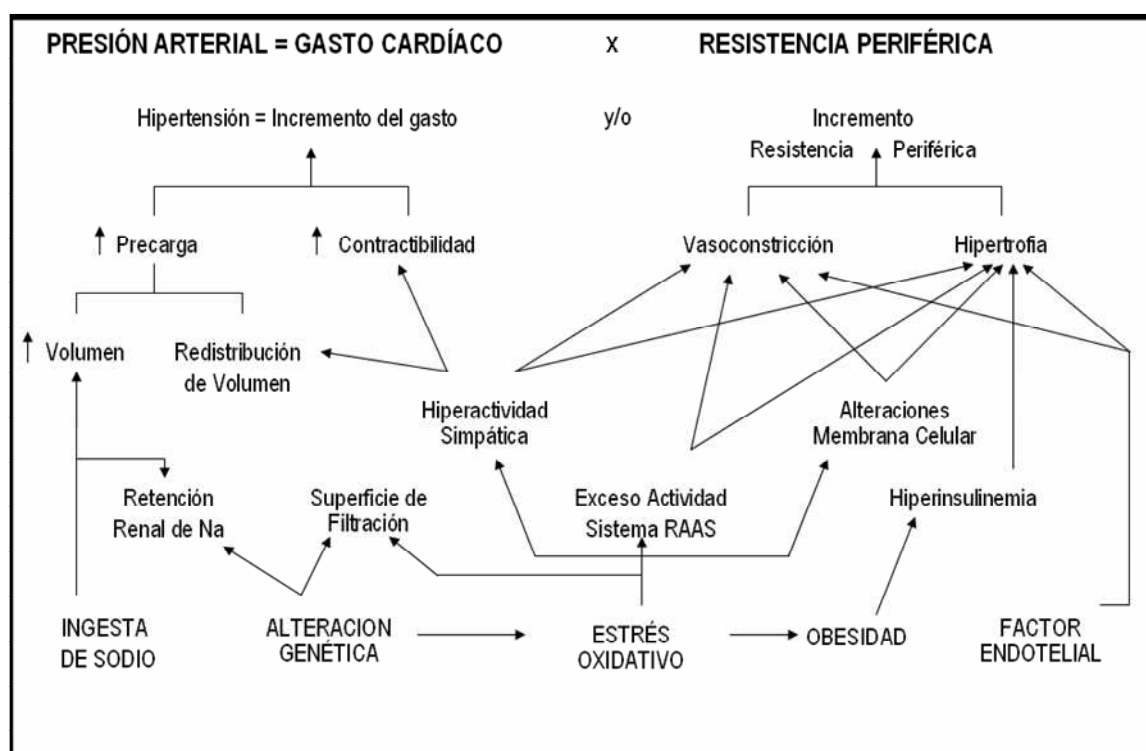
Factores de riesgo	Daño orgánico subclínico
Cifras de presión arterial (PA) sistólica y diastólica Presión de pulso (en el anciano) Edad (Varones >55, Mujeres >65 años) Tabaquismo Dislipemias: <ul style="list-style-type: none"> - Colesterol total > 190 mg/dL - LDL-Colesterol > 115 mg/dL - HDL-Colesterol < 46 mg/dL - Triglicéridos > 150 mg/dL Glucemia basal alterada : 102-125 mg/dL. Test de tolerancia oral a la glucosa alterado Obesidad abdominal: Perímetro cintura (Varones >102 cm, Mujeres > 88 cm). Historia familiar de enfermedad cardiovascular precoz (Varones antes de los 55 años, Mujeres antes de los 65 años)	- Hipertrofia ventricular izquierda: <ul style="list-style-type: none"> - ECG: Sokolow-Lion >38 mm; Cornell > 2440 mm*ms - Ecografía (*): IMVI \geq 125 g/m² (V); \geq 110 g/m² (M); - Placas de ateroma o engrosamiento de la pared cardíaca (IMT > 0.9 mm) - Índice tobillo-brazo < 0.9. - Aumento ligero de la creatinina plasmática: <ul style="list-style-type: none"> - Varones: 1.3-1.5 mg/dL. - Mujeres: 1.2 - 1.4 mg/dL - Disminución de la tasa de filtrado glomerular estimada (**) (< 60 ml/min/1.73 m ²) o del aclaramiento de creatinina (***) (<60 ml/min). - Microalbuminuria (30-300 mg/24 horas) o aumento del cociente albúmina/creatinina: \geq 22 (V); \geq 31 (M) mg/ g.creatinina
Diabetes Mellitus	Enfermedad cardiovascular o renal establecida
Glucosa plasmática en ayunas \geq 126 mg/dL en más de una determinación. Glucosa tras sobrecarga oral \geq 198 mg/dL	- Cerebrovascular: ictus isquémico, hemorragia cerebral, ataque isquémico transitorio. - Cardíaca: infarto de miocardio, angina, revascularización coronaria, insuficiencia cardíaca. - Renal: neuropatía diabética, proteinuria (> 300 mg/24 horas), insuficiencia renal (creatinina >1.5 mg/dL (V); >1.4 mg/dL (M)). - Enfermedad arterial periférica. - Retinopatía avanzada: hemorragias o exudados, edema de papila.
Nota: El Síndrome Metabólico se define como la presencia de tres o más de cinco criterios siguientes: Obesidad abdominal, glucemia basal alterada, PA >130/85 mm Hg, descenso de HDL-Colesterol o aumento de Triglicéridos (como se han definido anteriormente). V: Varones, M: Mujeres; IMT: Grosor Intima Media; **: Fórmula MDRD; ***: Fórmula Crockroft-Gault.	

Desde el punto de vista etiopatogénico, también, podemos clasificar la HTA en dos grandes grupos: hipertensión esencial, que engloba el 90-95% de todos los pacientes, y en la que no se llega a encontrar una causa, y la denominada HTA secundaria, que representa el 5-10% y en la que sí podemos determinarla: ingesta de fármacos, enfermedades endocrinas, renales, vasculares, etc. También es conocido que a menor edad, mayor probabilidad de que la HTA sea secundaria.

La presión que la sangre ejerce desde el interior sobre la pared arterial depende de dos fenómenos físicos: la fuerza del bombeo del corazón (gasto cardíaco) y el calibre de las arterias (resistencia periférica) (RP). Estos dos

factores primarios, están a su vez influidos por la interacción de una compleja serie de factores fisiopatológicos, tal y como se aprecia en la Figura 1.1, que van a dar como resultado fundamental un engrosamiento estructural de la pared de los vasos y/o una vasoconstricción funcional de los mismos. El mecanismo íntimo de esta interacción, aún permanece sin estar suficientemente claro.

Figura 1.1: Factores implicados en la regulación de la presión arterial.



Además, se calcula que entre el 60-70% de la HTA esencial puede deberse a factores genéticos, siendo el 30-40% restante resultado de influencias ambientales (Ward., 1990; Harrap, 1994).

Actualmente se intentan identificar marcadores bioquímicos o fisiológicos que tengan relación con determinadas secuencias de ADN y así permitir la identificación de genes específicos de HTA. La Kalicreína urinaria, el cotransporte sodio-litio y sodio-calcio, la concentración de sodio intracelular o los distintos componentes del sistema renina-angiotensina-aldosterona podrían ser algunos de ellos aunque el mecanismo hereditario no es atribuible a un solo locus sino a varios factores. Éstos incluirían: herencia poligénica, heterogenicidad genética, interacción entre genes, interacción genes-factores ambientales y expresión de los genes tiempo-dependientes. Como ejemplo, se ha demostrado que la elevación de los niveles de fibronectina por encima de 40 mg/dl medidos en la semana 24 de gestación, podría convertirse en un marcador de preeclampsia, con una sensibilidad del 75% y una especificidad del 92% (Aydin *et al.*, 2006). Existe también evidencias genéticas del efecto dañino que muestra el polimorfismo M235T del gen AGT sobre los niveles de angiotensina, PA, y consecuentemente sobre el incremento del riesgo de HTA (Takakura *et al.*, 2006). Recientes avances en farmacogenética estudian mediante nuevas líneas de investigación la predicción de

la respuesta a una terapia por parte del paciente, con lo cual se evitarían fracasos terapéuticos motivados por la susceptibilidad personal y la variabilidad interindividual (Kurland *et al.*, 2005).

Por otra parte, los factores ambientales pueden llegar a ser tan precoces, que incluyen la etapa fetal del individuo. Es conocida la relación entre bajo peso al nacer con el desarrollo de HTA posterior. Este hallazgo parece ser debido a una disminución permanente de nefronas (Law *et al.*, 1993), o a una alteración de la síntesis de elastina en las paredes de las grandes arterias en la etapa fetal, que favorecerían la HTA en la edad adulta (Martyn y Greenwald, 1997).

1.1.3. Microalbuminuria

Se considera microalbuminuria (mALB) al aumento de la excreción urinaria de albúmina (EUA), en ausencia de proteinuria, no detectada por métodos convencionales de laboratorio. La albúmina es una proteína cargada negativamente, que se filtra en pequeña cantidad en el glomérulo y que en condiciones normales aparece en orina en concentración inferior a 20 mg/día, gracias a su reabsorción tubular.

Inicialmente, la mALB fue reconocida como un marcador de riesgo cardiovascular y/o renal en pacientes con diabetes mellitus. Sin embargo, diversos estudios han demostrado su valor pronóstico para mortalidad o para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares en población no diabética (Jager *et al.*, 1999; Roest *et al.*, 2001; Gerstein *et al.*, 2001; Yudkin *et al.*, 1988). Del mismo modo los pacientes con microalbuminuria tienen un mayor riesgo de progresar a proteinuria abierta y al deterioro de la función renal por el desarrollo de nefroangiosclerosis (Bigazzi *et al.*, 1998).

En la actualidad se ha convertido en un elemento básico de la evaluación y seguimiento de los sujetos hipertensos, según las recomendaciones de dos guías publicadas recientemente, el VII Informe del Joint Nacional Comité y el conjunto de las Sociedades Europeas de Hipertensión y Cardiología.

La hipertensión contribuye a la enfermedad renal al incrementar la presión capilar glomerular, proteinuria, disfunción endotelial, esclerosis y provocando daños sobre la nefrona (Sowers, 2003). Las interacciones entre la hipertensión y la enfermedad renal son complejas ya que también las nefropatías contribuyen al desarrollo y la gravedad de la HTA, mientras que la PA elevada acelera el curso de la nefropatía.

Bajo condiciones normales, mecanismos autoregulados protegen la microvascularidad de la célula de los efectos del aumento de PA. Sin embargo, cuando estos mecanismos se deterioran, como en la HTA o la diabetes mellitus, el riñón puede comenzar a sufrir daños. Esta continua desregulación agrava aún más los efectos inducidos por la PA, lo que contribuye al desarrollo de la proteinuria y el progreso de la insuficiencia renal (Cooper *et al.*, 1998; Cooper, 2001). Además, la angiotensina II (Ang II) también contribuye en la enfermedad renal por medio de mecanismos no hemodinámicos. Estos mecanismos pueden activar la liberación de mediadores de estrés oxidativo, inflamación y otros factores de crecimiento que estimulan la acumulación de matriz extracelular, proliferación celular e hipertrofia (Long *et al.*, 2004, Cooper, 2001; Ketteler *et al.*, 1995).

Diversos estudios han evaluado el papel de los factores genéticos en el desarrollo de microalbuminuria, indicando que el sustrato genético podría determinar el riesgo de desarrollar microalbuminuria (Pontremoli *et al.*, 1996; Yudkin *et al.*, 1997; Fernández-Llama *et al.*, 1998). La asociación familiar de microalbuminuria ha sido señalada en algún estudio, aunque su escaso poder estadístico no permitió obtener excesivas conclusiones. Los estudios en general han abordado la posible relación desde la perspectiva de analizar la influencia de potenciales genes candidatos, basada su selección en mecanismos fisiopatológicos conocidos de antemano. En consecuencia, se ha postulado que el desarrollo de microalbuminuria en la hipertensión tiene un componente genético. Por ejemplo, el alelo D del polimorfismo I/D del gen de la Enzima Convertidora de Angiotensinogeno (ECA) se ha asociado con incrementos en los niveles de EUA y con una alta prevalencia de microalbuminuria y también con nefroangioesclerosis entre los sujetos hipertensos (The Gisen Group, 1997; Ljungman, 1990; Nosadini *et al.*, 1991). No obstante, este componente genético puede ser el resultado de la interacción de varios genes, ya que se han asociado otros genes candidatos con la prevalencia de microalbuminuria, pero de resultados controvertidos.

1.2. Estrés Oxidativo

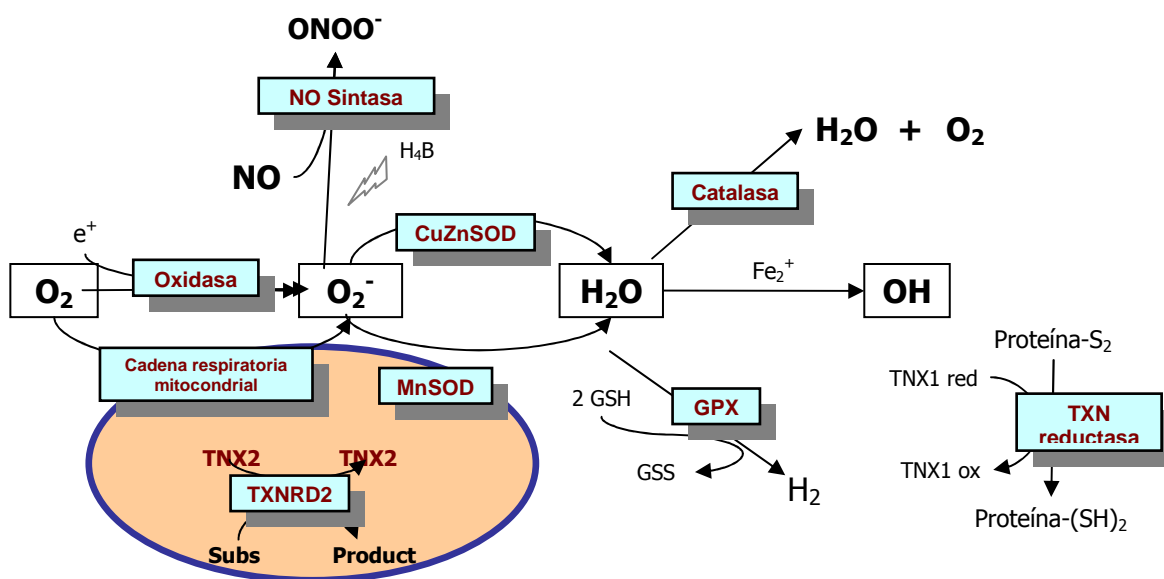
1.2.1. Concepto de Estrés Oxidativo y Radicales Libres

Estrés oxidativo (EO) es un término ampliamente utilizado que hace referencia a un desequilibrio entre la generación de especies prooxidantes y la eliminación de las mismas, mediante sistemas antioxidantes. Dicho equilibrio se encuentra desplazado hacia la generación de especies prooxidantes, bien por el aumento de la producción de estas especies o por la disminución en los efectos protectores de los sistemas antioxidantes.

Definimos radical libre a aquella especie química que tiene uno o más electrones desapareados en su última capa. Esta característica le proporciona una gran capacidad de reaccionar con la mayoría de biomoléculas.

En la figura 1.2 se observa la maquinaria necesaria para la detoxificación de las especies reactivas del oxígeno (EROs) en las células eucariotas. En los apartados siguientes, se detallará cada enzima implicada tanto en la producción como en la protección frente EO.

Figura 1.2: Proceso de reducción monovalente del oxígeno, por mecanismo antioxidantes en la célula.



O_2 : Oxígeno; $O_2^{\cdot -}$: Radical superóxido; H_2O_2 : Peróxido de hidrógeno; OH : Radical hidroxilo; NO : Óxido nítrico; H_4B : Tetrahydrobiopterina; MnSOD: Manganeso superóxido dismutasa; CuZnSOD: Cobre-Zinc superóxido dismutasa; GPX: Glutatión Peroxidasa; TXN: tiorredoxina; e^+ : electrón; $ONOO^-$: anión peroxinitrilo; GSH: glutatión reducido; GSSG: Glutatión oxidado.

1.2.1.1 Tipos de Especies Reactivas

Radical superóxido (O_2^-): Es el radical más abundante a pH fisiológico (Behar *et al.*, 1979). En el metabolismo aerobio el 1-2% del consumo total de oxígeno da lugar a la formación de anión superóxido. Es inestable y puede iniciar reacciones que den lugar a otros intermediarios, a su vez muy reactivos. Tiene una vida media de algunos milisegundos y experimenta reacciones de dismutación, donde a partir de dos radicales superóxido se produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno (Grisham *et al.*, 1999).

Se forma como producto de muchas reacciones catalizadas enzimáticamente, como en las reacciones de las deshidrogenasas flavoproteínicas: xantina oxidoreductasa, aldehído oxidasa, purina oxidasa, etc. (Koryka-Dahi y Richardson, 1981), o en la cadena respiratoria mitocondrial (Boveris *et al.*, 1972).

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2): No es un radical libre, pero su toxicidad es importante. Atraviesa con facilidad las membranas celulares. Es un producto estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición.

Muchas enzimas producen H_2O_2 a partir de oxígeno: superóxido dismutasa, glucosa oxidasa, etc. (Fridovich, 1986; Romero y Cadenas, 1987). También puede producirse por reacciones químicas, como la autooxidación del ácido ascórbico catalizada por el cobre (Koryka-Dahl y Richardson, 1981). La enzima catalasa es la encargada de eliminar esta especie reactiva, liberando agua en el proceso.

Además, existen evidencias que muestran que el H_2O_2 está implicado en la regulación de la transducción de señales y expresión de diversos genes a través de los factores de transcripción, NF κ B1 y AP-1. Ambos factores de transcripción son capaces de inducir la transcripción de genes tales como la interleuquina 2, el factor de necrosis tumoral α (TNF α), antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad y c-fos (Schreck *et al.*, 1992; Baeuerle y Henkel, 1994; Sen y Packer, 1996).

Radical hidroxilo ($HO\cdot$): Es la especie química más reactiva que se conoce y por tanto más tóxicas. Tiene una vida media estimada de alrededor de 10^{-9} segundos (Liochev y Fridovich, 1994).

Puede formarse *in vivo* a consecuencia de radiación de alta energía (rayos X, rayos γ) que puede provocar la rotura homolítica del agua corporal. La luz UV no tiene suficiente energía como para escindir una molécula de agua, pero puede dividir el peróxido de hidrógeno en dos moléculas de radical hidroxilo.

Óxido nítrico (NO): El óxido nítrico tiene una gran importancia por su función fisiológica, además de ser considerado un intermediario tóxico importante por su condición de radical libre.

El NO juega un papel fundamental en numerosos procesos fisiológicos. Actúa como regulador del flujo sanguíneo local, inhibe el crecimiento, la inflamación y la agregación plaquetaria.

En numerosos estudios realizados en diferentes lechos vasculares, se ha confirmado la pérdida de vasodilatación dependiente de endotelio en la patología de la hipertensión (Park *et al.*, 2001; Schiffrin *et al.*, 2000). Además esta reducción de la vasodilatación se ha relacionado con la disminución de la biodisponibilidad de NO. Ésta

puede deberse a una reducida expresión y/o actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS), enzima que cataliza la conversión de L-arginina a L-citrulina dando como subproducto NO en numerosos tipos celulares (Moncada *et al.*, 1991; Bush *et al.*, 1992), o a un mayor consumo de NO por parte de otras EROs como el anión superóxido.

La expresión de NOS está regulada por una serie de metabolitos. Se ha comprobado la existencia de varios factores que disminuyen la expresión de la NOS, entre los cuales se incluye el TNF α , el cual desestabiliza el ARNm del gen (Nishida *et al.*, 1992). Otros estímulos que han sido reportados como reductores de la estabilidad del ARNm incluyen lipopolisacáridos, hipoxia y altas concentraciones de moléculas de LDL oxidadas (Lu *et al.*, 1996; McQuillan *et al.*, 1994; Liao *et al.*, 1995). Todos estos factores están relacionados con la hipertensión, por lo cual se puede deducir que la alteración de la síntesis de NO participa en la fisiopatología de ésta.

Por otra parte, cuando se produce un exceso de oxidantes, la NOS puede generar peroxinitritos en lugar NO. Este proceso se denomina desacoplamiento de la oxidación de NADPH en la síntesis de NO (Koppenol *et al.*, 1992) y se produce fundamentalmente por la disminución de uno de los cofactores de la enzima, como la tetrahidrobiopterina (BH4), o/y de su sustrato, L-arginina. Como consecuencia, se obtiene un aumento de EO y del deterioro de la función endotelial y vascular (Landmesser *et al.*, 2003).

Peroxinitrito (ONOO⁻): No es un radical, pero sí un intermediario oxidante que puede protonarse y descomponerse con facilidad de modo que es altamente reactivo (Lipton *et al.*, 1993). Es capaz de inducir la peroxidación lipídica en lipoproteínas, interferir con la señalización celular por nitración de residuos tirosina, oxidar grupos tioles y guanosinas, degradar carbohidratos y fragmentar el ADN, por lo que es un importante mediador en el proceso aterogénico (Beckman *et al.*, 1994; Beckman y Koppenol, 1996).

1.2.1.2 Efectos de los Radicales Libres

La acción de los radicales libres viene determinada, por una parte, por su reactividad química, y por otra parte, por la disponibilidad de un sustrato susceptible en la proximidad donde se produce el radical libre. La acumulación de compuestos alterados por el resultado de la reacción del radical libre es a menudo la explicación de efectos a largo plazo, los cuales son difícilmente demostrables como relación causa-efecto de la reacción de los radicales libres, pero las reacciones de los radicales libres provocan unos productos cuyo efecto es acumulativo.

La oxidación se produce a nivel de las cuatro biomoléculas principales: lípidos, glúcidos, ácidos nucleicos y proteínas. Los radicales libres pueden reaccionar con estas biomoléculas y son capaces de oxidarlas causando pérdida de su función, acumulación de moléculas oxidadas, mutaciones, etc.

Dada la importancia del daño que el aumento de los radicales libres puede producir en las células, en los últimos años se ha intentado encontrar índices que permitan medir el EO. Entre los indicadores propuestos, los más relevantes son el cociente glutatión oxidado/ glutatión reducido (GSSG/GSH) como indicador de daño oxidativo en el

citosol, el malondialdehído como indicador de daño a los lípidos, el 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-oxo-dG) que es un índice de daño oxidativo en el ADN (Hageman *et al.*, 1992).

Daño oxidativo a proteínas: Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres, sobre todo por el radical hidroxilo (Stadtman, 2006). Dentro de los aminoácidos fisiológicos, la tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína son los que más procesos oxidativos sufren (Davies, 1987). Esta oxidación puede dar lugar a un cambio conformacional de la proteína y, por tanto, a una pérdida o modificación de su función biológica. En condiciones anaeróbicas, los radicales libres promueven un entrecruzamiento considerable entre proteínas, mientras que en presencia de oxígeno los radicales libres provocan una gran fragmentación de la cadena peptídica (Stadtman, 2006).

En los procesos de daño oxidativo a proteínas, algunos aminoácidos como lisina, prolina y arginina, se oxidan dando lugar a grupos carbonilo, de modo que el contenido en carbonilos de las proteínas se puede emplear como un indicador de daño oxidativo a las mismas (Stadtman, 2006).

El daño oxidativo suele ser irreversible y puede conducir a la desnaturalización de la proteína. Se ha propuesto que la oxidación de enzimas mediada por radicales libres es un paso de marcaje dentro del recambio proteico (Stadtman, 2006).

Daño oxidativo a los lípidos: La acción de los radicales libres de oxígeno sobre los lípidos tiene lugar fundamentalmente sobre los ácidos grasos poliinsaturados (Alexander-North *et al.*, 1994), provocando su peroxidación. El resultado de esta peroxidación es la pérdida de la flexibilidad y de las funciones secretoras, así como la ruptura de los gradientes iónicos transmembrana.

El proceso de peroxidación lipídica, comienza cuando un radical libre oxida a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, se desprende un átomo de hidrógeno, y se forma un radical alquílico (Frei, 1994). Este radical centrado en un átomo de carbono reacciona con el O₂ y forma un radical peróxido. Los radicales peróxido pueden reaccionar con cadenas laterales de otros ácidos grasos poliinsaturados adyacentes, con lo que se propaga la reacción en cadena radicalaria (Halliwell, 1994).

De esta manera, un solo ataque por un radical libre da lugar a la formación de un gran número de productos de oxidación, sobre todo aldehídos como malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal e hidrocarburos de cadena corta como etano y pentano (Halliwell, 1994). Muchos de los aldehídos formados reaccionan rápidamente con los componentes celulares, con lo que causan mutaciones en el ADN, y producen daños estructurales y funcionales al reaccionar con proteínas (Frei, 1994).

La peroxidación lipídica se considera como un factor muy importante en el envejecimiento de células aeróbicas (Lippman, 1985).

Daño oxidativo a los glúcidos: Los radicales libres atacan a los glúcidos de distintas formas. Los monos y disacáridos resisten a la acción de las EROs. La glucosa constituye un captador del radical superóxido al retenerlo e

impedir su acción sobre otras moléculas. La manosa y el manitol son capaces de eliminar el radical hidroxilo. Por ello, se ha observado que diversos polisacáridos actúan como agentes protectores celulares (Albertini *et al.*, 1996).

Sin embargo, los polisacáridos son despolimerizados por los radicales libres. Esta acción provoca la pérdida de la función estructural de los mismos y da lugar a procesos degenerativos (Borel *et al.*, 1998).

Daño oxidativo al ADN: Los ácidos nucleicos también son susceptibles de sufrir los efectos de estrés oxidativo en todos sus componentes. Se sabe que el oxígeno es capaz de adicionarse a las bases nitrogenadas del ADN formándose el radical peroxil. Las posteriores reacciones de estas especies radicalarias en el ADN dan lugar a un gran número de productos. El número de bases modificadas diferentes encontradas en el ADN tras un ataque oxidativo supera la veintena. La alteración más frecuente que se observa es la oxidación de la base guanosa, produciendo 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina. Su importancia reside en su poder mutagénico ya que durante la replicación producirá transversiones del nucleótido timina por citosina (Shibutani *et al.*, 1992). En consecuencia, cuando tiene lugar la replicación del ADN dañado, o cuando un ADN dañado se repara de manera incorrecta, se origina una mutación (Halliwell y Auroma, 1991; Breen y Murphy, 1995). Por ello las lesiones oxidativas al ADN parecen estar implicadas no sólo en el envejecimiento celular, sino también en la patogénesis de las enfermedades asociadas a la edad avanzada y cáncer. El ADN dañado es reparado por enzimas que cortan la parte afectada y ésta es excretada por la orina (Ames *et al.*, 1981). Puesto que las enzimas reparadoras no llegan a eliminar todas las lesiones, éstas se acumulan y aumentan con la edad (Ames *et al.*, 1981).

Daño oxidativo en el citosol: El glutatión es un tripéptido que desempeña diversas funciones metabólicas de gran importancia, sobre todo relacionadas con la protección antioxidante de las células. El grupo activo es el sulfhidrilo del residuo de cisteína, por lo que el glutatión puede ejercer su papel protector cuando se presenta en su forma reducida (GSH). Dos moléculas de GSH pueden oxidarse cediendo un electrón cada una y combinándose entre sí dando lugar la forma oxidada (GSSG). Por ello, un indicador característico de estrés oxidativo es el aumento de la concentración de glutatión oxidado con la consiguiente alteración del estado redox del glutatión, aumentando el cociente GSSG/GSH (Sies, 1986) y disminuyendo el glutatión total ($2 \text{ GSSG} + \text{GSH}$) en situación de EO (Morris *et al.*, 2008).

1.2.2. Sistemas Productores de Estrés Oxidativo

Los radicales libres se forman en numerosos procesos celulares, tales como el transporte de electrones a lo largo de la cadena respiratoria, la activación de los leucocitos, reacciones enzimáticas (como la catalizada por la xantina oxidoreductasa) y en el metabolismo de xenobióticos. Un compuesto se puede transformar en un radical libre de diferentes formas: ganando un electrón, perdiendo un electrón o por fusión homolítica simétrica de una unión covalente.

Los radicales libres aparte de las fuentes endógenas descritas anteriormente pueden también proceder de fuentes externas. Con la dieta se ingieren muchos compuestos de naturaleza prooxidante, tales como el humo de tabaco, la polución ambiental, el ozono, etc. (Prior *et al.*, 1995; Ames, 1981).

Pese a que los radicales libres provienen a través de fuentes exógenas y endógenas, en este estudio solo nos centraremos en las fuentes endógenas y concretamente en las producidas por la xantina oxidorreductasa y la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa.

1.2.2.1. Xantina Oxidorreductasa

La xantina oxidorreductasa (XDH) es un enzima muy versátil que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza (desde las bacterias hasta el hombre). Cataliza la oxidación de muchos substratos, bien sean endógenos como las purinas o exógenos como el etanol. La principal función a nivel fisiológico es la oxidación de la hipoxantina y de la xantina a ácido úrico. Éste es el producto final del catabolismo de las bases púricas en algunos primates y en el hombre.

La XDH *in vivo* se encuentra fundamentalmente bajo la forma NAD⁺ dependiente deshidrogenasa. Esta forma es un homodímero y cada una de sus subunidades tiene un peso molecular aproximado de 150 KDa (Saksela y Raivio, 1996). La forma deshidrogenasa se puede convertir en oxidasa mediante la oxidación de grupos sulfhidrilos, siendo este paso reversible (Della-Corte y Stirpe, 1968), o mediante un proceso proteolítico. Este último proceso es irreversible y está catalizado por una proteasa calcio dependiente que libera un fragmento peptídico de 20 KDa de cada subunidad (McCord y Roy, 1982). La hipoxia es otro factor que puede transformar la forma deshidrogenasa en forma oxidasa (Parks y Granger, 1986). La forma deshidrogenasa utiliza como aceptor de electrones el NAD⁺ durante la oxidación de la hipoxantina. La forma oxidasa utiliza el O₂ como aceptor de electrones formando el radical superóxido (Parks y Granger, 1986). Además, algunos mediadores de la inflamación como el factor de necrosis tumoral también producen una conversión de la forma deshidrogenasa en la forma oxidasa (Friedel *et al.*, 1989).

1.2.2.2. Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Oxidasa

La enzima NAD(P)H oxidasa presente en la membrana plasmática de distintos tipos celulares, entre ellos en las células fagocíticas donde se caracterizó por primera vez, es una importante fuente biológica de producción del anión superóxido. Estos radicales libres de oxígeno pueden dañar a la propia célula que los origina y a las próximas. También se ha descrito la NAD(P)H oxidasa como una importante fuente de radicales libres en células musculares lisas vasculares (CMLV) y endotelio, en las cuales desempeñan un papel importante como señales intracelulares y en la activación de moléculas que regulan la transcripción de genes proinflamatorios y síntesis de matriz extracelular, la apoptosis y la división celular de las CMLV, entre otros. Todo ello desemboca en la disfunción endotelial (Qamirani *et al.*, 2005, Lassegue y Griendling, 2004; Viridis *et al.*, 2004).

El complejo NAD(P)H oxidasa puede estar formado por diferentes subunidades en función del tipo celular y del tejido donde se esté produciendo (Cheng *et al.*, 2001; Chamulitrat *et al.*, 2004). Además, cada una de ellas puede estar activada por diferentes proteínas homólogas (Cheng y Lambeth, 2005). En un principio, se determinó la estructura y función de la NAD(P)H oxidasa en neutrófilos. Se conoce que esta enzima es un complejo multi-enzimático formado por un dominio con actividad reductasa compuesto por una flavoproteína y un citocromo b558 formado por las subunidades p22phox y p91phox. Otras importantes subunidades citoplasmáticas incluyen p47phox, p67phox, p40phox y la proteína Rac. Cuando la célula fagocítica está activa, las subunidades citosólicas se traslocan hacia el citocromo b558 de membrana, dando lugar a la forma activa de la enzima (Lapouge *et al.*, 2000; Koga *et al.*, 1999; Babior, 1999). Cuando el complejo está activo, transfiere electrones del NAD(P)H citosólico al oxígeno del espacio extracelular generando O_2^- (Cross y Segal, 2004).

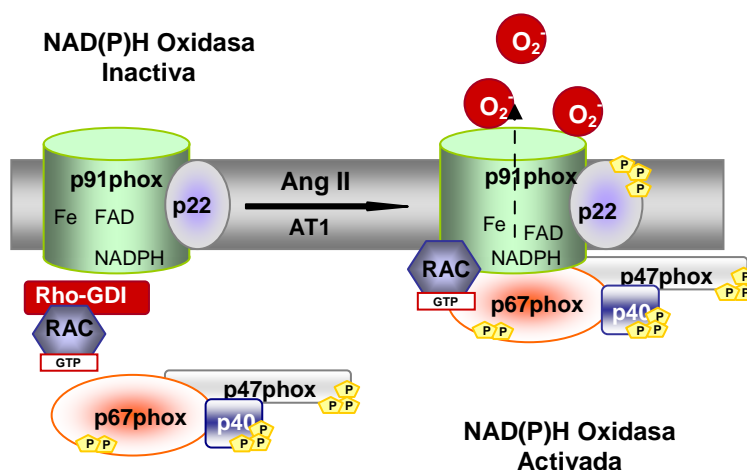
La NAD(P)H oxidasa vascular tiene algunas características funcionales similares a la que se halla en neutrófilos. Ambas se inhiben por difenileneiodonio (DPI), un producto empleado para inhibir la generación de O_2^- vía NAD(P)H oxidasa. Se diferencian, sin embargo, en que la oxidasa vascular produce O_2^- en menor cantidad, pero de manera más constante (Cai y Harrison, 2000)

Es importante destacar que la actividad de la NAD(P)H oxidasa vascular está regulada por citoquinas, hormonas y fuerzas mecánicas que se conoce que participarán en la patogénesis de la enfermedad vascular (Griendling *et al.*, 2000). La estimulación de las CMLV por Ang II, trombina, factor de crecimiento plaquetario y el factor de crecimiento tumoral, provoca el aumento de la actividad vascular del complejo y la formación de EROs (Bhunia *et al.*, 1997; De Keulenaer *et al.*, 1998; Griendling *et al.*, 1994; Holland *et al.*, 1998; Marumo *et al.*, 1997)

En particular, Ang II, es un importante activador de este complejo. En la CMVL, la activación del receptor del Ang II tipo 1 determina la fosforilación de la subunidad p47phox, así se promueve su unión al resto de subunidades citoplasmáticas, éstas a las de membrana y con ello la activación del complejo (Touyz *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2000).

Este mecanismo de señalización por parte de Ang II y el proceso de formación de O_2^- por NAD(P)H oxidasa se ilustra en la figura 1.3.

Figura 1.3. Mecanismo de activación y acción de la NAD(P)H oxidasa vascular mediante Ang II.



Este mecanismo se ha demostrado que también tiene lugar en células endoteliales, donde Ang II estimula la asociación de p47phox con p22phox (Li y Shah, 2003), además de inducir la expresión de p22phox (Gragasin *et al.*, 2003; Touyz *et al.*, 2002).

Por otra parte, se han descrito varios polimorfismos en el gen *CYBA* que codifica para la subunidad p22phox que podrían afectar al nivel de actividad final del complejo NAD(P)H oxidasa y estar asociados al riesgo cardiovascular (Zalba *et al.*, 2005; San José *et al.*, 2008).

1.2.3. Sistemas Protectores frente Estrés Oxidativo

Los seres vivos han desarrollado una serie de mecanismos antioxidantes, diseñados para protegerse de la acción de los radicales libres. Éstos pueden clasificarse básicamente en:

1. Sistemas de defensa enzimáticos: se trata de un mecanismo intracelular que eliminan las especies reactivas del oxígeno una vez formadas y reparan sus efectos. En este estudio nos centraremos en las enzimas superóxido dismutasa y catalasa como enzimas detoxificadoras de EROs y como sistemas reparadores comentaremos la enzima 8-oxoguanina glicosilasa 1, como proteína reparadora de la acumulación de 8-oxo-dG en el ADN.

2. Sistemas de captadores de EROs o "scavengers": enlentecen considerablemente las reacciones de oxidación en cadena o atrapan a las EROs transformándolas en otras sustancias menos agresivas y recuperando proteínas oxidadas previamente. En este apartado englobaríamos los sistemas glutatión y tioredoxina y algunas sustancias hidrosolubles, liposolubles o de membrana (vitaminas C, A y E).

3. Quelantes de metales de transición: son moléculas que captan el hierro (ferritina y transferrina) y el cobre (ceruloplasmina) impidiendo que estos metales actúen como catalizadores de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss.

La existencia de una alteración en el equilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes a favor de las fuerzas pro-oxidación en la célula dará lugar a estrés oxidativo.

1.2.3.1. Sistemas de Defensas Enzimáticas

Superóxido Dismutasa (SOD): La superóxido dismutasa representa la primera línea de defensa. Cataliza la reacción de destrucción de los radicales superóxido mediante su transformación en peróxido de hidrógeno, que, a su vez, puede ser destruido por las actividades de la catalasa o de la glutatión peroxidasa. Se han aislado cuatro clases de SOD: una contiene un cofactor con dos átomos metálicos; uno de cobre y otro de zinc. Las demás contienen cofactores mononucleares de hierro, manganeso o níquel. En humanos existen tres tipos de SOD: MnSOD mitocondrial, CuZnSOD citosólica y CuZnSOD extracelular (ECSOD).

El contenido de MnSOD en tejidos humanos es aproximadamente la mitad del contenido de CuZnSOD, lo que indica su importancia para la supervivencia de la vida aerobia y el desarrollo de la resistencia celular a la toxicidad inducida por las sustancias reactivas de oxígeno.

Catalasa (CAT): es una enzima tetramérica, con cuatro subunidades idénticas dispuestas tetraédricamente, conteniendo cuatro grupos de ferro-protoporfirina por molécula. Es una de las enzimas más eficaces, tanto que no puede ser saturada por H₂O₂ a ninguna concentración, catalizando su conversión en H₂O y O₂, para proteger a las células del H₂O₂ que se genera en su interior.

El H₂O₂ se cataboliza enzimáticamente en organismos aerobios por la CAT y otras peroxidasas. La enzima catalasa tiene un papel importante en la adquisición de tolerancia a estrés oxidativo en la respuesta de adaptación de las células. Esta enzima captura el H₂O₂ antes de que pueda escapar de la célula y lo convierte en oxígeno molecular. Por ello, es una proteína importante en la protección del organismo frente a estrés oxidativo grave.

8-oxoguanina glicosilasa 1 (OGG1): Enzima reparadora del ADN. La mayoría de las células poseen diversos tipos de endonucleasas que específicamente reconocen diferentes modificaciones de las bases nucleótidas, provocadas por las EROs u otros agentes como la radiación ultravioleta. La OGG1 es la enzima responsable de la escisión de 8-oxo-dG, base mutagénica más abundante derivada del ataque oxidativo al ADN y considerada como biomarcador del daño oxidativo en el ADN (Lunec *et al.*, 2000).

1.2.3.2. Sistemas de Captadores de Especies Reactivas

1.2.3.2.1. Sistema Glutación

Glutación (GSH): Es el tiol no proteico más abundante en las células de mamíferos. Fue descubierto por Hopkins en 1921 y está constituido por 3 aminoácidos: ácido glutámico, cisteína y glicina. Su estructura le confiere ciertas características que hacen que el GSH tenga una funcionalidad amplia e importante en la célula.

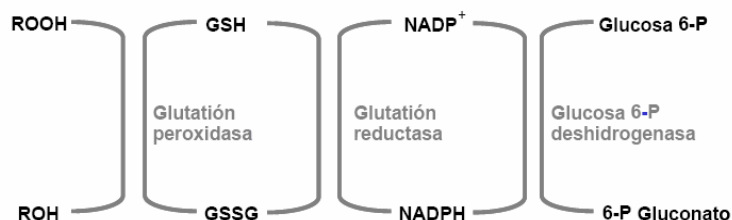
El GSH se puede encontrar en 2 formas según su estado de óxido-reducción: como glutación reducido (GSH) o glutación oxidado (GSSG) que está compuesto por 2 moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro entre las cisteínas.

El GSH desempeña numerosas e importantes funciones metabólicas. Una de ellas es la de proteger a la célula contra los radicales libres, los peróxidos y otros compuestos tóxicos, así como proteger frente al efecto nocivo de las radiaciones. El GSH puede reaccionar directamente con los radicales libres, sin intervención enzimática alguna y detoxificarlos, o bien puede reducir los peróxidos formados por medio de la glutación peroxidasa.

Metabolismo del glutación: Cuando se produce estrés oxidativo, el GSH se oxida a GSSG por medio de la reacción catalizada por la glutación peroxidasa. El GSSG formado es inmediatamente reducido a GSH por medio del

enzima glutatión reductasa. La glutatión reductasa requiere Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH) como cofactor, que será suministrado por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Tanto la glutatión peroxidasa como la glutatión reductasa se hallan predominantemente en el citosol, existiendo también cierta actividad en la mitocondria (Figura 1.4).

Figura 1.4. Mecanismo de antioxidante del GSH.



Glutación peroxidasa (GPX): está formada por cuatro subunidades idénticas y cada una de ellas contiene un residuo de selenocisteína que es esencial para su actividad enzimática. Comparte su sustrato con la catalasa, además puede reaccionar de modo efectivo con tejidos y otros hiperóxidos orgánicos, catalizando la reducción de diferentes hiperóxidos ($ROOH$ y H_2O_2) usando GSH, contribuyendo a la protección de células de mamíferos contra el daño oxidativo.

Se han detectado seis isoenzimas de GPX en mamíferos. La GPX citosólica o mitocondrial (GPX1) reduce los hiperóxidos de ácidos grasos y el H_2O_2 a expensas del glutatión. La GPX1 y la GPX4 (fosfolípido hiperóxido GPX) se encuentran en más tejidos. La GPX4 se localiza tanto en la fracción citosólica como en la membrana. La GPX1 se encuentra predominantemente en eritrocitos, riñón e hígado, mientras que la GPX4 se halla mayoritariamente en células epiteliales renales y en los testículos. La GPX2 citosólica y la GPX3 extracelular se detectan escasamente en la mayoría de los tejidos, excepto en el tracto intestinal y el riñón respectivamente. Se ha detectado un isoenzima GPX5 que no guarda relación con el selenio y se expresa en muy baja concentración. Por último, se ha identificado la GPX6, se ha descrito que su expresión se restringe a los embriones y epitelio olfativo de adultos.

Glutación reductasa (GSR): es una enzima que reduce el glutatión oxidado mediante la nicotina adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Guarda relación con la riboflavina, de modo que su actividad puede ser un marcador del estado nutricional de esta vitamina. Reduce el peróxido y, en general, todos los hidroperóxidos orgánicos tipo $ROOH$. Esta última requiere un donante de hidrógeno para actuar, que es el glutatión reducido (GSH). Un aumento en la disponibilidad y velocidad de recambio del GSH en las células es un factor importante para la efectividad de los mecanismos que las protegen contra radicales libres y peróxidos.

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH): cataliza la regeneración del $NADP^+$, necesario para mantener el GSH reducido, en la vía de las pentosas fosfato. La deficiencia en la G6PDH (cuyo gen se localiza en el cromosoma X) causa anemia hemolítica a causa de la falta de NADPH.

Síntesis del glutatión y su regulación: El GSH se sintetiza a partir de sus aminoácidos en el citosol de todas las células de mamífero (Meister y Tate, 1976). En la síntesis de GSH intervienen dos enzimas. La primera es la γ -glutamil cisteína ligasa (GCLs), que da lugar a la γ -glutamil cisteína a partir de L-glutámico y L-cisteína y en el segundo paso actúa la glutatión sintetasa (GSS), la cual agrega glicina al dipéptido γ -glutamil cisteína (Meister y Tate, 1976).

γ -glutamilcisteína ligasa (GCL): está regulada fisiológicamente por los niveles de GSH –por inhibición competitiva- mediante un mecanismo de retroalimentación negativa y por la biodisponibilidad de cisteína. Esta enzima está compuesta por 2 subunidades: una subunidad catalítica (GCLC) y una subunidad reguladora o modificadora (GCLM). Están codificadas por distintos genes y, cuando se someten a condiciones reductoras, se disocian (Yang *et al.*, 2001). La subunidad catalítica posee toda la actividad de la enzima, así como la capacidad de inhibición por retroalimentación por el GSH. La subunidad modificadora es enzimáticamente inactiva pero juega un papel regulador importante disminuyendo la K_m de la GCL para el glutamato y elevando la K_m para el GSH (Huang *et al.*, 1993).

Los cambios en la actividad de la GCL pueden ser el resultado de una posible regulación a múltiples niveles, que afecten a la subunidad catalítica, a la reguladora o a ambas (Yang *et al.*, 2001). Se conocen numerosas condiciones o tratamientos que alteran los niveles del ARNm de GCL, que incluyen estrés oxidativo, los antioxidantes, conjugados del GSH, la ingesta de etanol, tioacetamida y el crecimiento relacionado con hormonas y regeneración hepática (Huang *et al.*, 1993).

Glutatión sintasa (GSS): Es una enzima homodímero que cataliza el segundo paso de la biosíntesis del glutatión en una reacción ATP dependiente donde se condensa la γ glutamilcisteína y la glicina para formar el glutatión. Las mutaciones presentes en el gen que codifica esta enzima produce la deficiencia severa de GSS. Esta enfermedad se transmite de forma autosómica recesiva, y se pueden observar 2 fenotipos: anemia hemolítica aislada o enfermedad multisistémica con anemia hemolítica, acidosis metabólica, 5-oxoprolinuria y disfunción neurológica asociada con el síndrome hemolítico (Ristoff y Larsson, 1998).

1.2.3.2.2. Sistema Tiorredoxina

El sistema tiorredoxina está constituido por dos tiorredoxinas (TRX) y varias tiorredoxina reductasas (TRXR) que se encuentran en diferentes localizaciones celulares y subcelulares. Este sistema participa en una amplia gama de funciones dentro de la célula, incluidas la protección contra EO, la síntesis de precursores de ADN, la regulación de la proliferación celular y diferenciación, el control de la apoptosis, la modulación del sistema inmunológico, el control redox de la actividad de los factores de transcripción y la promoción del desarrollo del cáncer (Gromer *et al.*, 2004; Arnér y Holmgren, 2006; Nordberg y Arnér, 2001; Arnér y Holmgren.,2000; Rundlöf y Arnér, 2004; Nakamura *et al.*, 1997).

Tiorredoxina (TRX): es una pequeña y multifuncional proteína redox que participa en distintos procesos intracelulares. El sitio activo de la tiorredoxina consiste en dos cisteínas vecinas, como parte de un motivo estructural

(Cys-Gly-Pro-Cys) altamente conservado que puede ciclar entre una forma activa del ditiol reducida y la forma oxidada del disulfuro (Poole *et al.*, 2000). En su estado activo, la tiorredoxina actúa como un eficiente agente de reducción eliminando las EROs y manteniendo otras proteínas en su estado reducido (Arnér y Holmgren, 2000). Cuando la TRX es oxidada, la tiorredoxina reductasa se encarga de regenerarla usando NADPH como donante de electrones. En mamíferos existen dos isoformas: TRX1, presente en el citoplasma y núcleo y codificada por el gen *TXN* y TRX2, presente en las mitocondrias y codificada por el gen *TXN2*.

Tiorredoxina reductasa (TRXR): En las células humanas, tres genes codifican tiorredoxina reductasas: *TXNRD1*, *TXNRD2*, y *TXNRD3*. La enzima TRXR1, codificada por el gen *TXNRD1*, se encuentra principalmente en el citosol y se expresa en la mayoría, si no en todas, las células humanas. Su sustrato principal es la TRX1 (Arnér y Holmgren., 2000). El gen *TXNRD2* codifica la proteína mitocondrial TRXR2 que reduce a la TRX2 (Miranda-Vizuet *et al.*, 1999), aunque esta reductasa también se encuentra en el citosol, pero parece que su nivel de expresión es más bajo en comparación con TRXR1 (Turanov *et al.*, 2006). La TRXR3 es similar a la TRXR1 y TRXR2 pero contiene adicionalmente un dominio glutarredoxina monotiol en el extremo N-terminal que permite modular su función y se piensa que está implicada en la maduración del espermatozoide (Su *et al.*, 2005).

TRXR1 y TRXR2 son selenoproteínas oxidorreductasas homodiméricas que contienen un motivo estructural Gly-CYS-Selenocisteína-Gly en su extremo C-terminal, donde tiene lugar la reducción de la TRX (Zhong y Holmgren, 2002). Además, se sabe que un incremento en el estrés oxidativo celular modifica la actividad de la TRXR iniciando una cascada de señales en respuesta a los radicales libres en el citoplasma que provoca cambios en el estado de oxidación de las cisteínas de la TRX.

1.2.3.2.3. Otras Sustancias Captadoras de Especies Reactivas

La vitamina E (Alfa-tocoferol): bloquea la reacción en cadena de la peroxidación lipídica. Está presente en las membranas celulares y protege a los lípidos de la oxidación uniendo las EROs y formando una proteína sin actividad metabólica tóxica.

Las fuentes alimenticias de vitamina E son pescado azul, vegetales y yema de huevo, entre otros.

La vitamina C (Ácido ascórbico): se encuentra dentro y fuera de la célula, eliminando los radicales hidroxilos y los aniones superóxido y formando ácido dehidroascórbico. Éste, posteriormente, será eliminado por el glutatión. Actúa como un antioxidante directo sobre O_2 y $OH\cdot$. Se obtiene a través de la dieta. Fuentes de ascórbico son frutas y verduras.

1.3. Estrés Oxidativo e Hipertensión

Cuando se produce un desequilibrio entre sustancias prooxidantes y antioxidantes a favor de las primeras, el resultado es un daño oxidativo, que como ya hemos visto anteriormente, puede afectar a diversas moléculas y puede reflejarse en la alteración de sus funciones fisiológicas (Becker, 2004; Juránek y Bezek, 2005). El EO se ha descrito en muchas condiciones patológicas, incluyendo la HTA, diabetes, hipercolesterolemia, la aterosclerosis y muchas otras enfermedades cardiovasculares (Rodrigo *et al.*, 2003; Miyajima *et al.*, 2007).

La HTA se caracteriza por la disfunción endotelial, consecuencia en la proliferación de las CMLV, el engrosamiento de la pared del vaso y el incremento de la resistencia periférica vascular junto con el aumento de la presión sanguínea y alteraciones de la biodisponibilidad del NO (Chen *et al.*, 2001; Hoagland *et al.*, 2003). Como vimos en el apartado 1.2.1.1, el descenso en la concentración de NO estaría promoviendo la vasoconstricción, además de efectos proinflamatorios y el aumento de EROs. Por tanto, es importante dilucidar el papel de las moléculas productoras de EROs en la respuesta metabólica y molecular de las células circulantes en los pacientes hipertensos y su repercusión a nivel del endotelio vascular.

En diversos estudios, donde se ha evaluado la influencia de los marcadores de EO en la HTA, se ha podido observar cómo existe un aumento de la producción del anión superóxido y del peróxido de hidrógeno en la HTA y cómo estos niveles disminuyen cuando la PA se reduce tras el tratamiento hasta normalizarse (Kumar y Das, 2002). Otros autores describieron cómo existía una correlación positiva significativa entre los valores de peróxido de hidrógeno y los valores de PAS (Lacy *et al.*, 2000).

Inicialmente, se estudió la asociación de las EROs en la HTA en diversos modelos experimentales. Estos modelos fueron frecuentemente inducidos por la estimulación del sistema renina-angiotensina: infusión crónica de Ang II, sobreexpresión de genes de renina y angiotensinógeno o coartación de la arteria renal. La Ang II se encontró que estaba involucrada en el desarrollo de la hipertensión en ratas hipertensas espontáneas (SHR), actuando como modulador de los niveles de PA y un importante inductor de EO. En estos modelos, tanto la presión arterial como las EROs y los marcadores de la oxidación (malondialdehído y sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico) estaban incrementados en vasos, corazón y riñones (Guo *et al.*, 2003; Chabrashvili *et al.*, 2003; Lassegue y Griendling, 2004). Además estos niveles disminuían tras la administración de un suplemento de vitamina E, como antioxidante (Ortiz *et al.*, 2001).

Los modelos de hipertensión con altos niveles de renina y angiotensina se obtienen, por ejemplo, mediante la infusión de endotelina 1, un vasoconstrictor y estimulante del crecimiento del músculo liso, o por nefrectomía unilateral y administración de deoxicorticosterona y dieta rica en sal. En estos modelos también se eleva la producción de O_2^- vascular y los marcadores de EO (Zheng *et al.*, 2003). Por tanto, en muchos modelos experimentales la hipertensión está asociada a una elevada producción de ERO.

La abundancia de EROs puede deberse a un aumento de su producción o a una menor degradación. Numerosos estudios han identificado la NAD(P)H oxidasa como la principal fuente de ERO en los vasos humanos, situada en el endotelio, capa media y adventicia (Griendling *et al.*, 2000). Como hemos visto anteriormente, cuando este complejo es estimulado por el Ang II, las subunidades phox citosólicas se fosforilan y todo el complejo citosólico migra a la membrana donde se activa.

Este complejo ejerce un papel clave en la hipertensión. Las subunidades phox están reguladas al alza en las células endoteliales y en las CMLV de pequeños vasos expuestos a Ang II (Touyz *et al.*, 2002). Li y Shah 2003 estudiaron el papel de la subunidad p47phox en la regulación de la NAD(P)H oxidasa y observaron que la producción de ERO se reduce por la transfección de moléculas antisentido de p47phox. Así, se suprime por la delección del gen p47phox y se recupera su expresión. También se ha podido comprobar cómo la infusión de AngII y la sobreexpresión de renina regulan al alza la subunidad p91phox en vasos y corteza renal (Chabrashvili *et al.*, 2003; Lassegue y Griendling, 2004).

Además, algunos estudios sugieren que el tratamiento con alopurinol, un inhibidor selectivo de XDH, revierte los efectos de la disfunción endotelial y reduce los niveles de EO. Además, tras encontrarse una correlación positiva entre la actividad de la XDH, la concentración de ácido úrico y los niveles de PA media, se comenzaron estudios tanto en modelos animales como en humanos sobre el tratamiento con antioxidantes de los sujetos hipertensos con el fin de contrarrestar los efectos nocivos de las EROs, mejorar la función vascular y reducir la presión arterial (Chen *et al.*, 2001; Hoagland *et al.*, 2003; Duffy *et al.*, 2001; Boshtam *et al.*, 2002). Sin embargo, los datos disponibles no son concluyentes y la relación entre la presión arterial y EO en los seres humanos aún no se ha dilucidado. Aunque se sugiere que EO tiene un papel adicional como modular de la PA.

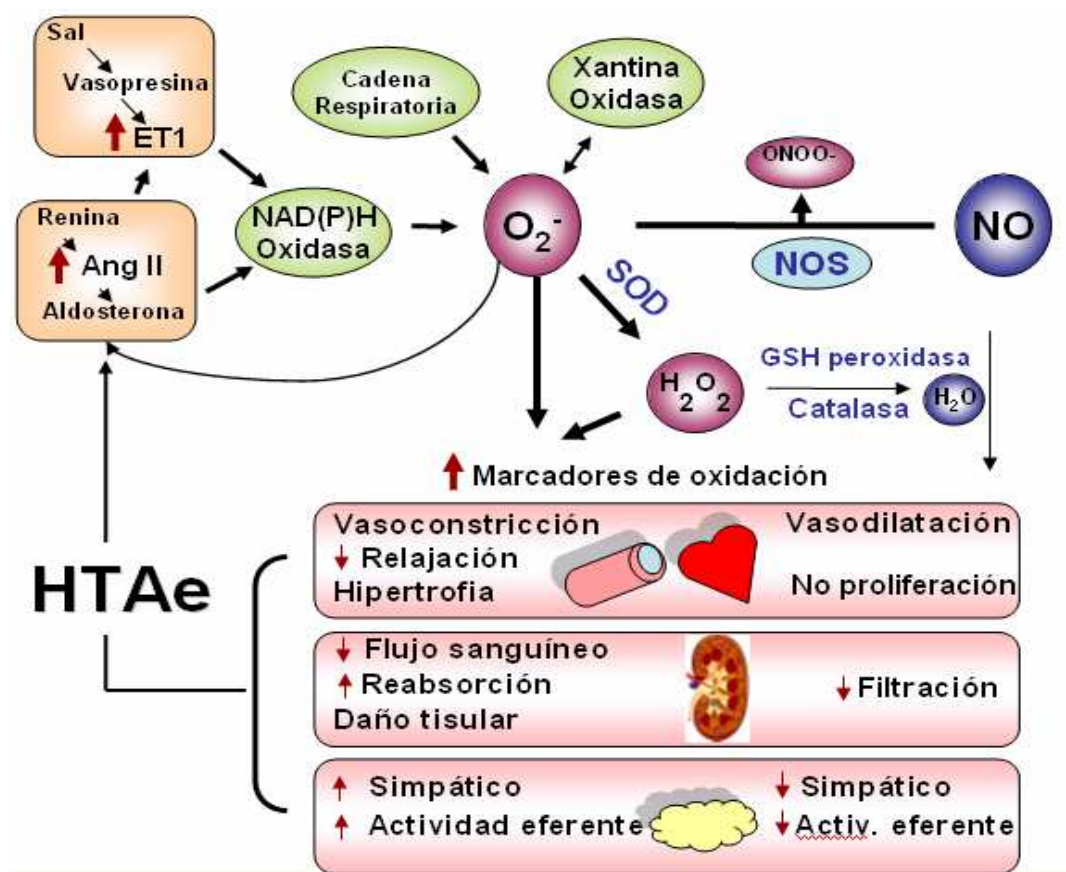
Por otra parte, existen estudios que demuestran que los sistemas antioxidantes en esta patología están alterados. La infusión de Ang II disminuye la expresión de ECSOD en riñón (Chabrashvili *et al.*, 2003). Además, se ha podido comprobar cómo la actividad de CuZnSOD es más baja en vasos y riñón de animales sometidos a nefrectomía parcial que en controles (Vaziri *et al.*, 2003). De forma semejante, las actividades de las enzimas CAT y GPX disminuyen tras la estenosis renal. La CAT aórtica también está regulada a la baja en ratones genéticamente hipertensos (Uddin *et al.*, 2003). Por tanto, en estos modelos animales la menor actividad de las enzimas antioxidantes endógenas se asocia a la elevación de EROs.

En humanos se ha encontrado la correlación negativa entre PAS, PAD y la razón GSH/GSSG y los antioxidantes, medida como la actividad de la enzima CAT (Simic *et al.*, 2006). Este hallazgo señala la importancia del estado antioxidante en la PA.

Además de la importancia de las EROs en la función vascular también se conoce que participa en el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión. Así el O_2^- puede inducir vasoconstricción (González-Pacheco *et al.*, 2002), hipertrofia vascular (Wedgwood y Black, 2003), disminución de la función renal e incrementar la actividad simpática del

sistema nervioso central (Zanzinger, 2002). Como consecuencia del aumento de EROs se esperaría una reducción en el endotelio dependiente de la vasodilatación de las CMLV y la HTA (Lassègue y Griendling, 2004). A su vez, las elevaciones de la presión arterial podrían también contribuir al aumento de EROs, lo cual incrementa aún más el nivel de EROs en la hipertensión mediada a través de un complejo mecanismo de interdependencia. En la figura 1.5 se resume como las EROs pueden estar conduciendo a la HTA por diferentes vías.

Figura 1.5. Principales vías que conducen a la hipertensión mediante la formación de EROs.



Agentes como la sal, vasopresina, endotelina 1 (ET-1), renina, angiotensina II (Ang II) o aldosterona, directa o indirectamente, aumentan el nivel de EROs, como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los peroxinitritos ($ONOO^-$) en tejidos diana. Estos agentes incrementan la producción de O_2^- a través de la NAD(P)H oxidasa, la óxido nítrico sintasa (NOS) desacoplada, la xantina oxidasa y la mitocondria. Cuando la NOS se desacopla por la disminución de la biodisponibilidad de su sustrato, la L-arginina (Arg), o su cofactor, la tetrahidropterina (BH_4), se produce la disminución de la biodisponibilidad de NO y se generan los nocivos $ONOO^-$. Estas EROs nitrifican proteínas, concretamente en residuos de tirosina e inhiben la superóxido dismutasa (SOD). La SOD convierte el O_2^- en H_2O_2 que es degradado a agua por la acción de la catalasa o la glutatión peroxidasa (GPX). El H_2O_2 puede incrementar la actividad NOS directamente o mediante el incremento de la síntesis de BH_4 y actuar como factor relajante derivado del endotelio. El O_2^- y sus metabolitos inducen vasoconstricción, hipertrofia vascular y cardíaca, disminución de la función renal e incremento de la actividad simpática del sistema nervioso central. Todos estos efectos, antagonizados por el NO, conducen a la hipertensión.

1.4. Regulación Genética de Estrés Oxidativo en Hipertensión

El mismo EO y las moléculas oxidadas que originan tienen como consecuencia, a nivel celular, una serie de respuestas mediadas por diferentes factores y moléculas que suponen la activación o represión de numerosos genes en distintos tipos celulares y tejidos. En este apartado se resumirán los posibles factores que intervienen en la compleja red que regula la expresión y los niveles de ARNm de los sistemas productores de EO y protectores frente a éste:

- ❖ Hormonas, como la angiotensina II, andrógenos, etc. (Touyz *et al.*, 2002).
- ❖ Compuestos o metabolitos que son transmisores de señales o que pueden aumentar/disminuir la producción de radicales, moléculas protectoras, etc. Dentro de este grupo se incluyen el NO, homocisteína (Castelli, 1996), adenosina (Riksen *et al.*, 2003; Huang, 1999), metabolitos de la xantina (Anker *et al.*, 2003), tetrahidrobiopterina (Kawashima y Yokoyama, 2004), etc.
- ❖ Estado proinflamatorio, determinado por los niveles de distintas citoquinas y factores de crecimiento, tiene un efecto muy importante en la respuesta celular tanto de la pared como de las células mononucleares sanguíneas. Además, el nivel de EO puede ocasionar el aumento de la secreción de citoquinas proinflamatorias. En diferentes situaciones de alto riesgo cardiovascular existen incrementos en la secreción de citoquinas por parte de células mononucleares sanguíneas (Wang *et al.*, 2004). Así, se han asociado los niveles de interleuquina 1, interleuquina 6 y TNF- α con un mayor riesgo de desarrollo de hipertensión y enfermedad cardiovascular (Bautista *et al.*, 2004). Además, niveles altos de citoquinas se sabe que producen un aumento en el nivel de EO (Kofler *et al.*, 2004). Además se ha demostrado la situación inversa según la cual existe un aumento en la secreción de citoquinas cuando se aumentan los niveles de EO debido posiblemente a la activación de las diferentes células mononucleares (Haddad, 2003).
- ❖ Receptores y rutas de transmisión de señal de cada una de las hormonas o metabolitos anteriores, como el receptor tipo 1 de Ang II.
- ❖ Factores de transcripción que pueden activar o reprimir la expresión de genes como respuesta a EO. NF- κ B (formado por dos subunidades p50 y p65) parece ser uno de los primeros en mediar la respuesta a EO (Mercurio y Manning, 1999). Activa la expresión de genes que pueden mediar en la disfunción endotelial, si bien su presencia es necesaria para la expresión de otras proteínas importantes para la protección frente a EO, como la MnSOD y frente a apoptosis. El complejo proteína activadora (AP1) compuesto por las subunidades c-fos y c-jun, junto con NF κ B1, controla la señalización del estado redox en linfocitos (Schulze-Osthoff *et al.*, 1995) y, en general, a nivel de todo el sistema circulatorio y al de otros muchos tejidos. Este complejo se activa principalmente bajo diferentes condiciones de EO. Otros factores de transcripción implicados serían proteínas de unión SP1 que regulan la expresión de CuZnSOD, EcSOD y de otras proteínas implicadas en el metabolismo, principalmente lipídico (Minc *et al.*, 1999); los factores respiratorios nucleares 1 y 2, se unen a elementos de respuesta antioxidante, regulando la expresión de muchos genes implicados en detoxificación (Myhrstad *et al.*, 2001); la proteína Erg1 que se ha relacionado con un

control negativo de genes implicados en la eliminación de EROs (Minc *et al.*, 1999); “CAAT/enhancer binding proteins” (Choi *et al.*, 1995), etc.

Todo este sistema de regulación es muy complejo y variaciones en la actividad de uno de los genes o en su expresión pueden desencadenar una alteración del equilibrio existente entre la activación y represión de numerosos factores y de su actividad, así como en la expresión de un gran número de genes que controlan la expresión de los genes que producen EO o protegen las células frente al EO.

Por último, EO puede ser un modulador pleiotrópico clave. De hecho, los EROs pueden actuar como segundos mensajeros y alterar las rutas de transducción de señal, así como inducir cambios en factores de transcripción que median las respuestas inmediatas al estrés celular. El mecanismo por el cual las EROs inducen estos cambios todavía no está esclarecido completamente, aunque parece estar relacionado con su capacidad de alterar la conformación o la actividad de estas moléculas, así como por efectos en proteínas sensibles al estado redox ricas en cisteína (Adler *et al.*, 1999).

1.5. Enfermedades Complejas - Punto de Partida del Estudio Genético de la Hipertensión y Daño Renal Asociado

Las enfermedades complejas son aquellas que para su desarrollo es necesaria la interacción de múltiples genes y factores ambientales. En las enfermedades monogénicas como la fibrosis quística, la mutación de un gen causa la manifestación de la enfermedad. Sin embargo, en las enfermedades complejas no existe una relación tan directa entre genotipo y fenotipo. Por ello, el estudio de la base genética de las enfermedades complejas presenta dificultades importantes. El primer grado de dificultad está en el elevado número de genes que, en principio, están implicados en la manifestación de dicha enfermedad, y en segundo lugar, en la compleja interrelación que se establece entre estos genes y el ambiente.

Existen estrategias en el estudio de la base genética de las enfermedades complejas que permiten establecer la relación genotipo-fenotipo: el rastreo genómico y el estudio de genes candidatos. La primera consiste en evaluar en un solo ensayo la relación existente entre la variabilidad del genoma (centenares o miles de polimorfismos) y el fenotipo estudiado. Esta estrategia no asume ninguna hipótesis previa salvo el hecho de considerar que aquellas variaciones que presenten una distribución “anómala” pueden estar relacionadas con el fenotipo estudiado. La segunda estrategia se fundamenta en la asunción de un modelo previo basado en los conocimientos existentes sobre la fisiopatología de la enfermedad. A partir de dicho modelo se proponen genes “candidatos” entre aquellos que están directa o indirectamente relacionados con la patología. El siguiente paso consistirá en el estudio y caracterización de dichos

genes, variantes a nivel de secuencia y arquitectura genómica que nos permitirán determinar su posible implicación en la enfermedad estudiada.

Una de las contribuciones más importantes de la secuenciación del genoma humano ha sido la caracterización e identificación de millones de loci polimórficos distribuidos a lo largo de los 3250 millones de nucleótidos que constituyen nuestro genoma.

Un polimorfismo se define frecuentemente como una variante genética que aparece al menos en el 1% de los cromosomas de una población. Estas variantes pueden estar localizadas en cualquier región de un gen o en regiones intergénicas. Las variantes localizadas en un gen pueden inducir cambios en la proteína o en el patrón de expresión del gen. Así, variaciones en la región 5' no traducida (UTR, del inglés *untranslated region*) pueden alterar los niveles de expresión, mientras que cambios en la región 3'UTR pueden afectar al transporte, estabilidad y vida media del ARNm. Cuando las variaciones se localizan en un exón pueden generar una alteración en la secuencia del codon de forma que éste siga codificando el mismo aminoácido, cambio sinónimo, o que el codon pase a codificar un aminoácido diferente, cambio no sinónimo, o un aminoácido terminador, una parada de la secuencia, o un cambio en la pauta de lectura de la secuencia. Todos estos polimorfismos, excepto el cambio sinónimo, producirían una secuencia proteica alterada y como consecuencia, un mayor o menor grado de su función biológica.

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, del inglés *single nucleotide polymorphism*) SNPs se encuentran distribuidos en el genoma con una frecuencia media estimada de un SNP por cada 250-300 nucleótidos. Se calcula que existen 11.5 millones de SNPs distribuidos a lo largo del genoma humano lo que corresponde aproximadamente a un 0.35% del total de nucleótidos.

Aproximación estadística al estudio de los caracteres complejos. La aplicación del análisis de los polimorfismos al estudio y caracterización de los caracteres complejos se fundamenta en los llamados estudios de asociación. Dichos estudios se basan en la comparación de dos muestras de una población que solo difieren en la característica estudiada. El objetivo consiste en detectar aquellas diferencias entre las muestras que se "asocian" con la manifestación o no de dicha característica.

En dicha estrategia metodológica se parte de un modelo genético que considera que los individuos que manifiestan un determinado carácter son portadores de variantes de genes que están relacionados con la manifestación fenotípica observada. Según esta hipótesis la frecuencia de las variantes relacionadas con el carácter será mayor en un grupo de individuos que lo manifiestan. Siguiendo esta premisa si un alelo de un polimorfismo es más frecuente en el grupo de individuos que manifiesta el carácter que en el grupo que no lo manifiesta, podemos considerar que dicho alelo está asociado al carácter y que puede ser responsable, directa o indirectamente de su manifestación. Los resultados obtenidos deben ser analizados de forma crítica y ser cautos en su interpretación, ya que hay que tener la

certeza de que no son fruto del azar o consecuencia de una mala selección de los individuos incorporados en el estudio.

Cuando en el desarrollo de un estudio de asociación se identifica un polimorfismo asociado a un determinado fenotipo se pueden considerar dos hipótesis: 1) el cambio en la secuencia genética que implica dicho polimorfismo afecta de algún modo la función de un gen relacionado con el carácter, o bien, 2) el polimorfismo asociado se transmite juntamente con otro, desconocido en nuestro estudio, que es realmente el responsable de la asociación observada. Tenemos, por tanto, dos posibilidades; o bien nuestro polimorfismo es causativo, o bien actúa como marcador de otro polimorfismo responsable de la manifestación que estamos observando.

Si el estudio se ha planteado correctamente y se han obtenido los resultados de asociación el siguiente paso consistirá en extrapolar el estudio realizado a otras poblaciones. Asimismo, los resultados de asociación se deben fundamentar con estudios funcionales que relacionen el polimorfismo con alguna función biológica que esté implicada en el carácter estudiado.

Concretando en el caso de EO en la HTA, el aumento de la producción de EROs en la pared vascular ha ido ganando amplia aceptación como un importante contribuyente a la enfermedad cardiovascular, con base en estudios de cultivos celulares, modelos animales de arteriosclerosis y estudios en humanos. Por lo tanto, es intuitivamente atractiva la idea de determinar si los polimorfismos genéticos presentes en genes implicados en la modulación del estrés oxidativo pueden estar u ocasionando la elevación de la PA o el daño renal. Sin embargo, todavía existen algunos resultados inconsistentes en la determinación del papel de los polimorfismos en los genes relacionados con el estrés oxidativo tanto en hipertensión como en aterosclerosis. Esta falta de claridad emana de varios factores: 1. Falta de uniformidad y rigor en la definición del criterio de valoración clínica, 2. Pequeño tamaño de la muestra que se opone a la potencia estadística, 3. Procedimientos heterogéneos de muestreo que incluyen el origen étnico, 4. Ausencia de evidencia fisiológica que apoye el papel funcional del polimorfismo y 5. Sesgo de publicación de resultados positivos en estudios de polimorfismo. Aparte, una de las principales dificultades de estos estudios genéticos parte de la etiología multifactorial de la enfermedad, en la que la contribución de un factor genético puede ser modesta, pero altamente significativo en presencia de otros factores de susceptibilidad genética y en condiciones ambientales alteradas.

Hipótesis y Objetivos

2. Hipótesis

La hipertensión presenta un nivel de estrés oxidativo (EO) elevado crónico. Este EO origina una serie de respuestas celulares y sistémicas, mediada por numerosas proteínas en el sistema circulatorio, que pueden desencadenar o ayudar en el desarrollo de la hipertensión (HTA) y daño orgánico asociado. La respuesta a EO podría ser distinta en función de las diferentes variantes génicas presentes en los genes de estas proteínas, por lo que es interesante estudiar los polimorfismos de los sistemas implicados tanto protección como producción de EO y su asociación con HTA y daño orgánico asociado, la microalbuminuria.

Las hipótesis de trabajo fueron tres:

1. El EO presente en el sistema circulatorio afecta a las células del mismo, especialmente a las células circulantes. La desregulación en el equilibrio redox celular deberá ser mayor en pacientes con hipertensión y microalbuminuria. Los parámetros utilizados para medir el estrés oxidativo podrían servir como marcadores de riesgo cardiovascular en el individuo.
2. Los niveles de EO y la HTA pueden modular los niveles de ARN de los genes involucrados en EO. Además, los niveles de ARN mensajero de los sistemas prooxidantes y antioxidantes también vienen determinados por la relación entre las condiciones del individuo y sus características genéticas. Los sistemas productores de EO (Xantina oxidoreductasa y NAD(P)H oxidasa, entre otros) y los sistemas antioxidantes naturales (catalasa, diferentes superóxido dismutasas, enzimas que influyen en los niveles de glutatión y tioredoxina) deben estar modificados en la HTA.
3. El EO es un importante mecanismo en la regulación de la presión arterial y el riesgo de HTA. Por tanto, la presencia de determinadas variantes génicas podría estar modificando este riesgo de hipertensión y el desarrollo de microalbuminuria. Estos polimorfismos podrían no ser realmente los que tienen un efecto, sino que podrían estar en desequilibrio de ligamiento con otras alteraciones de estos genes que fueran las que estarían afectando a la expresión y/o actividad.

3. Objetivos

Los objetivos de este proyecto se basan en el estudio de la hipertensión arterial esencial y estrés oxidativo a nivel bioquímico y genético, mediante el análisis de los productos finales de estrés oxidativo, niveles de ARN mensajero y polimorfismos de genes implicados en la producción y defensa de EO y que puedan afectar a los niveles de presión arterial y daño orgánico.

Para alcanzar dichos objetivos, se plantearon objetivos parciales:

1. Estudiar el nivel de estrés oxidativo presente en células mononucleares y plasma de pacientes hipertensos con y sin tratamientos y en controles normotensos, analizando parámetros como los valores de glutatión reducido, glutatión oxidado, malondialdehído y 8-hidroxi 2-desoxiguanosina.
2. Cuantificación de los niveles de ARN mensajero de los principales genes que codifican proteínas que producen o eliminan agentes oxidantes, por PCR cuantitativo a tiempo real en linfocitos.
 - a. Los distintos componentes del complejo enzimático NAD(P)H Oxidasa.
 - b. Catalasa, superóxido dismutasas y enzimas que influyen en los niveles del glutatión y la tioredoxina.
3. Estudio de polimorfismos, principalmente de cambio de un solo nucleótido o SNPs, en los genes de los sistemas implicados en estrés oxidativo, centrándonos en los genes cuyas proteínas producen o eliminan moléculas oxidantes, tanto en una población de hipertensos, controles y una población general.
4. Estudio de las posibles relaciones e interacciones entre:
 - a. Niveles de parámetros implicados en estrés oxidativo y datos clínico-bioquímicos.
 - b. Niveles de ARN mensajero de los principales genes implicados en el desarrollo de estrés oxidativo y datos clínico-bioquímicos.
 - c. Variantes génicas, haplotipos e interacción gen-gen con los datos clínicos, bioquímicos, niveles de parámetros de estrés oxidativo y riesgos de desarrollar microalbuminuria en sujetos hipertensos.
 - d. Variantes génicas, haplotipos e interacción gen-gen con los datos clínicos, bioquímicos y el riesgo de hipertensión arterial esencial y microalbuminuria en una población general.

Metodología

4. Metodología

4.1 Diseño de la Tesis

Este proyecto de tesis doctoral comenzó con el estudio realizado sobre una población de sujetos hipertensos de la Comunidad Valenciana. Se desarrolló como un estudio de cohorte transversal al tiempo de la entrada en el estudio, y longitudinal al plazo de tres meses para variables, como niveles de marcadores de estrés oxidativo (EO), ARNm y microalbuminuria.

Por otra parte, el trabajo se amplió a una población general. El trabajo consistió en un estudio transversal observacional polifásico sobre población general de 14 a 85 años, residente en el área sanitaria oeste de Valladolid.

Todos los participantes dieron su consentimiento informado para participar en el presente trabajo y cada protocolo fue aprobado por el correspondiente comité ético de cada centro donde se reclutaron a los sujetos.

4.1.1 Población Control

La selección del grupo control se realizó a partir de voluntarios aparentemente sanos, residentes en Valencia. Los criterios de selección fueron los siguientes:

- 1- Edad comprendida entre 25 y 50 años.
- 2- Historia clínica negativa de enfermedad crónica y/o patología aguda conocida en el momento de su inclusión en el estudio.
- 3- Exploración física normal.
- 4- Glucemia basal < 110 mg/dL.
- 5- Ausencia de tratamiento farmacológico durante los tres meses previos al estudio.

Con los mencionados criterios se incluyeron un total de 32 individuos (17 hombres y 15 mujeres) en el grupo control.

4.1.2 Población Hipertensa

El grupo de sujetos hipertensos se seleccionó mediante muestreo no probabilístico consecutivo entre pacientes afectos de hipertensión, atendidos en las Unidades de Hipertensión del Hospital de Sagunto y del Hospital Clínico de Valencia. Todo este trabajo fue realizado bajo la dirección del doctor Josep Redón.

Todos los pacientes incluidos cumplían los siguientes criterios de selección:

- 1- Diagnóstico HTA esencial (HTAe) de acuerdo con los criterios del VII Joint National Committee; (JNCVII, 2003). PAS \geq 140 mm de Hg y/o PAD \geq 90 mm de Hg.
- 2- Edad comprendida entre 25 y 50 años.
- 3- Repercusiones orgánicas grados I-II de la OMS.
- 4- Ausencia de tratamiento antihipertensivo, previa inclusión en el estudio.
- 5- Ausencia de enfermedad cardíaca, renal o infección urinaria, en el momento de su inclusión en el estudio.
- 6- Tasa de filtración glomerular mayor de 60 ml/min/1.73 m².

Los criterios de exclusión en este trabajo fueron:

- 1- Diagnóstico Diabetes mellitus de acuerdo con los criterios del *National Diabetes Data Group*.
- 2- Glucosa sérica en ayunas >110 mg/dl.
- 3- Niveles de colesterol total >240 mg/dl
- 4- Consumo de tabaco mayor de 10 cigarrillos por día.
- 5- Presencia de Hipertensión secundaria en el momento de su inclusión en el estudio.

En total, se incluyeron 69 individuos (35 hombres y 34 mujeres) en el grupo HTAe para el estudio de niveles de parámetros de EO y ARNm de genes de EO. Por otra parte, en los estudios de asociación de polimorfismos se aumento a 335 individuos (174 hombres y 161 mujeres) gracias a la colaboración con el doctor José María Pascual del Hospital de Sagunto de Valencia.

4.1.3 Población General de Valladolid / Estudio Hortega

En la población general de estudio se incluyó a participantes de edades comprendidas entre los 14 a 85 años. La selección de los individuos se llevó a cabo sobre las fuentes de bases de datos públicas de los diferentes registros locales en la zona seleccionada, un total de 214.445 habitantes en el centro de España, Valladolid (National Statistics Institute, 2005). Las personas seleccionadas al azar fueron invitadas a participar en el estudio vía telefónica. Si el contacto no se establecía o el individuo se negaba a participar, el investigador podía invitar a un reemplazo individual de una lista de reserva al azar. El treinta y dos por ciento de los sujetos en contacto inicialmente fueron sustituidos.

Los criterios de exclusión fueron la presencia enfermedades o trastornos graves concomitante que pudieran influir en la recopilación de información fiable, y cualquier condición social o mental que podría complicar o impedir la participación del sujeto en el estudio.

La inclusión de esta población en el presente proyecto de tesis doctoral sirvió para observar los efectos de los polimorfismos genéticos de los genes implicados en EO a nivel poblacional.

Este estudio se llevó a cabo gracias a la concesión del proyecto “Estudio Hortega” financiado por fondos públicos (Consejería de Sanidad y Bienestar Social de la Junta de Castilla y León, Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid y Hospital Universitario del Río Hortega).

El reclutamiento de esta población se llevó a cabo en el Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario del Río Hortega en Valladolid. El trabajo fue dirigido por el doctor Juan Carlos Martín Escudero y en él participaron un importante número de facultativos (Mena-Martin *et al.*, 2003; Martínez-Escudero *et al.*, 2003).

En total, se incluyeron 1502 individuos (754 hombres y 748 mujeres) de población general de Valladolid para los estudios de asociación. Por otra parte, a partir de esta población se extrajo una población de hipertensos con las mismas características que el grupo de sujetos hipertensos de Valencia para replicar los resultados de asociación de polimorfismos obtenidos en dicha población (165 hombres y 145 mujeres).

4.2 Evaluación Clínica y Medidas Bioquímicas

Los sujetos reclutados fueron sometidos a una valoración clínica y pruebas clínico-bioquímicas para evaluar su estado físico y de salud. A continuación se detallan las pruebas:

Se realizaron entrevistas personales protocolizadas que permitieron elaborar las historias clínicas para cada sujeto. Durante la entrevista, se talló y pesó a los entrevistados con una báscula calibrada diariamente, siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO, 1996). A partir de la medida de peso y talla se calculó el índice de masa corporal ($IMC = kg/m^2$).

Las medidas de presión arterial (PA) se determinaron con un esfigmomanómetro de mercurio, siguiendo las recomendaciones de la *British Hypertension Society* (Presión Arterial Sistólica (PAS) la fase I de Korotkof y Presión Arterial Diastólica (PAD) la fase V de Korotkof, posición sentado, manguito de tamaño adecuado al perímetro del brazo a la altura del corazón, tras 5 minutos de reposo y con tres medidas de PA). La presión arterial media (PAM) fue calculada como la $PAD + 1/3 (PAS - PAD)$. Por otra parte, la medida de la PA de 24 horas se realizó mediante un monitor automático oscilométrico (Spacelabs 90202 o 90207) a lo largo de 24 horas en un día de actividad regular. Las medidas se realizaron cada 20 minutos, desde las 06 a las 24 horas, y cada 30 minutos el resto. Para cada paciente se calcularon la media de la presión arterial sistólica, diastólica, media y de la frecuencia cardíaca para las 24 horas, período de actividad (08 a 22 horas) y período de descanso nocturno (medianoche a 06 horas), siguiendo la metodología utilizada por nuestro grupo en diversos estudios publicados.

Además a cada sujeto se le realizó un exhaustivo examen médico para descartar hipertensión secundaria o alteración de la función renal estimada mediante los niveles plasmáticos de urea, creatinina y por el aclaramiento de creatinina endógena, expresado en ml/min. referidos a $1.73 m^2$ de superficie corporal.

Se obtuvieron muestras de sangre periférica, tras al menos 8 horas de ayuno, para realizar la determinación de los valores plasmáticos de glucemia, perfil lipídico, determinaciones de EO y análisis genéticos. Además, al grupo de hipertensos y controles de la Comunidad Valenciana se les instruyó para recoger una orina de 24 horas. Las muestras se procesaron en el laboratorio del centro hospitalario correspondiente, sometido a estrictos controles de calidad.

La determinación de la excreción urinaria de proteínas se realizó por métodos estándares en orina de 24 horas. Mientras que la excreción urinaria de albúmina (EUA) se determinó por inmunonefelometría en orina de 24 horas siguiendo el protocolo publicado por nuestro grupo. La orina a su llegada al laboratorio se centrifugó a 3500 r.p.m. durante 15 minutos y el tiempo máximo de almacenamiento de la orina hasta su procesamiento fue de 3 días, manteniéndose mientras a $4^{\circ}C$. En cada una de las alícuotas de orina obtenidas la presencia de proteinuria clínica

fue excluida mediante el uso de tiras reactivas (Combur-test, Boheringer Mannheim). Si ésta resultaba negativa se procedía a cuantificar la concentración de albúmina mediante inmunonefelometría, en un nefelómetro láser con antisuero anti-albúmina humana (Instituto Behring). El límite inferior de detección fue de 1.8 µg/ml, el coeficiente de variación intraensayo 2% e interensayo 7%, en nuestro laboratorio. La excreción urinaria de albúmina se midió en dos muestras separadas de orina en 24h recogidas en un intervalo menor de 7 días.

Como medida final se tomó la media de las dos determinaciones, siempre y cuando la inferior no fuera menor que el 25% de la superior, en cuyo caso se tomó una tercera muestra. Se definió la microalbuminuria como la EUA entre 30 y 300 mg/24h.

Se determinó creatinina en sangre y orina en mg/dl, mediante un autoanalizador *Hitachi 917 (Boehringer)*, que utiliza un test cinético modificado de Jaffé. El equipo médico se aseguró de que ningún individuo presentaba factores que pudieran incrementar o disminuir los niveles de creatinina como cetoacidosis, tratamiento con Trimetoprim, Cimetidina, Flucitosina o Cefalosporinas; también se descartó la presencia de malnutrición.

Tras realizar el estudio basal, los pacientes recibieron tratamiento farmacológico o no farmacológico, en función de los niveles de PA y/o presencia de repercusiones orgánicas distintas de la presencia o no de microalbuminuria. A los pacientes con tratamiento farmacológico se les asignó mediante aleatorización tratamiento con beta-bloqueantes o inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensinogeno (ECA), que se mantuvo a lo largo del seguimiento salvo que se detectara la presencia de efectos secundarios. Con el fin de obtener una reducción adecuada de los valores de PA < 140/90 mmHg, se añadió hidroclorotiazida 12.5 mg/día cuando fue necesario.

4.3 Determinación de Parámetros de Estrés Oxidativo

Las determinaciones de los parámetros de EO se llevaron a cabo en células mononucleares y plasma de pacientes y de controles que reunían los criterios de inclusión apropiados. La elección de este tipo celular se debe a que son células que pueden contribuir a la liberación de especies reactivas del oxígeno en la pared vascular y a su sencilla recogida.

El estudio bioquímico de estos marcadores se ha realizado en la Unidad de de Toxicología Metabólica dirigido por el profesor Dr. Guillermo Sáez Tormo, en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de Universitat de Valencia, gracias a la colaboración entre ambos grupos.

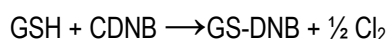
4.3.1 Determinación de Glutación Reducido, Glutación Oxidado y Malondialdehido

Previo a la determinación de los parámetros de EO hubo que aislar las células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Para ello, se empleo la técnica de separación mediante gradiente de densidad. Brevemente, se mezclaron de 5 mL de sangre con un volumen similar de solución salina (PBS, Sigma, UK). Esta mezcla fue vertida cuidadosamente sobre un volumen de Ficoll Hypaque-1077 (Hystopaque, Sigma, UK), para evitar que se mezclen las fases. Los tubos fueron centrifugados a 2000 g durante 30 minutos en una centrifuga (5804R, Eppendorf, Hamburg). Posteriormente, se colectó la interfase formada de CMSP y se lavó en tres ocasiones con solución salina, centrifugando a 1600 g durante 5 min.

Los niveles de GSSG y MDA fueron medidos utilizando cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en CMSP. La concentración de proteína fue cuantificada por el método Lowry.

El contenido de glutación reducido (GSH) de las células fue determinado por el método descrito por Brigelius (Brigelius *et al.*, 1983). Se basa en la cuantificación espectrofotométrica de la conjugación del GSH con el cloro-2,4-dinitrobencono (CDNB). Esta reacción está catalizada por la glutación-S-transferasa (GST). El aducto formado, 2,4-dinitrofenil-S-glutación, presenta un máximo de absorción a 340 nm. Se mide a punto final, cuando la absorbancia se estabiliza.

GST



Para el análisis del glutación oxidado (GSSG) se utilizó el método de HPLC, descrito por Asensi y cols. (Asensi *et al.*, 1994a; Asensi *et al.* 1994b). El fundamento de esta técnica se basó en la protección de los tioles libres. Para ello, las muestras fueron tratadas con N-etilmaleimida (NEM) y disulfonato de batofenantrolina. El NEM

se une rápidamente en medio ácido al grupo tiólico del GSH para evitar la autooxidación de éste, evitando así obtener valores erróneamente elevados de GSSG debidos a la autooxidación del GSH durante la preparación de la muestra. Posteriormente éstos son separados mediante HPLC en fase reversa e intercambio iónico.

Para la determinación de la concentración de malondialdehído (MDA) se utilizó el método de HPLC, descrito por Wong y cols. (Wong *et al.*, 1987). Este método se basa en la hidrólisis ácida de los lipoperóxidos presentes en el plasma o mitocondrias, con ácido ortofosfórico diluido, a una temperatura de 100°C. La reacción del MDA, producto mayoritario de la hidrólisis ácida de los lipoperóxidos, con el ácido tiobarbitúrico (TBA) permitió la cuantificación de los aductos TBA-MDA₂, a 532 nm .

4.3.2 Determinación de 8-Hidroxi 2-Desoxiguanosina

El ADN genómico se aisló siguiendo el método Gupta, con las modificaciones descritas por Muñoz *et al.* (Muniz *et al.*, 1995), donde la mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) sustituye al fenol en la etapa de eliminación de proteínas.

El ADN aislado se lavó 2 veces con etanol frío al 70%, se secó y resuspendió en 200 µL de Tris 10 mM (T1378, Sigma-Aldrich, Steinheim), 0.1 mM EDTA (ED2SS, Sigma-Aldrich, Steinheim) 100 mM NaCl (pH 7.0) (S7653, Sigma-Aldrich, Steinheim) para su digestión enzimática. La primera digestión consistió en añadirle a 200 µg totales de ADN, 100 U de DNasa I en 40 µL Tris 10 mM y 10 µL de MgCl₂ 0.5 M y se incubó una hora a 37°C. En el siguiente paso, el pH de la mezcla de reacción se bajó a 5.1 mediante la adición de 15 µL de acetato sódico 0.5 M pH 5.1. Posteriormente, se añadió 10 µL de nucleasa P1 (5 U) y 30 µL de ZnSO₄ 10 mM, y la mezcla fue incubada durante una hora a 37°C. Después de neutralizar el pH de la mezcla de reacción con 100 µL de Tris 0.4 M pH 7.8, se añadieron 20 µL de fosfatasa alcalina (3 U) y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Los enzimas se precipitaron con acetona (5 volúmenes), se desecharon mediante centrifugación y el sobrenadante se secó por evaporación.

El ensayo de la 8-oxo-desoxiguanosina (8-oxo-dG) se determinó mediante HPLC. El ADN hidrolizado se disolvió en agua grado HPLC y filtrada con una jeringa de 0.2-40 µm antes de aplicar a la columna Waters ODS HPLC (2.5x0.46 ID; 5 µm de tamaño de partícula). La cantidad de 8-oxo-dG y la desoxiguanosina (dG) en el ADN digerido fue medida por detección de absorbancia UV y electroquímica. También se analizó los patrones de dG y 8-oxo-dG para comprobar la correcta separación y poder identificar aquellas bases derivadas del ADN celular.

4.4 Estudio de Niveles de ARNm mediante RT-PCR en Tiempo Real

El estudio genético de las distintas enzimas analizadas se ha realizado en la Unidad de Genotipado y Diagnóstico Genético de la Fundación para la Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia dirigido por el Dr. F. Javier Chaves, ubicado en la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina de Valencia.

4.4.1 Aislamiento de Células Mononucleares y Extracción de ARNm

Tras el aislamiento de las células mononucleares como se ha explicado en el apartado 4.3.1, se realizó la extracción del ARN. Este proceso se realizó de acuerdo al método TRIzol (Tripure Isolation Reagent, Roche Applied Science). Se utilizaron 0.5 mL de CMSP, añadiéndoles 1 mL de Tripure, seguido de una cuidadosa homogenización en un vórtex, incubándose durante 5 min. a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 200 μ L de cloroformo, agitándose suavemente por inversión; seguidamente se centrifugó a 12000 g durante 15 min. a 4°C para extraer el ARN en la fase acuosa. El ARN se precipitó con 500 μ L de isopropanol a 70°C. Tras invertir varias veces, se incubó entre 5 y 10 min. a temperatura ambiente.

Pasado ese periodo, se centrifugó 12000 g, durante 10 minutos en frío (0-4°C). Se lavó el *pellet* con 500 μ L de etanol al 70% frío (-20°C), y se volvió a centrifugar a 12000 g, durante 15 minutos en frío (0-4°C). Se repitieron los lavados con etanol 1 ó 2 veces, y se dejó secar el *pellet* perfectamente. Finalmente, se resuspendió en 50 μ L de agua tratada con dietilpicrocarbonato (DEPC), congelándolo hasta su uso a -80°C.

Todo el proceso se realizó con material libre de ARNsas.

4.4.2 Análisis Cualitativo del ARNm

En primera instancia se evaluó la calidad del ARN aislado midiendo su absorbancia a 280 y 260 nm, descartando las muestras cuyo cociente de A260/A280 no estuviera comprendido entre 1.8 y 1.6. Para conocer exactamente el estado del ARN aislado se analizó 1 μ L de cada muestra utilizando el sistema comercial "Agilent ARN 6000 Nano assay Kit", siguiendo las instrucciones del fabricante.

El sistema se basa en una electroforesis en chip utilizando el analizador Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). La electroforesis tiene lugar en geles contenidos en pequeños canales grabados sobre un soporte sólido (chip). La presencia de ARN se determina mediante la excitación por láser de un fluoróforo que se une específicamente a este tipo de moléculas.

El tratamiento de los datos se realiza con un software, mostrando una imagen virtual de un gel de electroforesis y como perfil de picos (electroferograma) para las diferentes bandas de los ARNs. Al mismo tiempo se cuantifica cada una de las bandas mostrando su tamaño, su concentración en ng/ μ l y su molaridad.

4.4.3 Cuantificación de los Niveles de ARNm por RT-PCR Cuantitativo en Tiempo Real

4.4.3.1 Transcripción Reversa.

La transcripción reversa se llevó a cabo con el kit Ready-To-Go™ You-Prime First- Strand Beads (GE Healthcare, UK) siguiendo las instrucciones del fabricante, y en el termociclador Mastercycler 5333 (Eppendorf, Hamburg).

Para la reacción se utilizó 2 μ g de ARN diluido hasta un volumen de 33 μ l con H₂O. A cada muestra se le añaden 2 μ l de cebadores (100 ng/ μ l) (Random Hexamer Primer, Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad). Todo el proceso se realiza en frío.

La mezcla se incubó 10 minutos a 75°C y se traspasaron 33 μ l al tubo del Kit que contenían la Transcriptasa reversa Murina (FPLCpure™), el tampón de reacción, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, BSA (libre de ARNs y DNasa) y ARNgard™, y se incubó 10 minutos a 25°C y 90 minutos a 37°C. Por último, cuando acabó la reacción, las muestras se guardaron a -20°C si se iban utilizar en breve o a -80°C si se tardaba más de un mes en utilizarlo.

4.4.3.2 Preparación de Estándares.

Para determinar los niveles de ARNm en las muestras se incluyó una curva de calibración en cada una de las reacciones. Así, se obtuvo un valor absoluto de los niveles del mensajero para cada muestra, aunque estos valores fueron referidos posteriormente a los de un gen control interno “housekeeping”, como veremos más adelante. La curva de calibración de cada uno de los genes analizados se construyó a partir de una mezcla de cDNA de las muestras problemas, para equiparar el grado de pureza y degradación entre los estándares de la curva patrón y las muestras. Para cada gen, se preparó una curva de estándares, mediante la amplificación de esta mezcla de ADNc, y se incluía en cada reacción de PCR cuantitativo junto con las muestras problemas, para homogeneizar los resultados ya que la reacción se producía en las mismas condiciones tanto para estándares como muestras.

La amplificación de los fragmentos de los estándares se realizó por PCR clásica aplicando la técnica hotstart (Chou *et al.*, 1992). Esta técnica de hotstart se introdujo con el fin de evitar reacciones inespecíficas (sobre

todo la generación de dímeros de los cebadores), debidas a la hibridación inespecífica de los cebadores a bajas temperaturas (de 4 a 25°C) antes del comienzo de la amplificación. La reacción de PCR no comienza hasta calentar la polimerasa a 94°C durante 10 min. para que se active. El diseño de cada pareja de cebadores, empleados en la reacción de PCR por gen, se realizó con el programa Primer 3 (Rozen y Skaletsky, 2000) (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Cebadores empleados para la obtención de los estándares de cada gen de estudio.

Gen	Nombre comun	NCBI ID	Secuencia	Tamaño (pbs)
B2M	Beta-2-microglobulin precursor	NM_004048	Fw-CCCCAAATTCTAAGCAGAGTATGTAA Rv-TCTTCAATCTCTTGCACTCAAAGC	89
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_002046	Fw-GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC Rv-CTGGAAGATGGTGTGGGATTTTC	229
CYBA	p22-phox	NM_000101	Fw- TACTTTGGTGCCTACTCCATTGTG Rv- ACAGCCGCCAGTAGGTAGATG	269
CYBB	gp91phox	NM_000397	Fw- TGAACGTCTTCTCTTTGTCTGG Rv-ATAGATGTGCAATGGTGTGAATCG	300
NCF1	Neutrophil cytosol factor 1 (p47-phox)	NM_000265	Fw- CGAGATCTACGAGTTCCATAAAAACC Rv- CTTTGGGCATCAAGTATGTCTCTG	296
NCF2	Neutrophil cytosol factor 2 (p67-phox)	NM_000433	Fw- CGAGGGATGCTCTACTACCAGAC Rv- CTGGCTCATATAGCTTCTGCTTCC	295
NCF4	neutrophil cytosol factor 4 (P40-PHOX)	NM_013416	FW-ACACTCCCAGCCAAAGTCTACG RV- CAGTTTGCTGTTTCCAGTGAAGTC	300
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	NM_006908	Fw- TTCTGCCAATGTTATGGTAGATGG Rv- GATCGCTTCGTCAAACACTGTC	400
RAC2	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	NM_002872	Fw-ATCCCCACCGTGTGTTGACAACAT Rv- TTCTCCTTCAGTTTCTCGATGGTG	299
SOD1	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	NM_000454	Fw-AAGACAGGAAACGCTGGAAGTC Rv-TGGCAAATACAGGTCATTGAAAC	290
SOD2	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	NM_001024465	Fw-GTGGAGAACCCAAAGGGGAGTT Rv- TCCCAGTTGATTACATCCAAATAGC	304
CAT	Catalase	NM_001752	Fw- TATACCTGTGAACGTCCCTACCG Rv-GAAGTTCTTGACCGCTTTCTTCTG	335
OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase	NM_016819	Fw- CTTTTGGACCTCGGCTCATC Rv- GCTTGTCTAGGGCCATCAGG	291
GCLC	Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit	NM_001498	Fw-GCGATGAGGTGGAATACATGTTG Rv- GACAGCCTAATCTGGGAAATGAAG	315
GCLM	Glutamate-cysteine ligase Regulatory subunit	NM_002061	Fw-AATCCTGATGAAAGAGAAGAAATGAAAG Rv- TACCTGTGCCACTGATACAGC	300
GSR	Glutathione reductase	NM_000637	Fw- CAGCGTCATTGTTGGTGCAAG Rv- CAGTCAACATCTGGAATCATGGTC	285
GSS	Glutathione synthetase	NM_000178	Fw- GTCTCTTTGACATCCACAAGCAAG Rv- CGTAGAGCTCCAGGCTTTG	294
G6PD	Glucose-6-phosphate 1 -dehydrogenase	NM_001042351	Fw- CCGGAAACGGTGTGACTTTC Rv-ATAGCCCACGATGAAGGTGTTTTTC	278
GPX1	Cellular glutathione peroxidase	NM_201397	Fw- CTACACCCAGATGAACGAGCTG Rv- ACCGGAGACCAGGTGATGAG	300
GPX2	Glutathione peroxidase -gastrointestinal	AK225871	Fw- GTGCTGATTGAGAATGTGGCTTC Rv- ATCATAAGGGTAGGGGAGCTTGTC	294
GPX4	glutathione peroxidase , mitochondrial	NM_001039847	Fw-GAGGCAAGACCGAAGTAACTACAC Rv- AGCTAGAAATAGTGGGGCAGGTC	379
GPX6	Glutathione peroxidase 6	NM_182701	Fw- GAACTGAATGCACTACAGGAGGAG Rv- ACCAATGCATGACAGGGACTC	355
TXN	Thioredoxin	NM_003329	Fw- TCTGGAGCCAATAAGGAAAAGC Rv- AAAATAATCAGTGGCCTACAAGGTTAC	300
TXN2	Thioredoxin, mitochondrial	NM_012473	Fw-CACTTCCAGAGCCCTGCAGAC Rv- CGAGGTCTGTGTGGTCATCAATATC	293
TXNRD1	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	NM_003330	Fw-CCCTGCAAGACTCTCGAAATTATG Rv- CAGTATTCTTTGTACCAGGGATG	295
TXNRD2	Thioredoxin reductase 2, mitochondrial	NM_006440	Fw-TATGGCTGTGTGGGGCTGTC Rv- CTCAGAGCATGTGGGATGGATAC	294
TXNRD3	Thioredoxin reductase 3	XM_001130163	Fw-TGGTGGCACTTGTGTAATGTAGG Rv- GATTCTAAATACCGTGGCCTTTC	346

Fw (cebador en dirección 5') y Rv (cebador en dirección 3').

La reacción de PCR contenía 2 µl de cDNA (diluido 1:10, en Tris-HCl, 20 mM, pH 8.0), 5 µl de tampón de reacción 10X, 2.5 µl de Q (coadyuvante) (Qiagen, Hilden), 1 µl de mix de dinucleótidos trifostatos (dNTP) (200 µM) (Sigma-Aldrich, Steinheim), 5 µl de cada cebador 10 µM, 0.25 µl de HotStar Taq DNA polimerasa (5 unidades/µl) (Qiagen, Hilden) y agua hasta un volumen final de 50 µl. ensayo de ligación de oligonucleotidos:

- Desnaturalización y activación de la Taq polimerasa a 95°C durante 12 min)
- Amplificación los fragmentos de cDNA de cada gen, que consistió en 45 ciclos de

	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Desnaturalización	95	15
Hibridación	60	15
Elongación	72	45

- Extensión final a 72°C durante 5 minutos.

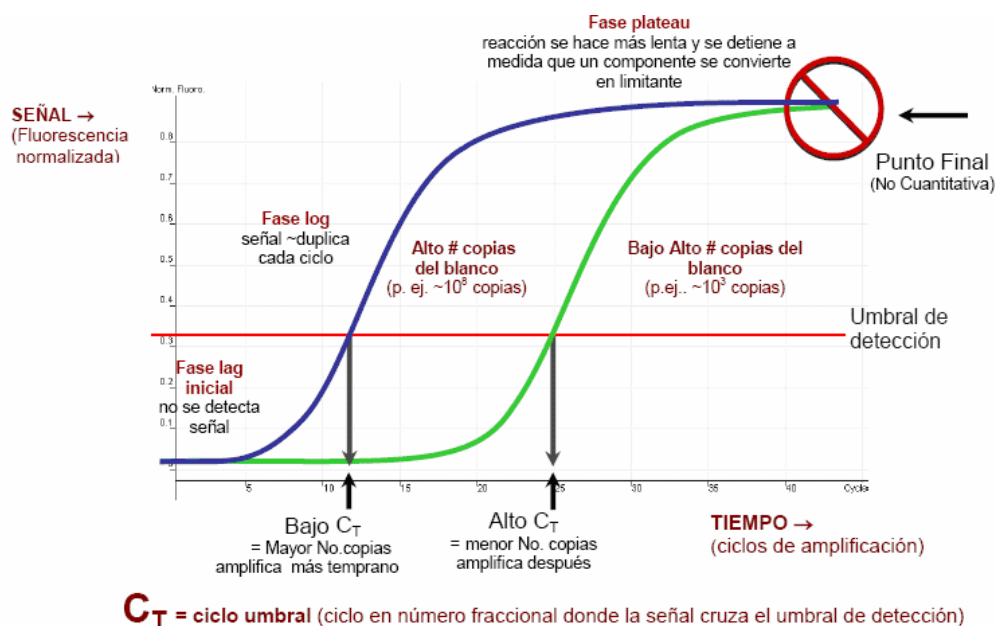
Una alícuota del producto de cDNA resultante se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 2% para comprobar la presencia de una única banda del tamaño esperado. El resto del producto del cDNA amplificado se purificó para eliminar restos no deseados. La purificación del producto se realizó por cromatografía en columna (High Pure PCR Product. Purification Kit, Roche diagnostics, Indianapolis), siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se determinó la concentración de DNA mediante espectrofotometría.

Los fragmentos del producto de cDNA puros y de concentración conocida se diluyeron y se utilizaron como estándares para las amplificaciones de PCR en tiempo real.

4.4.3.3 PCR Cuantitativo en Tiempo Real.

La PCR cuantitativa en tiempo real, como su nombre indica, permite el seguimiento de la reacción en tiempo real mediante medidas de fluorescencia y, por lo tanto, se puede identificar fácilmente las tres fases de la reacción de PCR. La fase inicial, donde la señal corresponde al ruido de fondo (*background*), una fase de crecimiento exponencial y una última fase denominada "*plateau*". Figura 4.1 Esto permite el análisis de los datos en la fase exponencial, donde la eficiencia de la reacción es constante, y el incremento de la fluorescencia es proporcional al crecimiento exponencial del producto amplificado, por lo que la cantidad de material inicial en cada muestra se puede calcular con una gran precisión, mediante la determinación del punto de corte (CT, Threshold cycle) de cada amplificación. Este punto de corte, es el ciclo en el cual la fluorescencia aumenta por encima del ruido de fondo y coincide con el máximo de la segunda derivada de la fluorescencia con respecto al ciclo de la reacción (Bernard y Wittner, 2002). El ciclo en el que la segunda derivada es máxima (CT), se encuentra en la fase exponencial, puesto que la señal de fluorescencia aumenta durante esta fase y suele disminuir cuando la reacción comienza a entrar en la fase de saturación (*plateau*).

Figura 4.1. Etapas de la amplificación de la PCR cuantitativa en tiempo real.



Para la cuantificación de los genes analizados, se empleó el kit SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster), que usa el SYBR Green I para la detección del DNA de doble cadena y la AmpliTaq Gold® DNA polimerasa. El termociclador en tiempo real utilizado fue el 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), y las reacciones de PCR se llevaron a cabo en placas de 384 pocillos. El programa informático utilizado para analizar la señal recogida por el detector fue el *Sequence Detection Systems Software v2.2.1*. (Applied Biosystems, Foster). Los cebadores empleados se muestran en la tabla 4.2.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 7.5 µl, conteniendo 1.5 µl de cDNA (diluido 1:10, en Tris-HCl, 20 mM, pH 8.0), 0.3 µl de la mezcla de oligonucleótidos 5 mM (Tabla 4.2), 3.5 µl del SYBR Green PCR Master Mix 2X y 2.2 µl H₂O.

La mezcla de la reacción se introdujo en los pocillos de las placas (MicroAmp®Optical 96-well Reaction plate. Applied Biosystems, Foster) y se centrifugó durante 2 minutos a 2000 r.p.m. A continuación la placa se introdujo en el termociclador, donde se realizó la PCR cuantitativa en tiempo real.

Las condiciones de la reacción fueron las siguientes:

- Desnaturalización y activación de la Taq polimerasa a 95°C durante 12 min.
- Amplificación (40 ciclos). La señal de fluorescencia se detecta al final de cada paso de elongación. Las condiciones de la amplificación son:

	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Desnaturalización	95	15
Hibridación-Elongación	60	60

Para comprobar la pureza del producto amplificado, se generaron curvas de disociación por cada gen y muestra, mediante el calentamiento a 95°C e inmediato enfriamiento a 62°C, manteniéndose esta temperatura durante 15 segundos, tras lo cual se volvió a subir a 95°C durante otros 15 segundos y midiéndose la fluorescencia de manera continúa.

Tabla 4.2. Genes y cebadores empleados para la reacción de PCR Cuantitativa.

Gen	Nombre comun	NCBI ID	Secuencia	Tamaño (pbs)
B2M	Beta-2-microglobulin	NM_004048	Fw-CCCCAAATTCTAAGCAGAGTATGTAA Rv-TCTTCAATCTTTGCACTCAAAGC	89
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_002046	Fw-GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC Rv-CTGGAAGATGGTATGGGATTTTC	229
CYBA	p22-phox	NM_000101	Fw-CCGGCCTGATCCTCATCAC Rv-ACGGCGGTGATGACTTCTGTGTC	172
CYBB	gp91phox	NM_000397	Fw-AACTGCATGCTGATTCTCTTGC Rv-ATAGATGTGCAATGGTGTGAATCG	175
NCF1	Neutrophil cytosol factor 1 (p47-phox)	NM_000265	Fw-CGTACCCAGCCAGCACTATGTGTA Rv-AACCACTTGGGAGCTGGGAGGT	189
NCF2	Neutrophil cytosol factor 2 (p67-phox)	NM_000433	Fw-CGAGGGATGCTCTACTACCAGAC Rv-TATAACACCTCACAGGCAAACAGC	146
NCF4	Neutrophil cytosol factor 4 (p40-phox)	NM_013416	Fw-ACACTCCCAGCCAAAGTCTACG Rv-GAGTCATAGGGCGACTGGTAAAG	158
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	NM_006908	Fw-GGTGGGAGACGGAGCTGTAGGTA Rv-GGGGCGTAATCTGTCATAATCTTC	184
RAC2	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	NM_002872	Fw-ATCCCCACCGTGTTTGACAACAT Rv-GAGGGAGAAGCAGATGAGGAAGAC	156
SOD1	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	NM_000454	Fw-GGTGTGGCCGATGTGTCTATT Rv-CCAGCGTTTCTGTCTTTGACTT	146
SOD2	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	NM_001024465	Fw-GTGGAAGAACCCAAAGGGGAGTT Rv-GTGAATAAAGGCCTGTTGTTCCCTT	207
CAT	Catalase	NM_001752	Fw-GTTACTCAGGTGCGGGCATTCTAT Rv-GAAGTTCTTGACCGCTTTCTTCTG	129
OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase	NM_016819	Fw-CTTTTGGACCTCGGCTCATCC Rv-AGGATGGCTCGGGCACTG	154
GCLC	Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit	NM_001498	Fw-GCGATGAGGTGGAATACATGTTG Rv-CTCCATACTCTGGTCTCCAAGG	154
GCLM	Glutamate-cysteine ligase Regulatory subunit	NM_002061	Fw-AATCCTGATGAAAGAGAAGAAATGAAAG Rv-TCCATCTTCAATAGGAGGTGAAGC	162
GSR	Glutathione reductase	NM_000637	Fw-ATCCCCGGTGCCAGCTTAGG Rv-AGCAATGTAACCTGCACCAACAA	179
GSS	Glutathione synthetase	NM_000178	Fw-ACTCACTGGGATGTGGGTGAAGAAG Rv-TCCTCCCATATAGGTTGTTACCTC	118
G6PD	Glucose-6-phosphate 1 -dehydrogenase	NM_001042351	Fw-AAGAGCTTTTCCAGGGCGATG Rv-ATAGCCCACGATGAAGGTGTTTTC	158
GPX1	Cellular glutathione peroxidase	NM_201397	Fw-AACCAGTTTGGGCATCAGGAGAAC Rv-ATGAGCTTGGGGTCGGTCATAAG	215
GPX2	Glutathione peroxidase -gastrointestinal	AK225871	Fw-CTCATCATTTGGAGCCCTGTG Rv-AACTTTTAAGGAGGCGCTTGATG	151
GPX3	Plasma glutathione peroxidase	NM_002084	Fw-AGCATACTGCTTGAAGGGGATGTA Rv-TCTCTGAGTTCTCTCTGGTTCTC	187
GPX4	glutathione peroxidase , mitochondrial	NM_001039847	Fw-CTGCTCTGTGGGGCTCTGG Rv-ACGAAGCCCCGGTACTTGTC	149
GPX6	Glutathione peroxidase 6	NM_182701	Fw-GGGGTAACAGGCACCATCTATGAG Rv-TTCAGCTCCTCCTGTAGTGCAATC	149
TXN	Thioredoxin	NM_003329	Fw-AGACTCCAGCAGCCAAGATGG Rv-GAGAGGGAATGAAAGAAAGGCTTG	154
TXN2	Thioredoxin, mitochondrial	NM_012473	Fw-CACTTCCAGAGCCCTGCAGAC Rv-CACTGGTGTCTCACTGTTGACCAC	163
TXNRD1	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	NM_003330	Fw-CCCTGCAAGACTCTCGAAATTATG Rv-CTACTCGGTAGCCCCAATTCAAAG	120
TXNRD2	Thioredoxin reductase 2, mitochondrial	NM_006440	Fw-TATGGCTGTGTGGGGCTGTC Rv-ACCATCTTTACATAAACTGGGATGC	140
TXNRD3	Thioredoxin reductase 3	XM_001130163	Fw-TGGTGGCACTTGTGTAATGTAGG Rv-GGTTCTGAATCGCTTTTGTCAATG	158

Fw (cebador en dirección 5') y Rv (cebador en dirección 3').

El nivel de ARNm de cada gen se normalizó respecto a los niveles del ARNm de 2 genes de referencia, beta-2-microglobulina (*B2M*) y gliceraldehido-3-fostato deshidrogenasa (*GAPDH*), cuya propiedad es mantener sus niveles constantes de mensajero en distintas condiciones. Según nuestros datos, la *GAPDH* ofreció la mejor normalización en este tipo de células y en nuestra población de estudio, ya que no se vió afectada por nuestro experimento, aunque en alguna publicación se ha indicado que es más estables B2M en linfocitos (Vandesompele *et al.*, 2002).

Como control negativo se utilizó una dilución 1:10 de ADN de salmón 10 ng/μL en Tris-HCl, 20 mM, pH8.0, para cada uno los genes analizados.

4.5 Estudio de Polimorfismos

Una vez tomadas las muestras biológicas de los pacientes incluidos en las diferentes poblaciones de estudio se realizó una extracción de ADN con el fin de determinar los genotipos para los polimorfismos seleccionados en el estudio.

4.5.1 Extracción de ADN a partir de Sangre Periférica

A partir de muestras de sangre por centrifugación (1000 r.p.m. durante 15 min. a 4 °C) se aisló el pellet (*buffy coat*) que contiene las células nucleadas de la sangre. Posteriormente se realizó la extracción de ADN con la ayuda del robot Chemagic Magnetic Separador Module1 (Chemagen, Baesweiler, Germany) que permite la extracción automatizada de ADN a partir de 1-10 ml de sangre total o de un pellet de células. El robot utiliza un sistema de partículas magnéticas que permite obtener gran cantidad de DNA y de elevada pureza. Típicamente, a partir de 1 ml de pellet de células se obtienen unos 200 µg de DNA.

4.5.2 Selección de Variantes Genéticas de Estudio

Se realizaron diversas búsquedas bibliográficas en distintas base de datos (Véase apartado 4.7) sobre los principales sistemas que participaban tanto en la generación como la defensa frente a EO, hasta elaborar una lista de 25 genes candidatos (Tabla 4.3). A partir de estos genes se seleccionaron un total de 115 polimorfismos implicados en EO, para ser genotipados en las distintas poblaciones de estudio. En el ANEXO I se puede obtener una descripción detallada de los polimorfismos seleccionados.

Tabla 4.3. Genes Candidatos para el estudio de polimorfismos.

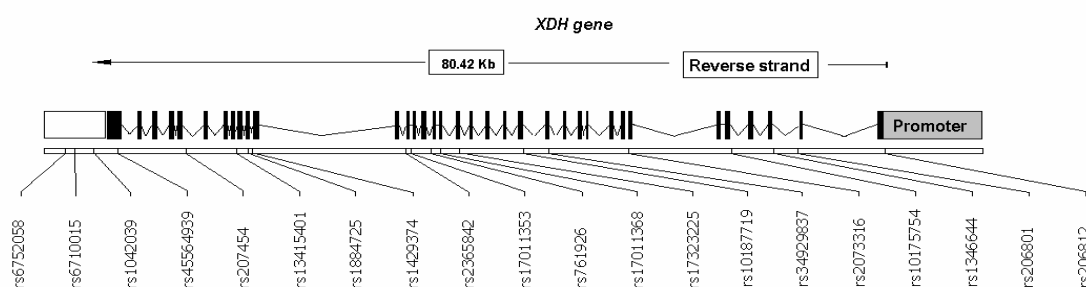
Locus	HUGO	Name Gene	Ensemble ID	Num. SNPs
2p23.1	XDH	Xanthine dehydrogenase	ENSG00000158125	21
16q24	CYBA	Cytochrome b-245, alpha polypeptide	ENSG00000051523	4
Xp21.1	CYBB	Cytochrome b-245, beta polypeptide	ENSG00000165168	2
7q11.23	NCF1	P47phox	ENSG00000158517	1
1q25	NCF2	P67phox	ENSG00000100365	2
22q13.1	NCF4	P40phox	ENSG00000116701	4
7p22	RAC1	Small GTP binding protein Rac1	ENSG00000136238	5
22q13.1	RAC2	Small GTP binding protein Rac2	ENSG00000128340	6
21q22.11	SOD1	Cu /Zn superoxide dismutase	ENSG00000142168	4
6q25.3	SOD2	Mn superoxide dismutase	ENSG00000112096	3
4p15.3-p15.1	SOD3	Superoxide dismutase 3, extracellular	ENSG00000109610	3

Continua

Locus	HUGO	Name Gene	Ensemble ID	Num. SNPs
11p13	CAT	Catalase	ENSG00000121691	6
3p26.2	OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase	ENSG00000114026	3
6p12	GCLC	Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	ENSG00000001084	6
1p22.1	GCLM	Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit	ENSG00000023909	4
8p21.1	GSR	Glutathione reductase	ENSG00000100983	4
20q11.2	GSS	Glutathione synthetase	ENSG00000104687	2
Xq28	G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	ENSG00000160211	1
3p21.3	GPX1	Glutathione peroxidase 1	ENSG00000197582	1
19p13.3	GPX4	Glutathione peroxidase 4	ENSG00000167468	2
6p22.1	GPX6	Glutathione peroxidase 6	ENSG00000198704	3
9q31	TXN	Thioredoxin	ENSG00000136810	10
22q13.1	TXN2	Thioredoxin 2	ENSG00000100348	3
12q23-q24.1	TXNRD1	Thioredoxin reductase 1	ENSG00000198431	7
22q11.21	TXNRD2	Thioredoxin reductase 2	ENSG00000184470	8

Los SNPs fueron seleccionados en base a su posición, posible efecto funcional y frecuencia del alelo menor (MAF), mayor de 10 % en población caucásica, datos obtenidos del proyecto Hapmap (The International HapMap Consortium, 2003). Se intento seleccionar polimorfismos que cubrieran las distintas partes de cada gen, aquellos que pudieran tener más fácilmente un efecto funcional sobre el gen o la proteína y aquellos que se localizaran en regiones reguladoras del mismo: región promotora, 5'UTR, regiones exónicas e intrónicas a menos de 30 nucleótidos de los exones, y 3'UTR. En la figura 4.2 se muestra un ejemplo de la selección de los polimorfismos para el gen *XDH* que codifica para la proteína Xantin oxidorreductasa.

Figura 4.2 Distribución de los SNPs seleccionados a lo largo del gen *XDH*.



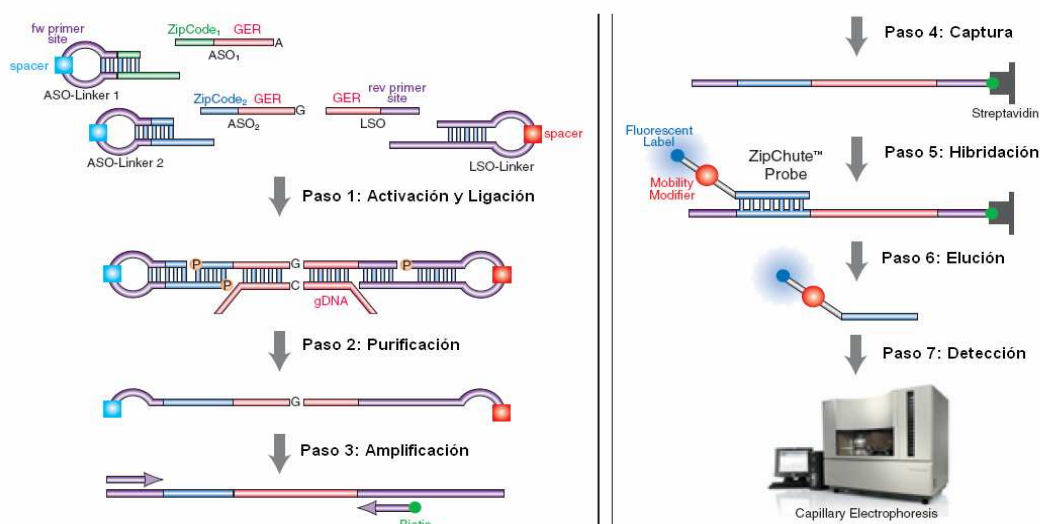
4.5.3 Método de Genotipado: SNPLex

La técnica de SNPLex (SNPLex™ Genotyping System, Applied Biosystems, Foster) permitió el genotipado de los 115 SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) seleccionados (Anexo I). Esta técnica se basa en el múltiple ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA), seguido de una PCR, para amplificar exponencialmente el producto de esta ligación, y una electroforesis capilar.

El sistema SNPLex toma las ventajas de la especificidad de la ligación y el incremento de la sensibilidad por medio de la PCR. Por otra parte, es una técnica de alto rendimiento, ya que en cada reacción se determinan 48 SNPs, reduciendo en tiempo, reactivos y volumen de muestra, en definitiva en costes experimentales.

En la figura 4.3 se muestran los principales pasos de la técnica.

Figura 4.3. Protocolo químico del sistema SNPLex.



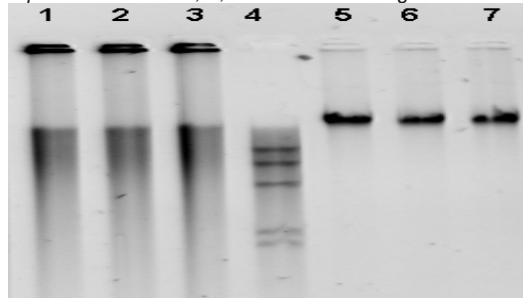
A continuación se describe paso a paso las diferentes etapas de la técnica de SNPLex.

4.5.3.1 Preparación de ADN Genómico

Una vez extraído el ADN genómico, se cuantificó considerando la absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg). Se determinó la pureza de la muestra a partir de la relación entre la absorbancia a 260 nm y la detectada a 280 nm. Posteriormente, las muestras se diluyeron en TE (Tris/EDTA) 1X, pH 8.0, hasta una concentración final de 100 ng/μL.

Para comprobar la calidad del ADN, se preparó una alícuota de cada muestra, 2 μ l ADN genómico en 3 μ l de tampón de carga 5X con 0.25% azul de bromofenol, 0.5% glicerol y 0.25 % Xilen cianol, y se cargó en un gel de agarosa al 0.8% y al 2 % de bromuro de etidio. Cuando se observaba una banda sólida se procedía al paso siguiente de fragmentación mientras que si el ADN aparecía como una banda difuminada, podíamos omitir el paso siguiente y continuar con el paso de la segunda dilución de la muestra (Fig.4.4).

Figura 4.4. Electroforesis en gel de agarosa. Carrera 4 contiene el marcado de tamaño molecular. A Hind III, las carreras 1, 2, 3 presencia de ADN fragmentado mientras que las carreras 5, 6,7 contienen ADN genómico sin sufrir la fragmentación.



Para aumentar la eficiencia de esta técnica el ADN genómico debía ser fragmentado por calor. Para ello, se utilizó un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster) y las condiciones fueron las siguientes:

	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
• Enfriamiento	4	1
• Fragmentación	90	5
• Enfriamiento final	4	5

Tras la fragmentación, se volvieron a diluir las muestras en TE (Tris/EDTA) 1X, pH 8.0, hasta una concentración final de 40 ng/ μ L.

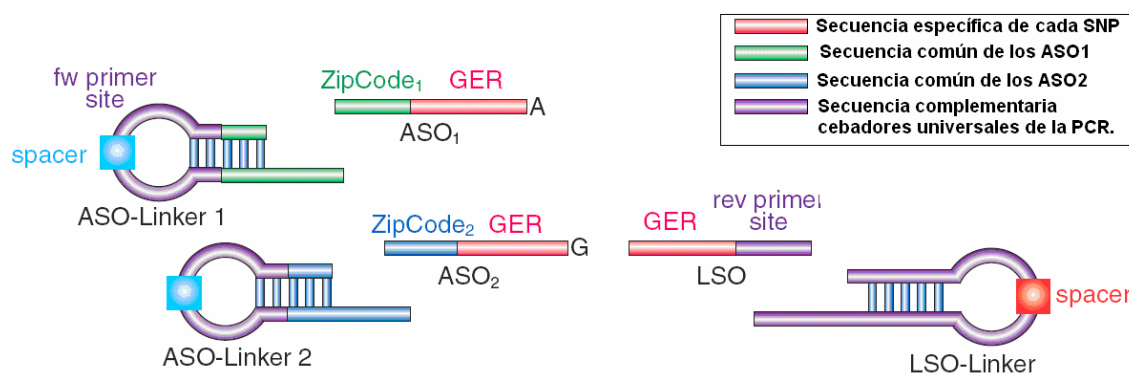
4.5.3.2 Activación de los Oligonucleótidos y Ensayo de Ligación de Oligonucleótidos

El principio de la reacción de ligación de oligonucleótidos se basó en el método desarrollado alrededor de la década de los 90, la reacción en cadena de la ligación. Esta técnica se usa para la discriminación alélica de un SNP, en la que se utilizan dos oligonucleótidos cada uno con el nucleótido de cada alelo del SNP a determinar en el extremo 3' (ASO1 y ASO2) y un oligonucleótido común que se une a la región adyacente del SNP (LSO).

Las reacciones de OLA/PCR se llevaron a cabo en un termociclador dual 384-well GeneAmp9700 (Applied Biosystems, Foster) siguiendo las instrucciones de uso del fabricante.

La mezcla de reacción contenía 2.5 µl de OLA master mix (2X), 0.5 µl de dATP (100X) para activar los oligonucleótidos, 0.10 µl de la mezcla de oligonucleótidos ASO y LSO (consta de 150 tipos oligonucleótidos distintos; tres por cada SNP a determinar más dos control interno), 0.05 µl de la mezcla de oligonucleótidos de enlace (son fragmentos de ADN que se unen a un región común a todos los ASO y LSO y evita que éstos se degraden en el paso de la purificación) hasta un volumen final de 3 µl por pocillo (Fig.4.5). A esta mezcla se añadieron 2 µl de ADN fragmentado y ajustado a la concentración final adecuada.

Figura 4.5. Tipos de oligonucleótidos que componen la mezcla del OLA.



El OLA consta de una serie de ciclos repetidos, de hibridación de oligonucleótidos y de ligación, para generar múltiples copias de la secuencia de ácidos nucleicos elegida como diana. Previamente se debía activar los oligonucleótidos para poder utilizarlos en el OLA. Esta activación se realizó fosforilando los extremos 5' de los oligonucleótidos al subir la temperatura a 48°C durante 30 min. Seguidamente, se prosiguió con el OLA en las siguientes condiciones:

- Desnaturalización y activación de la ligasa a 90°C durante 20 min.
- A continuación se procedió a ligar los fragmentos de cada polimorfismo, que consistió en 25 ciclos de

	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Desnaturalización	94	15
Hibridación	60	30
Ligación	51*	30

- Y por último la desactivación de la ligasa a 99°C durante 10 minutos.

* El paso de Ligación a 51°C se debe producir con una rampa lenta de un 3%, para que la eficiencia de la reacción sea mayor.

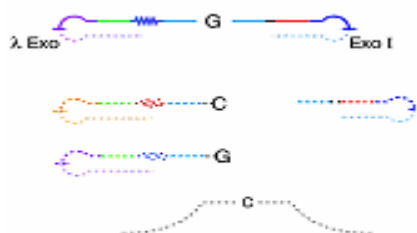
4.5.3.3 Purificación de los Productos de la Ligación por Digestión con Exonucleasas

Para purificar el producto de la ligación se empleó la purificación enzimática donde se combinaron dos exonucleasa para digerir los productos no ligados, oligonucleótidos parcialmente ligados, porciones de los productos de la reacción de ligación que no fueron protegidas por los linkers y ADN genómico (Figura 4.6).

Se preparó una mezcla de volumen final 5 µl, que contenía 0.5 µl de tampón de las exonucleasa 10X, 0.2 µl de la Exonucleasa Lambda, 0.1 µl de la Exonuclease I y 4.2 µl agua libre de nucleasa.

La mezcla se añadió a los 5 uL de producto de la ligación, se centrifugó 1 min. a 2000 r.p.m, y se transfirió en la misma placa al termociclador donde se incubó 90 minutos a 37°C y 10 minutos a 80°C., para desactivar las enzimas. Por último, cuando acabó la reacción, las muestras se dejaron a 4°C hasta proceder al siguiente paso.

Figura 4.6. Purificación con exonucleasas.



4.5.3.4 Amplificación de los Productos Purificados de la Reacción de la Ligación.

La reacción de PCR contenía 2 µl del producto de la ligación purificado (diluido 1:1.5, en agua ultrapura (ultraPure Distilled Water, Gibco, Scotland)), 7.9 µl de tampón de reacción 2X, 0.79 µl de cada cebador 20 X. Los cebadores para esta reacción son universales, además el cebador 5' esta biotinilado. La PCR se llevó a cabo en el termociclador dual 384-well GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster) y las condiciones fueron las siguientes:

- Desnaturalización y activación de la Taq polimerasa a 95°C durante 12 min.
- A continuación se procedió a amplificar los fragmentos de cada polimorfismo, que consistió en 30 ciclos de

	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Desnaturalización	95	15
Hibridación	60	15
Elongación	72	45

- Por último, la extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

4.5.3.5 Captura de los amplicones biotinilados

Se transfirieron 3 μL del producto de PCR biotinilado a una placa de 384 pocillos recubiertos de estreptavidina (SNPlex™ System 384 Well Hybridization Plates, Applied Biosystems, Foster) que permitió su captura al añadir una mezcla de hibridación que contenía 17 μL del tampón de hibridación junto con 0.009 μL del control positivo de hibridación. La mezcla se incubó durante 30 min. en constante movimiento rotacional a temperatura ambiente.

Tras la incubación, se añadió 50 μL de NaOH 0.1 N (Sigma-Aldrich, Steinheim), agente desnaturizante que separa la doble hélice del ADN y solo se mantiene unido a la placa una de las hebras. Las hebras que no estén unidas serán eliminadas tras varios lavados de las placas de hibridación con 100 μL de una dilución 1:10 de *Wash buffer* 10X (Applied biosystems, Foster) en agua destilada. El lavado de las placas se realizó en el lavador de placas (ELx405™ Microplate Washer, Bio-tek, Santa Barbara).

4.5.3.6 Hibridación de las sondas ZipChute™ a las secuencias ZipCode™

En este paso, el producto de la PCR capturado en la placa de hibridación se unió a unas sondas fluorescentes específicas (Sondas *ZipChute*), que se utilizan para decodificar la información del genotipo de cada polimorfismo estudiado.

Cada sonda *ZipChute* contiene (Fig. 4.7):

- Una secuencia llamada *ZipCode*: Esta secuencia se une a una zona complementaria de una región de los productos de PCR y adyacente al polimorfismo.
- Modificadores de Movilidad: Cada sonda contiene un número de diferentes modificadores de movilidad, que permiten su separación por tamaño durante la electroforesis.

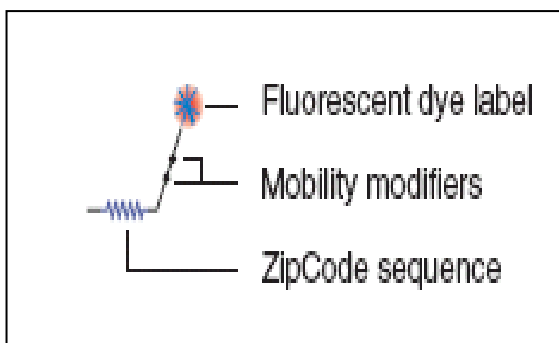


Figura 4.7. Partes funcionales de una sonda *ZipChute*.

- Un fluoróforo: El marcaje fluorescente permite que el analizador de ADN 3730 detecte cada sonda.

Las sondas *ZipChute* están dispuestas en pares, cada uno de ellos en representación de ambos alelos de un SNP.

Se preparó una mezcla que contenía 13.7 μL tampón de dilución de *Zipchute* (*Zipchute Dilution Buffer*, Applied biosystems, Foster), 11.5 μL de desnaturizante (*Denaturant*, Applied biosystem, Foster city) y 0.05 μL de la mezcla de las sondas *Zipchutes*. Seguidamente se añadió 25 μL de esta mezcla a cada pocillo de la placa de hibridación y se incubó a 37°C durante una hora en constante movimiento rotacional en un agitador incubador orbital (*Shaker Incubator DTS-4*, ELMI, Riga).

Tras la incubación, se eliminaron las sondas que no habían sido hibridadas con tres lavados de 100 μ L con una dilución 1:10 de Wash buffer 10X (Applied biosystems, Foster) en agua destilada. El lavado de las placas se realizó en el lavador de placas (ELx405™ Microplate Washer, Bio-tek, Santa Barbara).

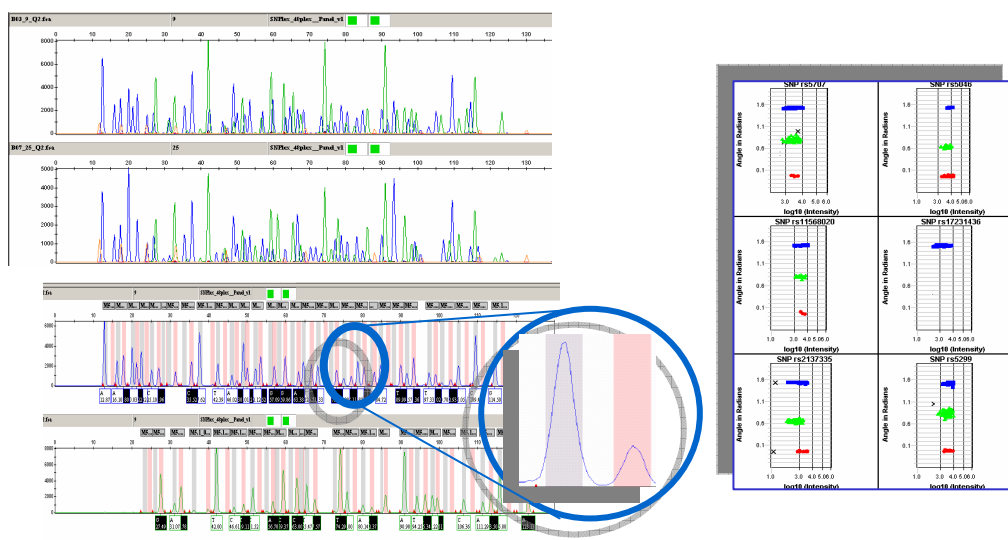
4.5.3.7 Electroforesis capilar de las sondas Zipchutes y análisis de los resultados

Se añadieron 16.91 μ L del tampón de cargar de las sondas en el secuenciador junto 0.59 μ L de marcador de tamaños (LIZ® labelled SNPlex™ internal size standard, Applied Biosystems, Foster city). Tras incubar la placa durante 10 min. a 37°C en el agitador de placas, se transfirieron 7 μ L de cada pocillo a una nueva placa para llevar a cabo la separación electroforética en el secuenciador automático (3730 DNA Analyser, Applied Biosystems, Foster city).

Los picos de cada pareja, que se observaron tras la separación, se utilizaron para identificar los alelos de los correspondientes SNPs. Ya que cada alelo en un locus está representado por el mismo color, el sistema SNPlex utiliza tanto el tamaño como el color de la sonda para resolver los alelos en un locus.

El Sistema de hibridación de SNPlex contiene una mezcla de sondas ZipChute universales, que puede ser usado para todas las reacciones múltiplex. Estas sondas universales constituyen una biblioteca de alelos de referencia, llamadas escalera alélica, que se utiliza para normalizar los parámetros gracias al software GeneMapper versión 3.7 (Applied Biosystems, Foster), ayudando a simplificar y asignar los nombres de cada alelo de forma automática. (Fig. 4.8)

Figura 4.8. Electroferograma para una separación electroforética de SNPlex, asignación de alelos para cada polimorfismo y agrupación de genotipos para un polimorfismo concreto.



4.6 Análisis Estadísticos de los Datos

Con el fin de clasificar, representar, resumir los datos obtenidos y finalmente realizar inferencias, se utilizaron un amplio conjunto de métodos de análisis.

Los valores están expresados como media \pm error estándar (SEM), o como proporciones.

4.6.1 Estadística Descriptiva

Mediante el uso de distintas herramientas de estadística descriptiva se analizó el conjunto de datos obtenidos durante el periodo experimental. Con ayuda del paquete de análisis estadístico SPSS versión 15.0 (SPSS Inc. Headquarters, Chicago) se calcularon los parámetros básicos descriptivos como las medidas de posición (media, mediana) medidas de dispersión (varianza, desviación típica), histogramas y cálculo de intervalos de confianza.

Se calculó el coeficiente de Pearson para evaluar la relación entre dos variables cuantitativas con distribución normal, y coeficiente de correlación de Spearman entre dos variables cuantitativas que no se ajustaban a una distribución normal.

4.6.2 Test No Paramétricos

Tras testar la normalidad de las variables cuantitativas usando los test de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilks, y observar que algunas variables no seguían una distribución normal, nos decantamos por la realización de test no paramétricos. Fue el caso de la excreción urinaria de albúmina (EUA), que se normalizó mediante una transformación logarítmica de los datos. Condición que es necesaria para algunos análisis no paramétricos como el ANOVA o análisis de regresión.

La prueba de Kruskal-Wallis se utilizó para comparar la varianza de las medias de variables continua en tres o más muestras independientes cuando alguno de los tamaños muestrales era inferior a 30.

4.6.2.1 Chi-Cuadrado y Equilibrio de Hardy -Weinberg

El cálculo del tamaño muestral en la población general de Valladolid se realizó mediante el uso de los datos poblacionales más recientes presentados por el Instituto Nacional de Estadística (INE) en 2003 (National Statistics Institute, 2005). Para un intervalo de confianza del 95% y una imprecisión del 1%, la muestra representativa de personas debía ser de 1486 habitantes. Los datos obtenidos en relación con la distribución del

censo se contrastaron con la distribución teórica de la población. Tal contraste se realizó con una prueba Chi-cuadrado.

El equilibrio Hardy-Weinberg (HW) fue testado mediante la comparación de las frecuencias genotípicas esperadas y observadas utilizando también la distribución chi-cuadrado con un grado de libertad para alelos y dos grados de libertad para genotipos. El equilibrio HW fue lo primero que se hizo antes de comenzar el análisis de asociación entre polimorfismos genéticos y enfermedad, ya que esto permite evaluar la independencia entre los alelos heredados de los padres y observar si existe alguna segregación en la población.

4.6.3 Estudio de Asociación y Análisis de Haplotipos

La diferencia entre genotipos para variables continuas (PAS, PAD, Parámetros de EO y niveles de ARNm) se analizó mediante análisis de la variancia de una vía (ANOVA) considerando el ajuste por las posibles variables de confusión (edad, sexo e índice de masa corporal (IMC)) a través de un modelo lineal generalizado. En este tipo de análisis los individuos que estaban siendo tratados con antihipertensivos fueron eliminados del análisis. Este modelo permite estimar la significación estadística de la prueba de tendencia lineal entre genotipos, así como incorporar la corrección por múltiples comparaciones a través de la prueba de Bonferroni o del método “*false discovery rate*” (Benjamín y Hochberg, 1995).

Para calcular los factores relacionados con las diferentes variables (cambios en el peso corporal, microalbuminuria, etc.) durante el seguimiento y la posible interacción de los genotipos con los tratamientos hipertensivos, se ajustaron modelos de regresión lineal múltiple con términos de interacción. La asociación entre los polimorfismos y las diferentes variables fue examinada usando un modelo de herencia codominante de los alelos.

Los datos de la EUA fueron analizados de dos formas. Primero los valores de la EUA fueron categorizados en normoalbuminuria y microalbuminuria con los valores definidos anteriormente. Segundo, como variable continua con transformación logarítmica para normalizar los datos (LogUAE). ANOVA de una vía fue usado para comparar los parámetros entre pacientes con y sin microalbuminuria y entre pacientes con genotipos diferentes, estos análisis fueron ajustados por edad, sexo, IMC, PAS y niveles de glucosa. En este caso, también los sujetos que habían sido tratados fueron retirados del análisis.

Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

4.6.3.1 Análisis de Regresión Logística

Con el fin de determinar los factores que pueden estar contribuyendo en la aparición de una determinada manifestación fenotípica (microalbuminuria o hipertensión) se aplicó el estudio caso-control, mediante la comparación de un grupo de individuos portadores de dicha manifestación (grupo de casos) y un grupo de no portadores (grupo de controles).

En los estudios que llevamos a cabo se aplicó un modelo de regresión logística ya que la metodología de la regresión lineal no es aplicable debido a que la variable respuesta es de tipo dicotómica. Por otra parte, una de las características que hacen tan interesante la regresión logística es la relación que guarda con un parámetro de cuantificación de riesgo conocido en la literatura como odds ratio.

Mediante el software SNPstats (Solé *et al.* 2006) se realizó la comparación en la distribución de genotipos en las poblaciones analizadas asumiendo un diseño caso-control (hipertensos con y sin microalbuminuria y población general con y sin hipertensión). Además mediante SNPstats se realizó un test de asociación entre los genotipos y la respuesta a una variable asumiendo tres modelos genéticos: i) modelos codominante, que compara todos los pares de genotipos, ii) el modelo dominante, que compara los homocigotos del alelo como con los heterocigotos más los homocigotos del alelo poco frecuente y iii) el modelo recesivo que compara los alelos poco frecuente con los heterocigotos más los homocigotos del alelo frecuente. Todos los análisis fueron corregidos por la siguientes covariables: edad, IMC y género, si correspondía. En el caso de la microalbuminuria, también fueron ajustados por niveles de glucosa y PAS.

4.6.3.2 Análisis de Haplotipos

4.6.3.2.1 Desequilibrio de Ligamiento y Haplotipos

Para determinar el desequilibrio de ligamiento, calculamos el valor estadístico D, que es la desviación entre la frecuencia del haplotipo esperado (bajo el supuesto de no asociación) y la frecuencia observada. Aunque resulta más útil obtener el parámetro de D', que es el valor escalable al rango [-1,1] del estadístico D, y el coeficiente de correlación entre los alelos (R^2). Estos datos fueron obtenidos gracias al programa SNPstats y Haploview (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) (Barrett *et al.* 2005).

4.6.3.2 Análisis de Asociación de Haplotipos

El conjunto de polimorfismos que se transmiten juntos se denomina haplotipo. Dada la muestra de genotipos, cada persona tiene dos posibles haplotipos, uno por cada cromosoma. Debido a la dificultad de conocer cual de los dos cromosomas viene de cada progenitor cuando un individuo tiene al menos dos polimorfismos heterocigotos, los haplotipos se deben calcular recurriendo a los métodos de estimación de haplotipos, como el algoritmo EM (Expectation Maximization algorithm) o los métodos Markov Chain Monte Carlo.

Mediante Haploview (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) (Barrett *et al.* 2005) fueron realizadas las inferencias de haplotipos y sus frecuencias, a partir de los genotipos obtenidos de cada individuo de las poblaciones estudiadas.

Los análisis de asociación con las variables respuestas como hipertensión o microalbuminuria categorizada fueron calculados con el programa SNPstats mediante regresión logística. El riesgo de cada haplotipo se compara respecto a la categoría de referencia, el haplotipo más frecuente.

4.6.3.3 Evaluación de Falsos Positivos: “*False Positive Report Probability*”

Además, se utilizó la probabilidad de dar un informe de falso positivo mediante la aplicación *False Positive Report Probability* (FPRP) (Wacholder *et al.* 2004). Este tipo de estadístico es útil para llevar a considerar una verdadera asociación entre los polimorfismos y haplotipos con el fenotipo. Este método tiene en cuenta la probabilidad previa de cada SNP y el p-valor observado, para una potencia estadística calculada para cada polimorfismo y para poder detectar una odds ratio mínimo de 1.5 (o su recíproco, 0.67). Un umbral del 0.2 o inferior de la probabilidad de dar un informe de falsos positivos se consideró una asociación significativa.

4.6.4 Interacción Gen-Gen: MDR

Por ultimo, gracias al empleo del método “*Multifactor Dimensionality Reduction*” (MDR) (Ritchie *et al.* 2001) se determinó la epistasis entre SNPs de diferentes genes. La estrategia no paramétrica de este método es reducir la dimensión multifactorial a uno mediante la agrupación de los diferentes genotipos en dos grupos de riesgo: alto y bajo. Estos análisis se evaluaron con el software libre MDR versión 1.1.0 desarrollado por Hahn y cols (<http://sourceforge.net/projects/mdr>) (Hahn *et al.*, 2003).

El genotipo de la combinación obtenido por el método de MDR fue re-evaluado con una prueba Chi-cuadrado en la población total. Por otra parte, las diferencias en las variables cuantitativas para cada combinación de genotipos definida por el método MDR fueron evaluadas por ANOVA.

4.7 Búsqueda de Fuentes de Información

La búsqueda de información se llevó a cabo consultando las siguientes fuentes y bases de datos en Internet:

1. Búsqueda en Pubmed a través de Internet, servicio proporcionado por la *National Library of Medicine* y los *National Institutes of Health de E.E.U.U.*, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>).
2. The *HapMap database* es un catálogo de las variaciones genéticas comunes en seres humanos, dividido en cuatro poblaciones, y así se identifican SNPs distintivos para cada una, proporcionando una rica fuente de información para el diseño de estudios de asociación. (<http://www.hapmap.org/>)
3. The *Single Nucleotide Polymorphism database* (dbSNP) es un archivo de dominio público que contiene una amplia colección de información sobre polimorfismos genéticos.
4. *Ensembl* es un proyecto conjunto entre EMBL - EBI y el Instituto Sanger para desarrollar un sistema de software que produce y mantiene automáticamente la anotación sobre determinados genomas eucarióticos (www.ensembl.org/).

4.8 Justificación Ética del Estudio

El estudio se desarrolló siguiendo las normas internacionales para evaluación ética de estudios de investigación biomédica en sujetos humanos (OPS/OMS, 1996). Los participantes fueron informados de los objetos del estudio y de la voluntariedad de su participación, respetando el derecho a la intimidad de los encuestados y su derecho a retirar sus datos y muestras del mismo, si así lo solicitaran posteriormente.

Durante la entrevista, llevada a cabo por los médicos del equipo investigador, se recabó el consentimiento informado por escrito para destinar parte del suero y plasma a otros proyectos de investigación, comprometiéndonos en todo momento a guardar la confidencialidad de los datos personales y a comunicar a los sujetos participantes todos los datos que pudieran tener interés para su salud.

Resultados

5. Resultados

Esta parte de la tesis doctoral se ha estructurado en tres grandes apartados: estudio de niveles de marcadores de estrés oxidativo (EO), estudio de niveles de ARNm de genes que codifican proteínas que producen o eliminan agentes oxidantes y estudio de polimorfismos implicados en enzimas que producen o eliminan EO.

Dentro de cada subapartado se describe de forma detallada la población de estudio utilizada, las asociaciones encontradas más relevantes con respecto a los niveles de presión arterial (PA) e hipertensión y, por otra parte, a los niveles de excreción urinaria de albúmina (EUA) y microalbuminuria (mALB).

5.1 Estudio de Niveles de Estrés Oxidativo en Hipertensión

Para la realización de este estudio utilizamos la población de sujetos normotensos e hipertensos con seguimiento a tres meses. A continuación se presentan los resultados obtenidos más significativos en cada apartado.

5.1.1 Características Generales de la Población de Estudio

Las características clínicas y bioquímicas de los controles y pacientes de hipertensión al inicio del estudio y tras 3 meses de seguimiento médico se pueden observar en la tabla 5.1.

Esta parte del estudio se llevó a cabo con 69 sujetos hipertensos, todos ellos en ausencia de tratamiento antihipertensivo, y 32 voluntarios control.

Tabla 5.1. Principales características clínicas y perfiles bioquímicos de los controles y pacientes al iniciar el estudio y tras 3 meses de seguimiento.

Variables	Normotensos (n=32)	<i>p</i> *	Hipertensos (n=69)	<i>p</i> **	Hipertensos 3 meses (n=39)
Edad, años	43.2±2.5	ns	46.1±1.5	ns	47.1
Género (M/F)	17/15	ns	35/34	ns	20/19
IMC (kg/m ²)	26.3±0.25	ns	29.3±0.5	ns	28.9±0.9
PAS (mmHg)	127.6±2.3	p<0.001	155.1±3.1	p<0.001	135.4±3.2
PAD (mmHg)	75.9±1.7	p<0.001	97.6±2.2	p<0.001	86.3±3.1
PAS 24h (mmHg)	--	--	140.2±2.1	p<0.001	125.3±2.9
PAD 24h (mmHg)	--	--	89.9±1.6	p<0.001	77.9±1.4
Glucemia (mg/dl)	96.1±1.2	ns	103.1±3.2	ns	99.4±1.6
Colesterol-Total (mg/dl)	196.3±3.2	ns	206.1±4.2	ns	208.2±4.0
Colesterol-HDL (mg/dl)	48.2±0.5	ns	44.0±1.2	ns	44.3±1.3
Triglicéridos (mg/dl)	121.8±9.2	ns	137.2±9.9	ns	144.3±10.1
EUA (mg/24h)	--	--	24.4±3.6	p<0.05	14.8±1.6
LogEUA	--	--	1.10±0.05	ns	0.98±0.04
MALB, %	--	--	22.0	p<0.05	13.0

Valores son media ± error estándar.

*p**: *p*-valor de la diferencia entre controles y sujetos hipertensos, *p****p*-valor de la diferencia entre sujetos hipertensos en ausencia y tras 3 meses de tratamiento. IMC: Índice de Masa Corporal; PAS: Presión arterial sistólica; PAD: Presión arterial diastólica; EUA: Excreción Urinaria de Albúmina; LogEUA: Logaritmo de la Excreción Urinaria de Albúmina.

Los sujetos control eran normotensos y presentaban valores ligeramente menores de colesterol total comparados con los hipertensos. No existían diferencias significativas en variables como edad, proporción de géneros, índice de masa corporal y perfil bioquímico.

La EUA se correlacionó positivamente y de forma significativa con los valores clínicos de PAS y PA ambulatoria. Como se puede ver en la tabla 5.2, los valores de la PA 24h presentan una correlación positiva significativa con el logaritmo de la EUA.

Tabla 5.2. Correlación entre presión y LogEUA.

Variables	R con LogEUA	p-valor
PAS, mmHg	0.19	p<0.05
PAD, mmHg	0.12	ns
PAS 24h, mmHg	0.29	p<0.01
PAD 24h, mmHg	0.21	p<0.05

Los sujetos hipertensos después de tres meses de tratamiento antihipertensivo experimentaron una reducción importante de sus valores de PA clínica y ambulatoria y en el porcentaje de sujetos microalbuminúricos (Tabla 5.1).

5.1.2 Asociación de Parámetros Estrés Oxidativo, Hipertensión y Valores de Presión Arterial

La evaluación del EO por medio de la cantidad de subproductos de EO, se realizó tanto en plasma como en células mononucleares de controles y sujetos hipertensos. Se determinaron las concentraciones de GSH, GSSG, MDA y 8-oxodG, se calculó el cociente GSSG/GSH y el GSH total como el resultado de GSH+ 2GSSG (Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Parámetros de Estrés Oxidativo en sangre y en células mononucleares de controles, hipertensos al comienzo del estudio y tras 3 meses de tratamiento antihipertensivo.

	Normotensos (n=32)	p*	Hipertensos (n=69)	p**	Hipertensos 3 meses (n=39)	p***
<i>Plasma</i>						
GSH, $\mu\text{mol/g Hb}$	5.6 \pm 0.3	<0.001	3.3 \pm 0.1	<0.001	6.5 \pm 0.1	ns
GSSG, $\mu\text{mol/g Hb}$	1.4 \pm 0.2	<0.001	3.91 \pm 0.08	<0.001	2.3 \pm 0.09	<0.01
GSSG/GSH	0.22 \pm 0.1	<0.001	1.33 \pm 0.1	<0.001	0.37 \pm 0.05	ns
Glutación total, $\mu\text{mol /mg Hb}$	8.5 \pm 0.5	ns	11.2 \pm 0.2	ns	11.1 \pm 0.2	ns
MDA, $\mu\text{mol /g Hb}$	0.18 \pm 0.02	<0.001	0.84 \pm 0.04	<0.001	0.29 \pm 0.08	<0.01
<i>Células Mononucleares</i>						
GSH, $\mu\text{mol /mg prot}$	25.1 \pm 1.7	<0.001	15.8 \pm 0.5	<0.001	24.1 \pm 0.4	ns
GSSG, $\mu\text{mol /mg prot}$	0.1 \pm 0.02	<0.001	1.1 \pm 0.05	<0.001	0.4 \pm 0.01	<0.01
GSSG/GSH	0.01 \pm 0.01	<0.001	0.08 \pm 0.01	<0.001	0.02 \pm 0.02	<0.01
Glutación total, $\mu\text{mol /mg prot}$	25.3 \pm 1.7	<0.001	17.9 \pm 0.4	<0.001	24.9 \pm 0.4	ns
MDA, $\mu\text{mol /mg prot}$	0.14 \pm 0.1	<0.001	0.73 \pm 0.2	<0.001	0.32 \pm 0.09	<0.01
8-oxo-dG/ dG ADNn	3.0 \pm 0.3	<0.001	6.94 \pm 0.15	<0.001	4.49 \pm 0.12	<0.01

Valores son media \pm error estándar.

p*: p-valor de la diferencia entre controles y sujetos hipertensos, p**: p-valor de la diferencia entre sujetos hipertensos en ausencia y tras 3 meses de tratamiento, p***: p-valor de la diferencia entre sujetos control y hipertensos tras 3 meses de tratamiento. GSH: Glutación reducido; GSSG: Glutación oxidado; MDA: Malondialdehído; Hb: Hemoglobina; proteína; 8-oxo-dG: 8-Hidroxi 2-Desoxiguanosina; ADNn: Ácido desoxirribonucleico nuclear. El valor de 8-oxo-dG se expresa en el número de bases de desoxiguanosinaoxidadas / 10^6 .

El plasma de los sujetos hipertensos mostró valores significativamente más bajos de GSH y más altos de GSSG y MDA circulantes que los observados en el grupo control.

En las células mononucleares periféricas, se encontró un patrón similar al observado en el plasma. Los niveles de GSSH y la relación GSSG/GSH fueron significativamente más altos en los hipertensos que en los sujetos control.

Tras ser tratados los individuos hipertensos mostraron unos valores de EO próximos a los de los voluntarios control tanto en plasma como en células mononucleares y solo en los niveles GSH y en la relación GSSG / GSH no se encontraron diferencias significativas entre estos grupos. Esto indicaría que los sujetos con hipertensión tienen mayores niveles de EO y el tratamiento a tres meses los reduce. Los pacientes fueron tratados de forma aleatoria con dos tipos de fármacos antihipertensivos: Beta-bloqueantes o inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensinogeno (ECA). La diferenciación por tipo de tratamiento no presentó diferencias estadísticas significativas para los distintos marcadores de EO.

Se analizó la relación entre los valores de PA y marcadores de EO en situación basal. El coeficiente de correlación de Pearson entre las diferentes medidas de PA y los diferentes parámetros de EO evaluados se muestra en la tabla 5.4. Los niveles de GSH se correlacionaron negativamente y de forma significativa con los valores clínicos de PA y PA ambulatoria, tanto en plasma como en células, mientras que los niveles de GSSG, la relación GSSG/GSH, MDA y la base mutagénica 8-oxodG mostraron una correlación positiva y significativa con estos valores.

Tabla 5.4: Correlación entre presión y parámetros de estrés oxidativo.

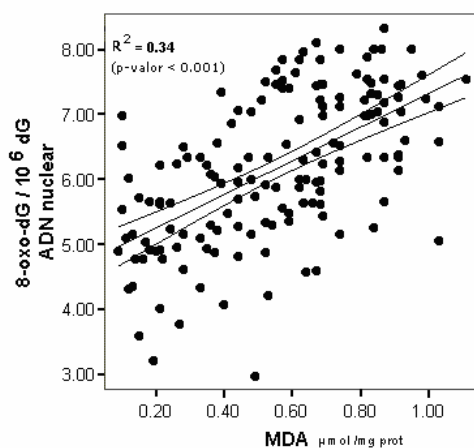
	R _{PAS}	p-PAS	R _{PAD}	p-PAD	R _{PAS 24h}	p-PAS24h	R _{PAD 24h}	p-PAD24h
<i>Plasma</i>								
GSH, $\mu\text{mol/g Hb}$	-0.446	<0.001	-0.337	<0.01	-0.386	<0.01	-0.405	<0.01
GSSG, $\mu\text{mol/g Hb}$	0.486	<0.001	0.397	<0.001	0.307	<0.05	0.325	<0.05
GSSG/GSH	0.475	<0.001	0.344	<0.01	0.370	<0.01	0.347	<0.01
Glutación total; $\mu\text{mol /mg Hb}$	0.229	ns	0.214	ns	-0.071	ns	-0.068	ns
MDA, $\mu\text{mol /g Hb}$	0.481	<0.001	0.312	<0.01	0.366	<0.01	0.296	<0.01
<i>Células Mononucleares</i>								
GSH, $\mu\text{mol /mg prot}$	-0.458	<0.001	-0.341	<0.001	-0.450	<0.001	-0.466	<0.001
GSSG, $\mu\text{mol /mg prot}$	0.409	<0.001	0.334	<0.001	0.329	<0.001	0.337	<0.001
GSSG/GSH	0.417	<0.001	0.324	<0.001	0.388	<0.001	0.395	<0.001
Glutación total; $\mu\text{mol /mg prot}$	-0.440	<0.001	-0.321	<0.001	-0.449	<0.001	-0.466	<0.001
MDA, $\mu\text{mol /mg prot}$	0.420	<0.001	0.224	<0.001	0.287	<0.05	0.038	ns
8-oxo-dG/ dG ADNn	0.382	<0.001	0.292	<0.001	0.192	ns	0.220	ns

R_{PAS}: coeficiente de Pearson con respecto a la presión arterial sistólica, p-PAS :p-valor para el coeficiente de Pearson de la presión arterial sistólica, R_{PAD}: coeficiente de Pearson con respecto a la presión arterial diastólica, p-PAD :p-valor para el coeficiente de Pearson de la presión arterial diastólica, R_{PAS24h}: coeficiente de Pearson con respecto a la presión arterial sistólica ambulatoria, p-PAS24h :p-valor para el coeficiente de Pearson de la presión arterial sistólica 24h, R_{PAD24h}: coeficiente de Pearson con respecto a la presión arterial diastólica 24h, p-PAD24h :p-valor para el coeficiente de Pearson de la presión arterial diastólica 24h.

5.1.3 Relación entre los Parámetros de Estrés Oxidativo en Hipertensión

Tras analizar las asociaciones entre los distintos parámetros de EO, se observó una correlación significativamente positiva entre las mediciones de MDA y 8-oxo-dG genómico (Figura 5.1). Para estos parámetros, los hipertensos mostraron valores más altos que los observados en los sujetos control (Tabla 5.3). Estos resultados demostraron el impacto de las EROs sobre los lípidos y la inducción de modificaciones del ADN, ya que el MDA y el 8-oxo-dG, representan una estimación de la peroxidación lipídica y de la oxidación del ADN nuclear, respectivamente.

Figura 5.1 Relación entre MDA y 8-oxo-dG genómico (A) en células mononucleares de sujetos hipertensos.



5.1.4 Asociación de Parámetros Estrés Oxidativo y Microalbuminuria

En este apartado comparamos las diferencias entre sujetos hipertensos con o sin mALB y sus niveles cuantitativos, la EUA, en situación basal. En la tabla 5.5 se muestra las características de la subpoblación de hipertensos.

Tabla 5.5 Características generales de los pacientes hipertensos en estado basal agrupados por EUA

	No mALB (n=44)	p*	mALB (n=25)
Edad, años	46.9±1.4	ns	47.9±2.1
Genero (M/F)	23/21	ns	12/13
IMC (kg/m ²)	28.8±0.5	ns	30.1±0.6
PAS (mmHg)	157.6±2.1	ns	161.5 ±4.1
PAD (mmHg)	95.4±1.5	ns	101.2±2.5
PAS 24h (mmHg)	138.5±1.8	<0.05	146.3±3.4
PAD 24h (mmHg)	86.9±1.2	<0.01	93.5±2.3
Glucemia (mg/dl)	100.3±1.4	ns	105.7±2.2
EUA (mg Glutación total /24h)	10.6±0.9	<0.0001	68.5±9.6
Log EUA	0.93±0.27	ns	1.76±0.28

Valores son media ± error estándar.

No mALB: normoalbuminúricos, mALB: microalbuminúricos, p*: p-valor de la diferencia entre normoalbuminúricos y microalbuminúricos. IMC: Índice de Masa Corporal; PAS: Presión arterial sistólica; PAD: Presión arterial diastólica; EUA: Excreción Urinaria de Albúmina; LogEUA: Logaritmo de la Excreción Urinaria de Albúmina.

Como se muestra en la Tabla 5.5, al dividir los pacientes entre normoalbuminúricos y microalbuminúricos, se observó que los individuos microalbuminúricos tenían mayores niveles de PA de 24 horas, y la diferencia en glucemia roza la significación (p-valor 0.058) en una ANOVA de una vía.

Los marcadores de EO analizados entre sujetos hipertensos normoalbuminúricos y microalbuminúricos, se muestran en la tabla 5.6.

Tabla 5.6 Parámetros de Estrés Oxidativo en sangre y en células mononucleares de sujetos hipertensos con y sin presencia de mALB al comienzo del estudio.

	No mALB	p*	mALB
<i>Plasma</i>			
GSH †	3.3±0.1	ns	3.4±0.3
GSSG †	3.8±0.1	ns	4.0±0.2
GSSG/GSH	1.3±0.1	ns	1.4±0.2
Glutación total †	10.9±0.3	ns	11.5±0.5
MDA†	0.71±0.04	ns	0.59±0.05
<i>Células Mononucleares</i>			
GSH ¥	18.3±0.1	<0.01	13.6±1.2
GSSG ¥	0.83±0.05	ns	0.91±0.09
GSSG/GSH	0.052±0.004	<0.01	0.08±0.01
Glutación total ¥	20.01±0.9	<0.01	15.5±1.0
MDA¥	0.54±0.03	ns	0.51±0.06
8-oxo-dG	6.2±0.2	ns	5.9±0.0.3

Valores son media ± error estándar.

No mALB: No microalbuminúricos, mALB: microalbuminúricos. p*: p-valor de la diferencia entre normoalbuminúricos y microalbuminúricos. † μmol/g Hb, ¥ μmol /mg prot, 8-oxo-dG: 8-oxo-dG/ dG nDNA.

Como puede apreciarse en la tabla 5.6, en las células mononucleares se produce un marcado incremento de EO evidenciado por el cociente GSSG/GSH y el glutatión total en pacientes hipertensos microalbuminúricos frente a los normoalbuminúricos. Este incremento de EO es debido principalmente a la disminución de la concentración del GSH en estas células.

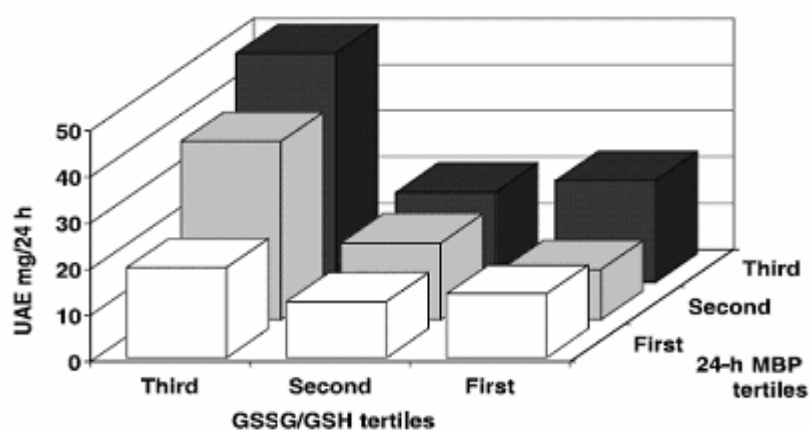
En el grupo de hipertensos bajo tratamiento no se observaron diferencias significativas en ningún parámetro analizado entre sujetos normomicroalbuminúricos y microalbuminúricos.

5.1.5 Interacción entre Presión Arterial y Estrés Oxidativo en Presencia de Microalbuminuria

Dada la relación entre PA, el aumento de la EUA y el EO, resultaba de interés conocer si el EO podría influir en el riesgo de EUA independientemente de los valores de PA. Para ello, se realizó un estudio de regresión múltiple, donde se relacionaron la PA y el EO independientemente del aumento en la EUA.

La representación gráfica de esta relación se representa en la figura 5.2. En ella, se observa como a mayores valores de PA ambulatoria, se produce un incremento de la EUA. Además en cada nivel de PA, la máxima EUA se observa en aquellos pacientes con un mayor grado de EO, reflejado por el cociente GSSG / GSH.

Figura 5.2 Relación entre microalbúmina, relación GSSG/GSH y la presión arterial ambulatoria media en células mononucleares de sujetos hipertensos.



5.2 Estudio de Niveles de ARNm de Genes Implicados en Estrés Oxidativo

En este apartado analizamos los principales sistemas implicados en la generación de EO y en la defensa frente al mismo. Se compararon los niveles de ARN mensajero (ARNm) de cada gen de las enzimas productoras y protectoras en sujetos del grupo control e hipertensos en ausencia y presencia de tratamiento antihipertensivo para poder evaluar las diferencias que se producen en estos sistemas en la hipertensión.

En el ANEXO II se puede observar las curvas de desnaturalización que se generaron para los principales genes. Gracias a estas curvas se probó la correcta amplificación de los productos de la reacción de PCR en tiempo real en cada fragmento y en cada muestra.

5.2.1 Características Generales de la Población de Estudio

En esta parte del trabajo se utilizó la población de sujetos normotensos e hipertensos con seguimiento a tres meses. Para más detalles sobre esta población Véase el apartado 5.1.1 de la sección Resultados.

5.2.2 Asociación de Niveles de ARNm de Genes de Estrés Oxidativo e Hipertensión

El análisis de la respuesta del estado celular entre los niveles de ARNm de los principales genes de enzimas implicadas en la producción y la defensa de EO, se realizó en células mononucleares circulantes de los participantes. Como gen de referencia interna se utilizó el gen de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), por ser descrito como uno de los genes con niveles de ARNm más constantes en las células mononucleares.

La diferenciación por género y tipo de tratamiento aplicado no presentó diferencias estadísticas significativas para ninguna de las cuantificaciones realizadas.

5.2.2.1 Sistema Productores de Estrés Oxidativo

Se analizaron los niveles de ARNm de algunos componentes del complejo NAD(P)H oxidasa en células mononucleares. Los genes estudiados que codifican subunidades del complejo NAD(P)H fueron *CYBA*, *CYBB*, *NCF1*, *NCF2*, *NCF4*, *RAC1* y *RAC2*.

Como se muestra en la tabla 5.7, los niveles de ARNm de los genes *CYBB*, *NCF1*, *NCF2*, *NCF4* y *RAC2* fueron significativamente mayores en sujetos hipertensos en comparación con los controles, pero no para el gen *CYBA* ni *RAC1*.

Tras los tres meses de tratamiento se pudo observar una reducción en los niveles de ARNm de todos los componentes del complejo hasta llegar a normalizarse con respecto a los sujetos control. En el caso de los genes

CYBA, CYBB, NCF4 y RAC2 esta reducción fue muy drástica y se llegaron a obtener niveles inferiores al grupo control (Tabla 5.7).

Tabla 5.7 Niveles de ARNm para los distintos componentes del complejo NAD(P)H oxidasa, en relación a los niveles del gen GAPDH x 10² en células mononucleares de sujetos normotensos, hipertensos y tras 3 meses de tratamiento.

Gen	Normotensos (n=30)	p*	Hipertensos (n=39)	p**	Hipertensos 3 meses (n=39)	p***
CYBA	4.92±0.81	ns	5.12±1.11	<0.001	1.24±0.38	<0.01
CYBB	0.26±0.06	<0.01	0.73±0.05	<0.01	0.04±0.03	<0.01
NCF1	0.83±0.03	<0.01	1.75±0.03	<0.01	0.87±0.08	ns
NCF2	0.34±0.02	<0.001	0.81±0.03	<0.01	0.49±0.02	ns
NCF4 ^{&}	0.57±0.04	<0.001	1.73±0.03	<0.001	0.16±0.03	<0.01
RAC1	13.4±3.89	ns	15.4±1.75	<0.05	10.1±0.83	ns
RAC2	18.8±3.03	<0.05	26.0±4.3	<0.001	1.1±0.58	<0.001

Valores son media ± error estándar.

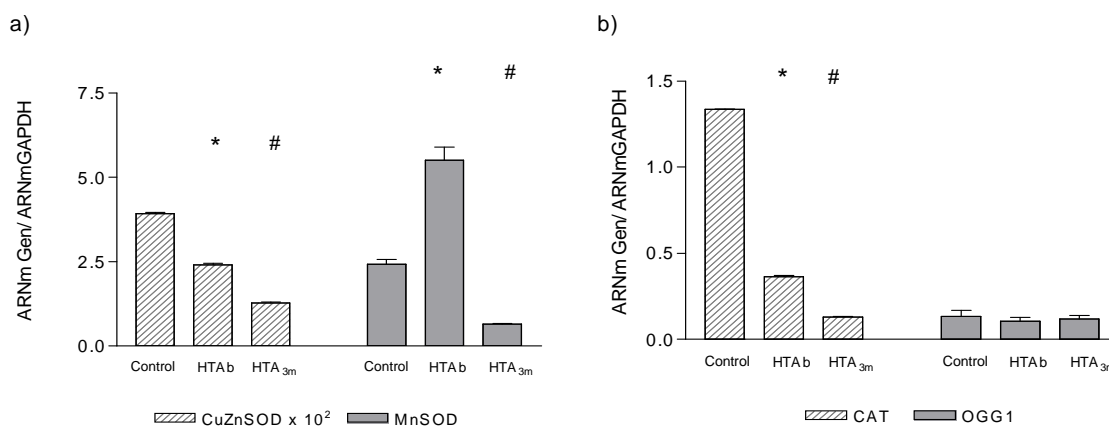
p*: p-valor de la diferencia entre controles y sujetos hipertensos, p**: p-valor de la diferencia entre sujetos hipertensos en ausencia y tras 3 meses de tratamiento, p***: p-valor de la diferencia entre sujetos control y hipertensos tras 3 meses de tratamiento. &: valor multiplicado por 10²

5.2.2.2 Sistemas Protectores frente Estrés Oxidativo

Se cuantificaron los niveles de ARNm de las principales enzimas antioxidantes: la enzima cobre-zinc superóxido dismutasa (CuZnSOD) citosólica que descompone los radicales libres del anión superóxido, transformándolos en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno y es codificada por el gen *SOD1*; enzima manganeso-superóxido dismutasa, MnSOD, mitocondrial y codificada por el gen *SOD2*; catalasa (CAT), implicada en la descomposición del peróxido de hidrógeno y por último la 8-oxoguanina glicosilasa 1 (OGG1), encargada de la eliminación de la 8-oxo-dG acumulada en el ADN. Estas medidas se realizaron en el grupo control, hipertensos basales y en los sujetos hipertensos tras ser tratado durante 3 meses.

Se observó que los niveles de ARNm de las enzimas antioxidantes tendían a ser más bajos de forma significativa en los sujetos hipertensos basales comparado con los observados en las células de los sujetos control, excepto en el caso de la enzima OGG1 que no llegaban a ser significativos y de la enzima MnSOD que estaban aumentada de forma significativa (Figura 5.3).

Figura 5.3 Niveles de ARNm para las distintas enzimas antioxidantes estudiadas, en relación a los niveles del gen GAPDH en células mononucleares de sujetos normotensos, hipertensos basales (HTAb) y tras 3 meses de tratamiento (HTA3m). a) Genes *SOD1* y *SOD2* y b) Genes *CAT* y *OGG1*. * Denota diferencias estadísticamente significativas entre sujetos control e hipertensos no tratados. # Denota diferencias estadísticamente significativas entre hipertensos tratados y no tratados.



En consecuencia, con la normalización de niveles de EO después del tratamiento, los niveles de ARNm de las enzimas antioxidantes fueron significativamente menores en pacientes hipertensos tratados que en los hipertensos basales o en controles. Incluso, en el caso de la enzima MnSOD, que fue elevado en los hipertensos y disminuyó durante el tratamiento antihipertensivo (Fig. 5.3).

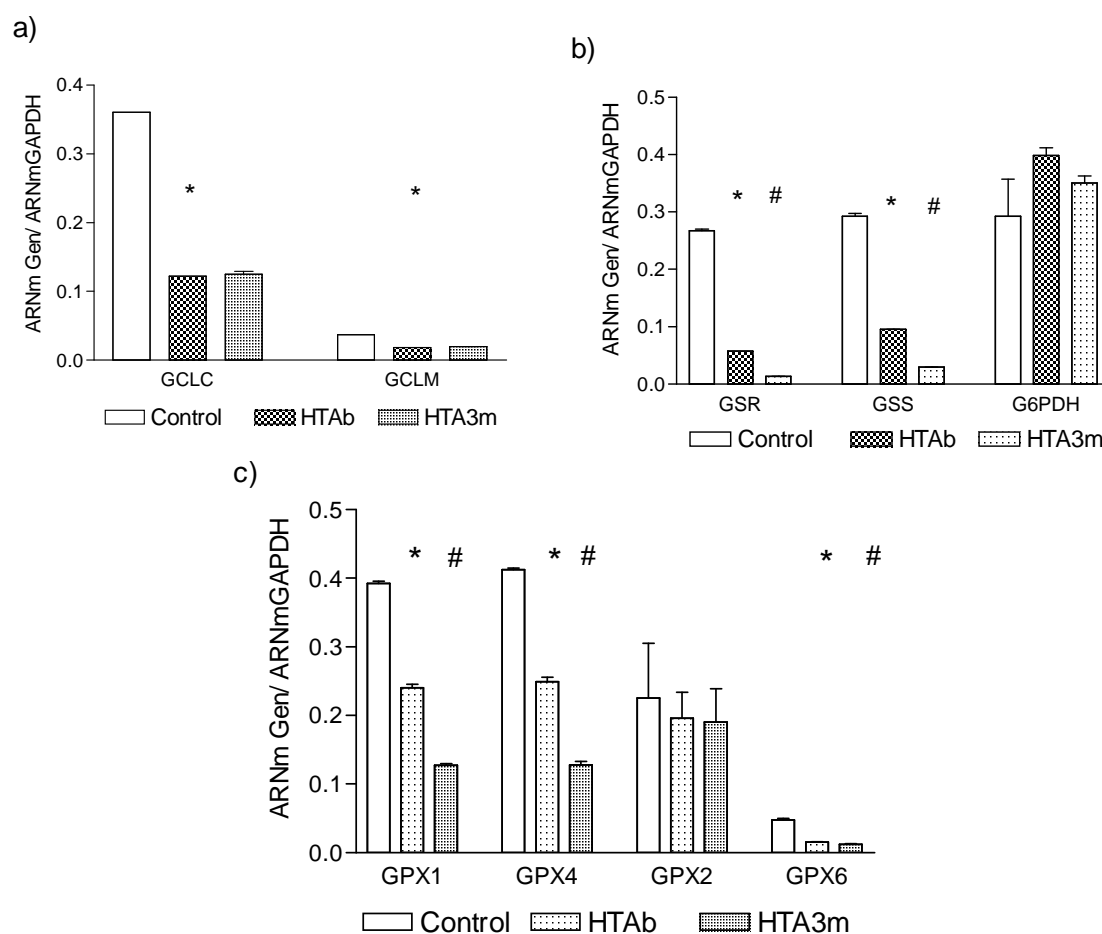
5.2.2.2.1 Sistema Glutación

Uno de los principales sistemas antioxidantes es el sistema Glutación que engloba las enzimas que intervienen en la síntesis del GSH como γ -glutamylcisteína ligasa (γ GCL) que está compuesta de una subunidad catalítica (*GCLC*) y otra reguladora (*GCLM*) y la glutatión sintasa (*GSS*), en la regeneración de la molécula (genes *GSR* y *G6PDH*) y en la utilización de ésta (genes *GPX1*, *GPX2*, *GPX4* y *GPX6*) en las células mononucleares.

En los hipertensos, los niveles de ARNm de los genes *GSS*, *GSR*, *GCLC*, *GCLM*, *GPX1*, *GPX4* y *GPX6* fueron significativamente más bajos que los observados en las células de los sujetos control, excepto en el caso de los niveles de ARNm de los genes *G6PDH* y *GPX2* donde no se observó diferencia entre ambos grupos (Figura 5.4).

Tras los tres meses de tratamiento antihipertensivo y con la consiguiente reducción de EO, los niveles de ARNm de los genes del sistema GSH también disminuyeron, la figura 5.4. No se observaron cambios en el ARNm de los genes *GCLC*, *GCLM*, *G6PDH* y *GPX2*.

*Figura 5.4 Niveles de ARNm de las enzimas relacionadas con el sistema de GSH, en relación a los niveles del gen GAPDH en células mononucleares de sujetos normotensos, hipertensos basales (HTAb) y tras 3 meses de tratamiento (HTA3m). a) gen GCLC y GCLM; b) GSR, GSS y G6PDH; c) genes GPXs intracelulares (los niveles de ARNm del gen GPX2 multiplicados por 10⁻²). Las barras de error están representados en todas las casillas, pero en algunos casos el tamaño es demasiado pequeño para ser mostradas. * Denota diferencias estadísticamente significativas entre sujetos control e hipertensos no tratados. # Denota diferencias estadísticamente significativas entre hipertensos tratados y no tratados.*



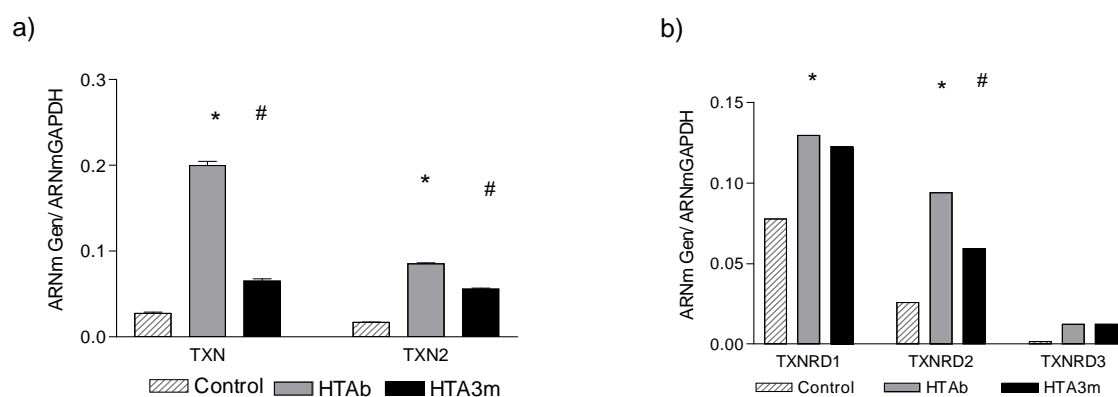
5.2.2.2 Sistema Tiorredoxina

Dentro del sistema tiorredoxina, hemos analizado las dos isoformas de la molécula tiorredoxina, codificadas por dos genes diferentes, *TXN* y *TXN2*, y las enzimas encargadas de reducir ésta molécula, las tiorredoxinas reductasas, codificadas por los genes *TXRND1*, *TXRND2* y *TXRND3*.

En contraste con el sistema glutatión, las variaciones en los niveles de ARNm de los genes del sistema TXN muestran un comportamiento distinto, como puede observarse en la figura 5.5. Tanto los niveles de ARNm de los genes *TXN* y *TXN2*, así como los de los genes *TXNRD1*, *TXNRD2* y *TXNRD3*, fueron significativamente mayores en pacientes hipertensos en comparación con los de los sujetos control.

Estos niveles de ARNm disminuyeron durante el tratamiento antihipertensivo, aunque se mantuvieron mayores que en el grupo control. Sólo los niveles de ARNm del gen *TXNRD3* se mantuvieron constantes durante el tratamiento (la figura 5.5).

Figura 5.5 Niveles de los ARNm de las enzimas relacionadas con el sistema de TXN en células mononucleares de los individuos control e hipertensos tanto en ausencia como durante el tratamiento antihipertensivo. a) TXN y TXN2; b) TXNRD1, TRXR2 y TRXR3. Las barras de error están representados en todas las casillas, pero en algunos casos el tamaño es demasiado pequeño para ser mostradas. * Denota diferencias estadísticamente significativas entre los controles y las hipertensos no tratados. ‡ denota diferencias estadísticamente significativas entre tratados y no tratados hipertensos.



5.2.3 Asociación de Niveles de ARNm y Microalbuminuria

Se comparó las diferencias entre sujetos hipertensos con o sin mALB y sus niveles cuantitativos en situación basal.

La tabla 5.8 muestra los principales resultados estadísticamente significativos de los niveles de ARNm de los diversos genes estudiados entre los hipertensos en presencia y ausencia de mALB.

Tabla 5.8 Niveles de ARNm para los distintos componentes del complejo NAD(P)H oxidasa, en relación a los niveles del gen GAPDH en células mononucleares de sujetos hipertensos normomicroalbuminúricos y microalbuminúricos.

	No mALB	p*	mALB
<i>Sistema Oxidante</i>			
CYBA	1.73±0.70	<0.05	4.25±0.65
<i>Sistema antioxidante</i>			
MnSOD+	1.50±0.50	<0.05	4.3±0.8
TXN	0.127± 0.009	<0.05	0.17± 0.01
TXN2	0.064±0.003	<0.05	0.08±0.003

Valores son media ± error estándar.

No mALB: No microalbuminúricos, mALB: microalbuminúricos. p*: p-valor de la diferencia entre normoalbuminúricos y microalbuminúricos, ns: No significativo. &: Valor multiplicado por 10², +: Valor multiplicado por 10⁻¹.

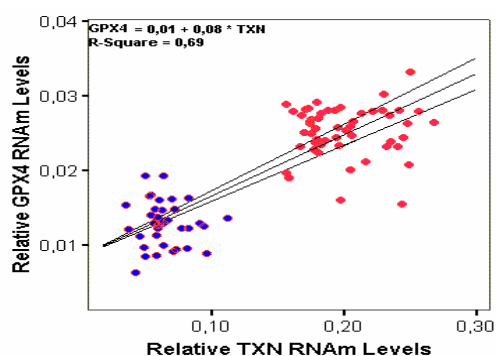
Cuando realizamos el test de Pearson para evaluar las posibles asociaciones entre los niveles de LogEUA y de ARNm de los distintos genes, solo encontramos una correlación positiva significativa entre el LogEUA y los niveles de ARNm del gen CYBB (r: 0.297, p-valor: 0.009).

5.2.4 Relación entre los Niveles de ARNm en Hipertensión

Tras analizar las asociaciones entre los distintos niveles de ARNm de éstos genes, se observó una elevada correlación directa entre los niveles de ARNm de los genes *GPX4* y *TXN* ($r = 0.871$, p -valor <0.001), tanto en situación basal como bajo tratamiento (figura 5.6). De hecho, los niveles de ARNm de *GPX4* explican el 76% ($R^2 = 0.76$) de la variabilidad de los niveles de ARNm del gen *TXN*.

Si solo analizamos los individuos hipertensos sin tratamiento, encontramos una relación lineal, positiva y significativa entre ambos niveles de ARNm ($r = 0.319$, p -valor <0.05).

Figura 5.6. Relación entre los niveles de ARNm de los genes *GPX4* y *TXN* en células mononucleares de sujetos hipertensos. Puntos en rojo indican valores en sujetos hipertensos en estado basal y puntos azules en sujetos hipertensos tratados.



5.2.5 Interacción entre Niveles de ARNm y Parámetros de Estrés Oxidativo

El análisis de correlación lineal de Spearman reveló que existía una correlación positivamente significativa entre varios marcadores de EO y los niveles de ARNm de los genes *NCF2*, *GPX4* y *TXN*, mientras que por el contrario se encontró correlación negativa significativa entre los niveles de los marcadores de EO y los niveles de ARNm del gen *SOD2* (Tabla 5.9).

En el Anexo III se presentan todas las correlaciones analizadas para la combinación de todos los genes y marcadores estudiados aunque en la tabla 5.9 se resumen las correlaciones más significativas.

Tabla 5.9: Correlación Spearman entre parámetros de EO y niveles de ARNm.

Gen	Marcador de EO	R	p-valor
<i>NCF2</i>	GSSG	0.431	0.001
	GSSG/GSH	0.377	0.005
<i>SOD2</i>	GSH	-0.391	0.009
<i>GPX4</i>	GSH	0.353	0.008
	Glutación total	0.405	0.002
<i>TXN</i>	8-oxo-dG	0.428	0.001

5.2.6 Sumario de Resultados del Estudio de Niveles de ARNm de Genes Implicados en Estrés Oxidativo

En el cuadro 5.1 se representa un resumen entre los distintos genes y la regulación que sufren los sujetos hipertensos y los hipertensos tratados.

Cuadro5.1. Resumen de regulación de los genes que codifican enzimas de sistemas oxidantes y antioxidantes en la hipertensión.

GENES	HIPERTENSIÓN*	HIPERTENSOS TRATADOS**
Sistema Oxidantes		
<i>CYBA</i>	≈	↓
<i>CYBB</i>	↑	↓
<i>NCF1</i>	↑	↓
<i>NCF2</i>	↑	↓
<i>NCF4</i>	↑	↓
<i>RAC1</i>	≈	↓
<i>RAC2</i>	↑	↓
Sistema Antioxidantes		
Generales:		
<i>SOD1</i>	↓	↓
<i>SOD2</i>	↑	↓
<i>CAT</i>	↓	↓
<i>OGG1</i>	≈	≈
Sistema GSH:		
Síntesis:		
<i>GCLC</i>	↓	≈
<i>GCLM</i>	↓	≈
Regeneración:		
<i>GSR</i>	↓	↓
<i>GSS</i>	↓	↓
<i>G6PDH</i>	≈	≈
Utilización:		
<i>GPX1</i>	↓	↓
<i>GPX2</i>	≈	≈
<i>GPX4</i>	↓	↓
<i>GPX6</i>	↓	↓
Sistema Tiorredoxina:		
<i>TXN</i>	↑	↓
<i>TXN2</i>	↑	↓
<i>TXNRD1</i>	↑	↓
<i>TXNRD2</i>	↑	↓
<i>TXNDR3</i>	↑	↓

* Se comparan hipertensos versus controles. ** se comparan hipertensos tratados versus hipertensos en situación basal.

5.3 Estudio de Polimorfismos Implicados en Estrés Oxidativo

Este último apartado de los resultados se ha dividido en dos partes para lograr una mayor claridad de los datos. La primera consta de los análisis de asociación entre los polimorfismos de genes que codifican proteínas implicadas en EO y niveles de PA, EUA y riesgo de mALB en la población de hipertensos de la comunidad valenciana y a su vez comparando los resultados con respecto a la población de hipertensos de la provincia de Valladolid, mientras que en la segunda parte de este estudio de asociación nos centraremos en los resultados obtenidos en la población general de Valladolid.

En el ANEXO I se muestra una descripción detallada de los polimorfismos seleccionados: Información sobre el gen al que pertenece, localización cromosómica, nomenclatura estándar de la variación según recomienda “*The Human Genome Variation Society*” (Den Dunnen y Antonarakis, 2000), porcentaje de genotipado, p-valor del equilibrio Hardy-Weinberg y frecuencia del alelo minoritario (MAF) en la población general.

5.3.1 Población Hipertensa

Para los estudios de asociación entre polimorfismos y variables como la PA y la EUA, hubo que aumentar el tamaño muestral de la población de sujetos hipertensos de la comunidad valenciana, y así incrementar el poder estadístico del estudio de la comunidad valenciana. Para ello, contamos con la colaboración del doctor JM Pascual del Hospital de Sagunto, que nos ayudó a reclutar más sujetos hipertensos con los mismos criterios de selección y de un área próxima a la muestra original.

Por otra parte gracias a la colaboración con el doctor JC Martín Escudero del Hospital Universitario del Río Hortega en Valladolid, se logró realizar el reclutamiento de la subpoblación de sujetos hipertensos, que nos ayudó a replicar nuestros resultados en otra población de similares características.

5.3.1.1 Características Generales de la Población de Estudio

En la tabla 5.10 se presentan las características generales de las dos poblaciones de hipertensos utilizadas. Se encontraron diferencias entre ambas poblaciones excepto para el género, la glucemia, el colesterol total y la EUA. Los individuos tratados con fármacos antihipertensivos, diabéticos, de edad muy avanzada y fumadores de más de 10 cigarrillos por día, de la población de Valladolid fueron excluidos en esta parte del estudio.

Tabla 5.10 Principales características clínicas y perfiles bioquímicos de los sujetos hipertensos de la comunidad valenciana y Valladolid.

Variables	Hipertensos de Valencia (n=335)	p*	Hipertensos de Valladolid (n=300)
Edad, años	42±9	p<0.05	57±10
Genero (M/F)	174/161	ns	165/145
IMC (kg/m ²)	28.9±4.4	p<0.05	27.9±4.3
PAS (mmHg)	154±18	p<0.05	149±17
PAD (mmHg)	96±10	p<0.05	87±10
Glucemia (mg/dl)	101.7±13.7	ns	96.8±38.1
Colesterol-Total (mg/dl)	212.2±39.7	ns	213.4±38.9
Colesterol-LDL (mg/dl)	142.0±33.0	p<0.05	116.4±34.4
Colesterol-HDL (mg/dl)	46.5±10.6	p<0.05	50.8±14.3
Triglicéridos (mg/dl)	125.8±55.1	p<0.05	158.2±55.6
EUA (mg/24h)	31±62	ns	24±122
LogEUA	1.13±0.62	p<0.05	0.74±0.51
MALB, %	25	p<0.05	9

Valores son media ± desviación estándar.

p*: p-valor de la diferencia entre sujetos hipertensos de la Comunidad Valenciana y de Valladolid, ns: No significativo, IMC: Índice de Masa Corporal, PAS: Presión Arterial Sistólica, PAD: Presión Arterial Diastólica, EUA: Excreción Urinaria de Albúmina, LogEUA: Logaritmo de la Excreción Urinaria de Albúmina.

5.3.1.2 Asociación de Polimorfismos con Valores de Presión Arterial

5.3.1.2.1 Análisis de Asociación de los Polimorfismos de Forma Individual

La Tabla 5.11 muestra los polimorfismos que presentaron una asociación positiva con los valores de presión en ambas poblaciones de hipertensos, junto con la distribución de genotipos y la frecuencia del alelo minoritario. Todos estos polimorfismos se mantuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg. No se observaron diferencias en la distribución global de genotipos de los polimorfismos entre las dos poblaciones de estudio, ni entre ambos géneros. Los análisis fueron ajustados por las posibles variables de confusión: edad, géneros e índice de masa corporal (IMC). Como primer paso se analizó siguiendo un modelo de herencia codominante y tras comparar las medias de los genotipos. Los agrupamos entre si cuando el heterocigoto tenía un valor similar a alguno de los homocigotos. En consecuencia, aplicamos un modelo dominante cuando se comparaba el genotipo homocigoto mayoritario frente al heterocigoto y homocigoto minoritario. El modelo recesivo cuando era a la inversa. Se aplicó el mismo modelo en ambas poblaciones ya que esto facilitaba su comprensión y consistencia.

Tabla 5.11 Análisis de univariante entre los niveles de presión arterial sistólica y diastólica y los diferentes polimorfismos en las dos poblaciones de sujetos hipertensos, ajustados por edad, género e IMC.

Gen - dbSNP ¹ / Reference ²	Genotipo	Núm (VLC/VLL)	POBLACIÓN DE VALENCIA		POBLACIÓN DE VALLADOLID	
			PAS	PAD	PAS	PAD
XDH rs2073316						
c.564+64 T>C						
HWE: 0.82	TT+TC	250/247	152.00±1.08	95.9±0.66	146.32±1.31	87.6±0.88
MAF: 0.44	CC	47/53	162.97±4.18	99.24±1.72	152.07±2.6	88.1±1.34
p-valor			0.0006	0.042	0.043	0.350
XDH rs206812						
c.-337 G>A						
HWE: 0.74	GG+GA	222/234	145.41±1.42	95.67±0.92	147.19±1.02	86.67±1.01
MAF: 0.50	AA	63/66	151.30±3.15	96.83±1.23	152.35±2.18	87.22±1.19
p-valor			0.023	0.530	0.013	0.549
NCF2 rs2274064						
c.542T>C p.K181R						
HWE: 0.91	TT+TC	208/217	152.24±1.26	93.8±1.22	147.16±1.62	87.13±0.91
MAF: 0.44	CC	75/83	157.61±2.32	97.44±1.43	152.77±2.37	88.03±1.11
p-valor			0.012	0.011	0.042	0.502
SOD3 rs2536512 †						
c.172G>A p.A58T						
HWE: 0.63	AA	138/170	154.06±1.16	96.63±0.65	150.64±1.46	88.74±0.88
MAF: 0.37	AG+GG	110/130	137.67±3.48	88.22±1.88	143.61±3.00	85.64±1.58
p-valor			0.0002	0.0006	0.033	0.043
CAT rs1049982						
c.-20C>T						
HWE: 0.28	CC	120/135	155.96±1.74	96.34±0.99	150.40±1.38	88.92±0.84
MAF: 0.36	CT+TT	124/165	148.14±1.41	95.54±0.89	146.60±1.25	87.05±0.86
p-valor			0.0005	0.535	0.011	0.025
GPX1 rs3448 †						
c.*891C>T						
HWE: 0.10	CC	179/175	155.34±1.71	96.76±0.90	151.19±1.35	88.02±0.76
MAF: 0.25	CT+TT	145/125	150.23±1.53	95.49±0.99	144.48±1.13	87.42±0.83
p-valor			0.029	0.402	0.021	0.032
TXN rs2301241 †						
c.-793T>C						
HWE: 0.74	TT+TC	211/207	154.39±1.65	97.75±0.75	150.98±2.01	87.98±0.96
MAF: 0.48	CC	63/93	150.49±2.41	92.33±1.17	145.31±1.54	84.45±1.24
p-valor			0.049	0.0004	0.032	0.0093

Valores son media ± error estándar.

1, dbSNP 126. 2, nomenclatura estándar de la variación según recomienda "The Human Genome Variation Society", Build 126, Ensembl release 41.

HWE: p-valor del equilibrio de Hardy-Weinberg. MAF: Frecuencia del alelo menos frecuente, PAS: Presión arterial sistólica (mmHg), PAD: Presión arterial diastólica (mmHg). VLC: Valencia, VLL: Valladolid. †: Tag-SNP seleccionado de genes candidatos para estudios de asociación utilizando las bases de datos del proyecto HapMap. P-valor < 0.05 se muestra en negrita.

5.3.1.2.2 Análisis de Asociación de los Haplotipos Obtenidos con Presión Arterial

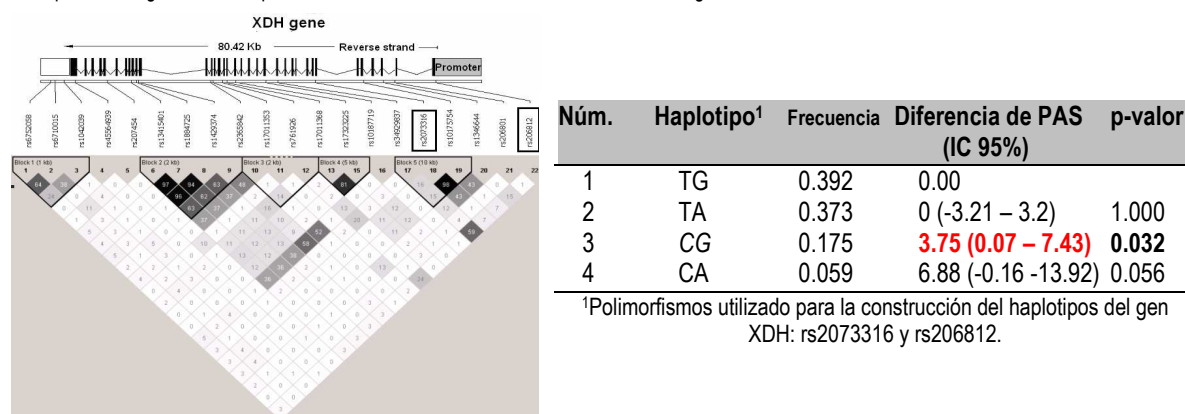
El análisis de haplotipos se realizó en ambas poblaciones de hipertensos, aunque los datos que se muestran solo pertenecen a la población de Valencia, ya que el poder estadístico fue mayor (0.89) y en la población de hipertensos de Valladolid no llegaron a mostrar significación aunque si la misma tendencia.

Como primera aproximación para construir los haplotipos de cada gen, se utilizó el análisis de haplobloques, con el cual seleccionamos los polimorfismos más informativos de cada gen, los tag-SNPs en esta población. Los haplobloques fueron generados por el programa HaploView versión 4.1, siguiendo el test de los cuatro gametos, donde se utiliza polimorfismos cuya frecuencia del alelo minoritario sea mayor de 0.1, la tasa de éxito del genotipado mayor del 90% y se encuentre en equilibrio de Hardy-Weinberg. Tras realizar los análisis de asociación con todos

los marcadores seleccionados previamente, se redujo el número de polimorfismos analizados en el haplotipo hasta obtener una mayor asociación con el menor número de variantes posibles.

En la figura 5.8, se representa la estructura génica junto al mapa de su desequilibrio de ligamiento y la selección de polimorfismos informativos para la construcción de los haplotipos en el gen *XDH*. Al lado de la figura se puede ver el análisis de los haplotipos y su asociación con los niveles de PAS.

Figura 5.8 Mapa del desequilibrio de ligamiento (LD) y análisis de asociación entre los polimorfismos seleccionados y los niveles de presión arterial sistólica en el gen XDH. Dentro de cada cuadrado está el valor de la R^2 del LD, los colores más oscuros muestran mayor desequilibrio de ligamiento. Los polimorfismos seleccionados están encuadrados en la figura.



El mapa del desequilibrio de ligamiento del gen *XDH*, muestra como hay cuatro zonas con un fuerte desequilibrio de ligamiento, casi similar a la estructura génica que mantiene el gen. La asociación observada entre los distintos haplotipos para los marcadores de la región 5'UTR es atribuible principalmente a la combinación alélica CG (rs2073316:rs206812).

5.3.1.2.3 Interacción Gen-Gen en Hipertensión

El método de “*Multifactor Dimensionality Reduction*” (MDR) se usó para determinar la epistasis entre polimorfismos asociados a los niveles de PA de diferentes genes. La estrategia de este método es reducir la dimensión multifactorial a uno mediante la agrupación de los diferentes genotipos en dos grupos de riesgo: alto y bajo. Para evaluar los niveles de PA sistólica en este modelo, tuvimos que categorizar esta variable a partir del percentil 25 (141 mmHg).

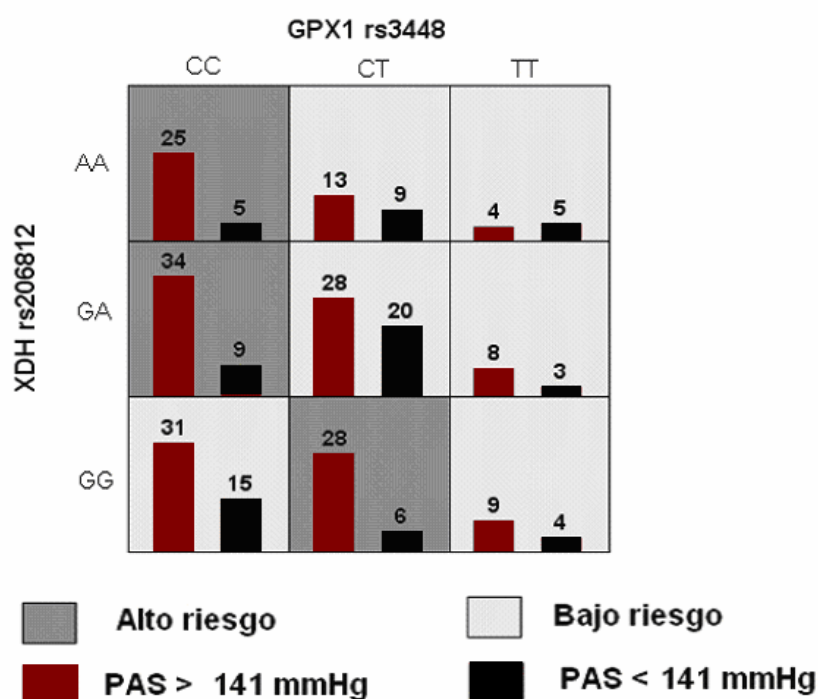
La combinación de genotipos de dos loci distintos se asoció a los niveles de PAS agrupados ($P < 0.05$) (Tabla 5.12). Este modelo incluyó los polimorfismos rs206812 del gen *XDH* y rs3448 del gen *GPX1*. (Figura 5.8).

Tabla 5.12: Resumen de los resultados del análisis de “*MultiFactor Dimensionality Reduction*” (MDR) para los niveles de PAS.

Model	TBA	TTBA	p-valor*	CVC
rs3448	0.6071	0.6071	64 (0.0033)	100/100
rs3448 rs206812	0.6539	0.6126	66 (0.0009)	100/100
rs1049982 rs3448 rs2274064	0.7083	0.4456	48 (0.6914)	54/100
rs1049982 rs3448 rs2301241 rs206812	0.8068	0.6319	58 (0.0666)	100/100

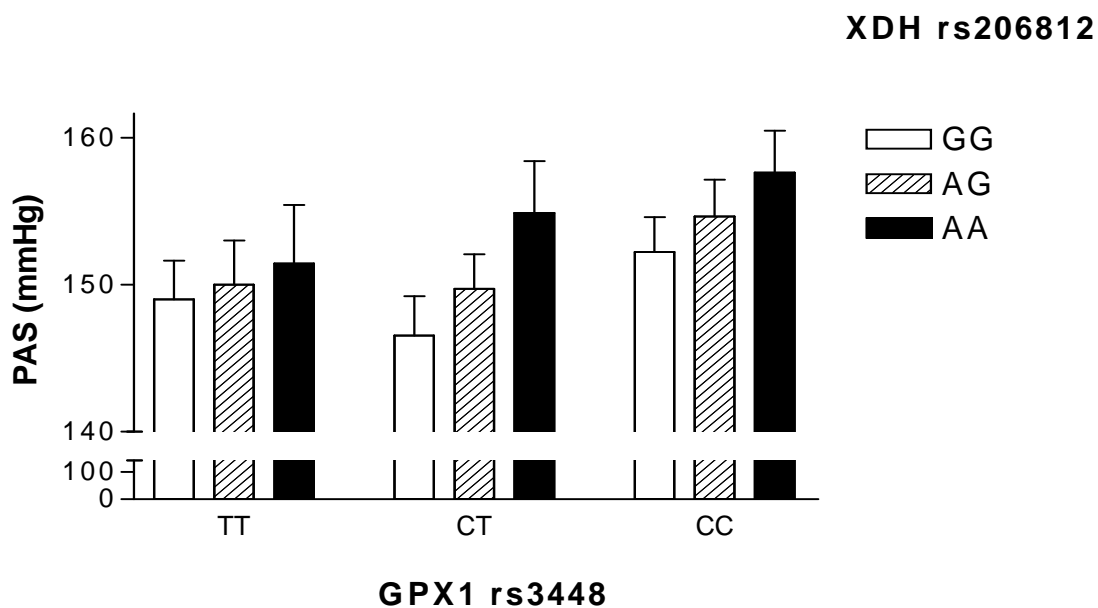
*1000 fold permutation test. TBA: Training Balanced Accuracy, TTBA: Testing balanced accuracy, CVC: Cross-validation Consistency.

Figura 5.8. Distribución de sujetos hipertensos con PAS inferior y superior al percentil 25% en un modelo de dos loci. En cada celda se representa la combinación de los polimorfismos rs206812 del gen *XDH* y rs3448 del gen *GPX1*. El número de individuos se indica encima de cada barra.



Después de identificar las combinaciones de alto riesgo mediante el análisis de MDR, aplicamos una regresión logística para calcular el posible efecto de los distintos alelos de cada gen, observando como la combinación de los alelos C y A de los polimorfismos rs3448 y rs206812, respectivamente, mostraban elevados niveles de PAS (Figura 5.9).

Figura 5.9 Influencia de rs3448 y rs206812 en presión sanguínea sistólica en sujetos hipertensos.



En la figura 5.9 se observa una diferencia en los niveles de PAS de 7.6 (IC: 3.17 - 12.02) mmHg (p -valor= 0.00084) entre la combinación TT-GG y CC-AA de los polimorfismos rs3448 y rs206812.

Con respecto a los niveles de PAD no se observaron diferencias significativas.

5.3.1.3 Asociación de Polimorfismos con Valores de Microalbúmina y Riesgo de Microalbuminuria

Mediante un análisis de regresión logística se compararon los niveles de LogEUA y riesgo de presencia de mALB entre los distintos genotipos de los polimorfismos estudiados, asumiendo diferentes modelos genéticos. Los resultados obtenidos indican que los alelos: rs10175754-G del gen *XDH*, rs7195830-A del gen *CYBA*, rs9798725-C del gen *RAC2*, rs2536512-G del gen *SOD3* y rs769217-T del gen *CAT* se asocian con protección a la mALB asumiendo un modelo dominante (Tabla 5.13). Todos estos polimorfismos se mantuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg en ambas poblaciones.

No se observaron diferencias de género entre estos polimorfismos. Los análisis fueron ajustados por las posibles variables de confusión: edad, género, IMC, PA sistólica y glucemia. También se realizó un análisis de regresión logística incluyendo los niveles de excreción de sodio en orina como covariable y no se observó aumento de la significación en el análisis de regresión.

Tabla 5.13 Análisis univariante y de regresión logística entre los niveles de logaritmo de EUA y riesgo de desarrollo de mALB y los diferentes polimorfismos en las dos poblaciones de sujetos hipertensos, ajustado por edad, género, IMC, presión arterial sistólica y glucemia.

Gen - dbSNP ^{1/} Reference ² Genotipo	Núm. (VLC/VLL)	POBLACIÓN DE VALENCIA				POBLACIÓN DE VALLADOLID			
		LogEUA	% No	% Sí	OR mALB	LogEUA	% No	% Sí	OR mALB
XDH rs10175754									
c.307-33A>G									
HWE: 0.06 AA	197/198	1.22±0.06	76.5	90	1.00	0.79±0.04	63.7	91.2	1.00
MAF: 0.16 AG+GG	74/102	0.89±0.13	23.5	10	0.37 (0.09-1.52)	0.64±0.04	36.3	8.8	0.16 (0.05-0.56)
p-valor		0.0041			0.059	0.0054			0.0004
CYBA rs7195830									
c.*49G>A									
HWE: 0.10 GG	100/122	1.11±0.11	36.4	40.5	1.00	0.70±0.04	43.1	20.6	1.00
MAF: 0.34 GA+AA	176/178	1.32±0.11	64.6	59.5	0.74 (0.40-1.39)	0.76±0.04	56.9	79.4	3.64 (1.46-9.11)
p-valor		0.043			0.087	0.019			0.0027
RAC2 rs9798725									
c.*1444C>A									
HWE: 1.00 CC+CA	264/278	1.55±0.25	91.6	92.1	1.00	0.75±0.03	92.1	97.1	1.00
MAF: 0.27 AA	23/22	1.14±0.07	8.4	7.9	0.92 (0.33-2.61)	0.68±0.09	7.9	2.9	0.30 (0.04-2.48)
p-valor		0.034			0.230	0.018			0.076
SOD3 rs2536512 ‡									
c.172G>A (p.A58T)									
HWE: 0.63 AA	144/170	1.17±0.05	55.4	52.8	1.00	0.80±0.05	42.5	54.5	1.00
MAF: 0.37 AG+GG	119/130	0.78±0.19	44.6	47.2	1.17 (0.38-3.62)	0.73±0.06	57.5	45.5	0.53 (0.24-1.14)
p-valor		0.0039			0.430	0.039			0.100
CAT rs769217 ‡									
c.11167C>T (p.D389D)									
HWE: 0.067 CC	139/175	1.19±0.05	45.4	60.9	1.00	0.81±0.04	57.1	67.7	1.00
MAF: 0.169 CT+TT	143/125	1.05±0.04	54.6	39.1	0.53 (0.30-0.92)	0.68±0.04	42.9	32.4	0.67 (0.31-1.47)
p-valor		0.026			0.023	0.035			0.066

1, dbSNP 126. 2, nomenclatura estándar de la variación según recomienda "The Human Genome Variation Society", Build 126, Ensembl release 41.

HWE: p-valor del equilibrio de Hardy-Weinberg. MAF: Frecuencia del alelo menos frecuente, LogEUA: Logaritmo de la excreción urinaria de albúmina, %No: porcentaje de individuos normomicroalbuminúricos, % Sí: porcentaje de individuos microalbuminúricos, OR mALB: Odds ratio de mALB. ‡: Tag-SNP seleccionado de genes candidatos para estudios de asociación utilizando las bases de datos del proyecto HapMap. P-valor < 0.05 se muestra en negra.

Cuando realizamos los análisis de asociación de haplotipos e interacción intergénica no encontramos ningún conjunto de polimorfismos asociado de forma significativa a los niveles de logEUA o al riesgo de mALB. Esta falta de

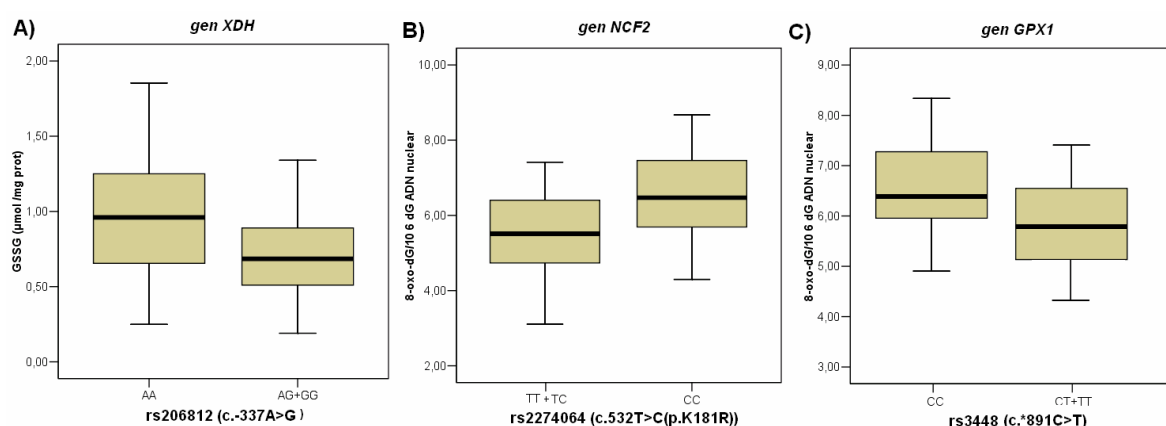
asociación puede deberse a que estos métodos requieren un mayor tamaño muestral para obtener un buen modelo de interacción.

5.3.1.4 Asociación de Polimorfismos con Marcadores de Estrés Oxidativo y Niveles de ARNm

Se evaluó si existía alguna asociación entre los niveles de los distintos marcadores de EO cuantificados anteriormente y los polimorfismos estudiados hasta el momento en la población de hipertensos de Valencia.

En la figura 5.10 se puede observar tres resultados positivos. Se pudo comprobar cómo la presencia del genotipo AA, CC y CC resultan ser genotipos de riesgo de EO, para los polimorfismos rs206812 del gen XDH, rs2274064 del gen NCF2 y rs3448 del gen GPX1, respectivamente.

Figura 5.10 Relación entre los niveles de EO y los polimorfismos de dos genes productores de EO, XDH (A), NCF2 (B) y GPX1 (C).



En la tabla 5.11, se muestra como estos tres genotipos también se encuentran asociados a mayores valores de PA sistólica, y en caso del rs2274064 también a mayores valores de PAD.

No se encontró ninguna asociación significativa entre los niveles de ARNm y los distintos polimorfismos estudiados.

5.3.2 Población General de Valladolid

5.3.2.1 Características Generales de la Población de Estudio

En la tabla 5.14 se presentan las características descriptivas de la población representativa de Valladolid agrupados en función a los valores de PA. Un total 1502 individuos participaron en el estudio, de los cuales 754 (50.2%) fueron varones. La prevalencia de hipertensión fue de un 40 % tanto en varones como mujeres. Un 57.3 % de los individuos fueron clasificados como sujetos normotensos, mientras que el 19.8% estaban bajo tratamiento médico para la hipertensión, y un 23.3% presentaron valores de presión altos sin previo tratamiento antihipertensivo. El porcentaje de diabetes fue de un 8% entre los participantes.

Como cabría esperar los sujetos hipertensos mostraron porcentajes más elevados de obesidad, diabetes e hipercolesterolemia que los sujetos normotensos

Los sujetos hipertensos microalbuminúricos presentaron mayores niveles de PAS que los sujetos normomicroalbuminúricos (la diferencia entre microalbuminúricos y normomicroalbuminúricos fue 12.15 (IC: 5.78 - 18.53) mmHg, p-valor <0.0005).

Tabla 5.14. Principales características clínicas y perfiles bioquímicos de los normotensos y pacientes hipertensos sin tratar y bajo tratamiento antihipertensivo en la población general de Valladolid.

Variables	Normotensos (n=806)	p*	Hipertensos (n=345)	p**	Hipertensos tratados (n=297)
Edad, años	44.6±16.2	<0.001	63.9±16.0	<0.001	71.8±12.3
Genero (M/F, %)	48.2/51.7	ns	55.0/45.0	ns	50.2/49.8
IMC (kg/m ²)	25.0±3.6	<0.001	27.9±4.3	ns	28.4±4.3
Obesidad (%)	9.6	<0.001	25.4	<0.001	35.2
Perímetro cintura (cm.)	85.0±12.3	<0.001	94.8±11.8	ns	96.3±11.1
PAS (mmHg)	118.0±11.9	<0.001	149.1±17.6	<0.05	146.0±22.4
PAD (mmHg)	74.7±7.7	<0.001	87.3±10.1	<0.001	82.4±11.8
Colesterol-total (mg/dL)	196.5±37.9	<0.001	213.4±38.9	<0.001	201.7±34.9
Colesterol-HDL (mg/dL)	53.4±14.6	<0.001	50.9±14.3	<0.001	48.1±12.2
Colesterol-LDL (mg/dL)	112.7±33.5	ns	116.4±34.4	ns	117.1±34.9
Triglicéridos (mg/dL)	158.0±94.9	<0.001	202.1±146.9	ns	202.6±109.6
Hipercolesterolemia (%)	13.9	<0.05	19.7	ns	26.01
Glucemia (mg/dL)	83.3±23.7	<0.001	96.8±38.1	ns	98.6±35.9
Diabetes mellitus (%)	2.2	<0.001	12.5	ns	17.5
EUA (mg/24h)	6.04±0.36	<0.001	24.2±6.6	ns	54.6±15.2
LogEUA	0.59±0.01	<0.001	0.75±0.28	<0.05	0.86±0.04
MALB, %	2.3	<0.001	10.2	ns	13.6
Hábito Tabáquico (%)	31.4	<0.001	14.9	<0.05	8.4

Valores son media ± desviación estándar.

p*: p-valor de la diferencia entre controles y sujetos hipertensos, p**: p-valor de la diferencia entre sujetos hipertensos no tratados y bajo tratamiento antihipertensivo. IMC: Índice de Masa Corporal, PAS: Presión arterial sistólica, PAD: Presión arterial diastólica, EUA: Excreción Urinaria de Albúmina, LogEUA: Logaritmo de la Excreción Urinaria de Albúmina.

Diabetes mellitus, Glucemia ≥ 100 mg/dL o estar bajo tratamiento antidiabético. Hipercolesterolemia, Colesterol-LDL ≥160 mg/dL o tomar medicación hipolipemiente.

5.3.2.2 Asociación de Valores de Presión Arterial y Riesgo de Hipertensión

5.3.2.2.1 Análisis de Asociación de los Polimorfismos de Forma Individual

Siguiendo el esquema de presentación de los datos, mostramos en la tabla 5.15, los resultados más significativos del análisis de asociación. En el caso de los polimorfismos rs2536512 del gen SOD3 y del rs1049982 del gen CAT podemos comprobar que en las dos poblaciones hipertensas también se presenta esta asociación aunque en la población general es más fuerte la significación. En el caso del polimorfismo rs2274064 del gen NCF2 no se mantiene esta significación pero sí la tendencia (genotipo TT: 126.08±1.04 mmHg frente los genotipos CT+CC: 128.21±1.43 mmHg, p-valor: 0.66), el efecto de este polimorfismo se pierde en la población general.

Tabla 5.15 Análisis univariante y de regresión logística entre los niveles de presión arterial sistólica y diastólica y el riesgo de hipertensión en los diferentes polimorfismos de la población general de Valladolid, ajustado por edad, género e IMC.

Gen - dbSNP ¹	Reference ²	Genotipo	Núm.	PAS	PAD	No HTA	HTA	OR HTA
SOD3	rs2536512 *							
c.172G>A (p.A58T)								
HWE:	0.63	AA	438	127.71±0.92	78.94±0.51	37.1	41.3	1.00
MAF:	0.37	AG+GG	704	126.60±0.75	78.19±0.38	62.9	58.7	0.62 (0.47-0.82)
p-valor				0.009	0.045			0.0006
CAT	rs1049982							
c.-20C>T								
HWE:	0.28	CC	479	127.81±0.94	79.07±0.50	41.0	42.5	1.00
MAF:	0.36	CT+TT	655	126.37±0.74	78.80±0.38	59.0	57.5	0.73 (0.56-0.96)
p-valor				0.0027	0.022			0.023
CAT	rs7104301 *							
C.*658 A>G								
HWE:	0.48	AA+AG	997	126.90±0.63	78.43±0.33	90.9	91.0	1.00
MAF:	0.30	GG	102	129.29±2.07	79.31±1.03	9.1	9.0	1.26 (0.79-2.*0)
p-valor				0.0055	0.270			0.340
TXNRD2	rs5992495 *							
c.172 T>G (p.S299R)								
HWE:	0.23	TT+TG	1050	126.95±0.61	78.39±0.32	97.8	95.3	1.00
MAF:	0.16	GG	35	132.35±3.34	83.29±2.08	2.2	4.7	3.80 (1.81-7.96)
p-valor				0.045	0.0034			0.0004

Valores son media ± error estándar.

1, dbSNP 126. 2, nomenclatura estándar de la variación según recomienda "The Human Genome Variation Society", Build 126, Ensembl release 41.

HWE: p-valor del equilibrio de Hardy-Weinberg. MAF: Frecuencia del alelo menos frecuente, PAS: Presión arterial sistólica (mmHg), PAD: Presión arterial diastólica (mmHg). HTA: Hipertensión, OR: Odds Ratio. *: Tag-SNP seleccionado de genes candidatos para estudios de asociación utilizando las bases de datos del proyecto HapMap. P-valor < 0.05 se muestra en negrita.

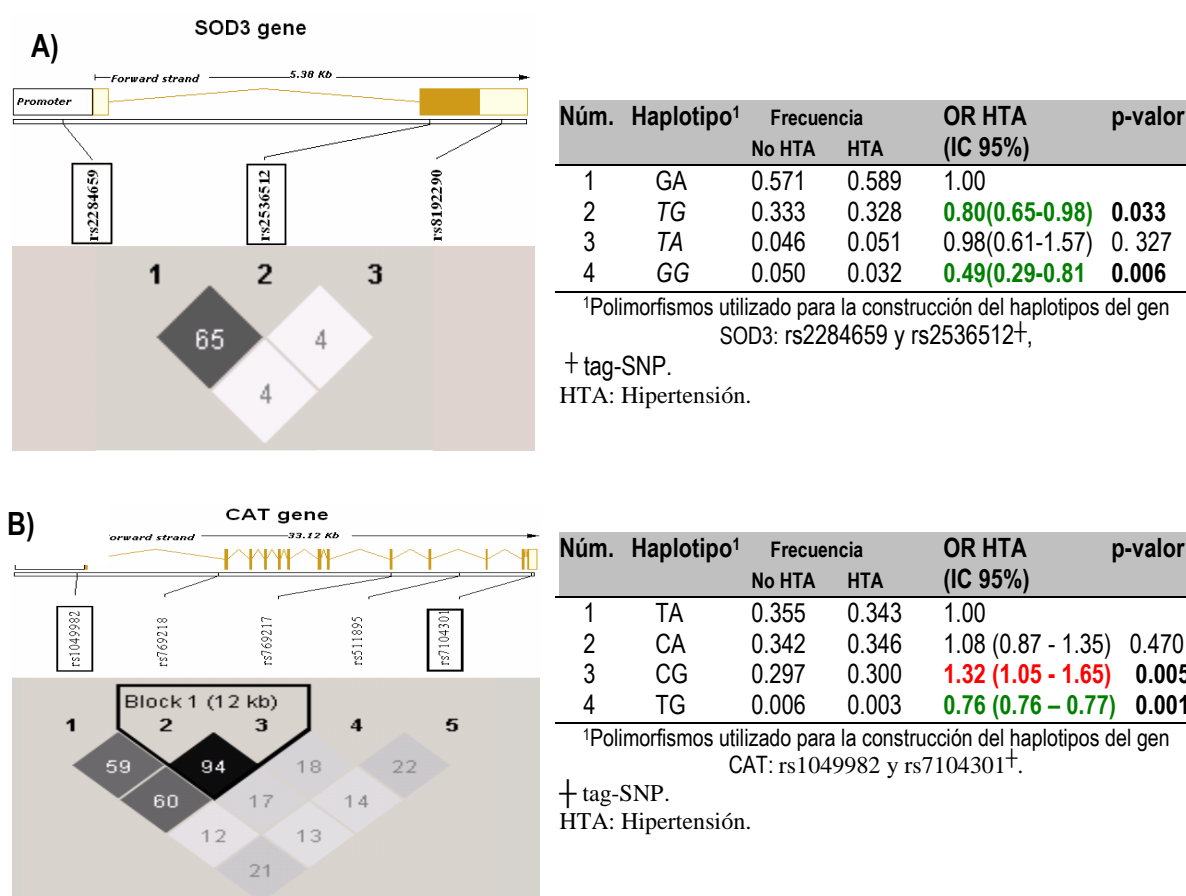
5.3.2.2.2 Análisis de Asociación de los Haplotipos Obtenidos

A partir de los polimorfismos con cierta asociación tanto con los niveles de PA sistólica como diastólica, se han realizado los análisis de asociación de sus haplotipos con la hipertensión.

La figura 5.11 muestra el mapa del desequilibrio de ligamiento para dos genes protectores de EO, junto con el análisis de asociación de sus haplotipos y el riesgo de hipertensión. Para el gen SOD3, encontramos 2 haplotipos, el número 2 y 4, que presentan valores de Odds ratio protectores de forma significativa a la hipertensión. Además, el haplotipo número 4, se encuentra asociado a unos niveles de PA sistólica y diastólica menores que el resto de

haplotipos (diferencia de PAS entre haplotipo 4 y el número 1: -5.9 (IC:-9.32 - -2.49) mmHg y diferencia de PAD: -2.13, IC: -4.19 - -0.06 y p-valor: 0.00072 y 0.043, respectivamente.

Figura 5.11 Mapa del desequilibrio de ligamiento y análisis de asociación entre los polimorfismos seleccionados y el riesgo de hipertensión: (A) SOD3 y (B) CAT. Dentro de cada cuadrado está el valor de la R^2 del LD, colores más oscuros muestran mayor desequilibrio de ligamiento. Los polimorfismos seleccionados están encuadrados en la figura.



En el caso del gen CAT, encontramos dos haplotipos asociados con la hipertensión. El haplotipo número 3 se muestra como un haplotipo de riesgo de desarrollar la enfermedad y está presente en un 29 % de la población. Los individuos con esta combinación muestran unos niveles de PAS y PAD más elevado que el resto (diferencia de PAS del haplotipo CG con respecto al de referencia (TA) es 2.55 (IC: 0.99 - 4.11) p-valor 0.0014 y la diferencia de PAD es 1.38 (IC: 0.44 - 2.32) p-valor 0.0041. Mientras que el haplotipo 4 se muestra como un haplotipo protector presente en un 0.7% de la población.

5.3.2.2.3 Interacción Gen-Gen en Hipertensión

En ninguno de los análisis realizados se encontró una relación estadísticamente significativa entre los diversos genotipos de los distintos polimorfismos analizados y asociados con el riesgo de desarrollar hipertensión.

5.3.2.3 Asociación de Valores de Microalbúmina y Riesgo de Microalbuminuria

5.3.2.3.1 Análisis de Asociación de los Polimorfismos de Forma Individual

En la Tabla 5.16 se puede observar los análisis de regresión logística donde compararon los niveles de LogEUA y riesgo de presencia de mALB entre los distintos genotipos de los polimorfismos estudiados. Se encontró una fuerte asociación entre dos polimorfismos del gen *RAC2* y el mayor riesgo de mALB. Por otra parte, uno polimorfismo del gen *CAT*, protector frente a EO, se ha relacionado de forma significativa con menores niveles de LogEUA y menor riesgo de desarrollar mALB. Todos estos polimorfismos se mantuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg en ambas poblaciones.

No se observaron diferencias de género entre estos polimorfismos. Los análisis fueron ajustados por las posibles variables de confusión: edad, género, IMC, PA sistólica y glucemia.

Tabla 5.16 Análisis univariante y de regresión logística entre los niveles de logaritmo de EUA y el riesgo de mALB y los diferentes polimorfismos en la población general de Valladolid, ajustado por edad, género, IMC, presión arterial sistólica y glucemia.

Gen - dbSNP ^{1/}	Reference ²	Genotipo	Núm.	LogEUA	% No	%Sí	OR mALB
CYBA	rs7195830						
c.*49G>A							
HWE: 0.10		GG+GA	997	0.63±0.02	90.0	86.0	1.00
MAF: 0.34		AA	115	0.69±0.05	10.0	14.0	1.57 (1.01-2.43)
p-valor				0.016			0.046
RAC2	rs3179967						
c.477T>C (p.A159A)							
HWE: 0.069		TT	744	0.61±0.01	68.0	52.1	1.00
MAF: 0.18		TC+CC	363	0.69±0.02	32.0	47.9	1.98 (1.25-3.13)
p-valor				0.0009			0.0049
RAC2	rs2239774[‡]						
c.84G>C(p.A27A)							
HWE: 0.059		GG	775	0.61±0.01	70.9	54.2	1.00
MAF: 0.16		GC+CC	332	0.69±0.03	29.1	45.8	1.91 (1.21-3.02)
p-valor				0.003			0.008
CAT	rs511895[‡]						
c.1326+1947G>A							
HWE: 0.93		GG+GA	960	0.64±0.01	86.8	95.7	1.00
MAF: 0.36		AA	141	0.56±0.02	13.2	4.3	0.31 (0.33-0.88)
p-valor				0.009			0.013

¹, dbSNP 126. ², nomenclatura estándar de la variación según recomienda "The Human Genome Variation Society", Build 126, Ensembl release 41.

HWE: p-valor del equilibrio de Hardy-Weinberg. MAF: Frecuencia del alelo menos frecuente, LogEUA: Logaritmo de la excreción urinaria de albúmina, %No: porcentaje de individuos normomicroalbuminúricos, % Sí: porcentaje de individuos microalbuminúricos, OR mALB: Odds ratio de mALB [‡]: Tag-SNP seleccionado de genes candidatos para estudios de asociación utilizando las bases de datos del proyecto HapMap. P-valor < 0.05 se muestra en negrita.

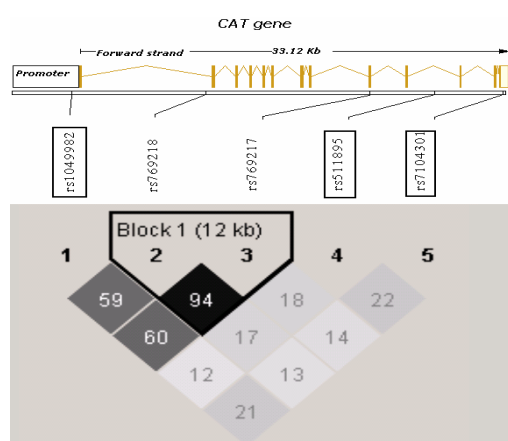
5.3.2.3.2 Análisis de Asociación Haplotipos Obtenidos

Tras la construcción de los correspondientes haplobloques y obtener los resultados del análisis del desequilibrio de ligamiento, evaluamos si existía alguna asociación entre los posibles haplotipos y el riesgo de desarrollar mALB en los sujetos.

El análisis de asociación de haplotipos reveló que existía una correlación significativamente estadística entre el haplotipo número 2 del gen *CAT* y el menor riesgo de padecer mALB, presente en el 30% de la población de Valladolid. Con respecto al gen *RAC2*, obtuvimos el haplotipo 3, presente en el 12 % de la población, que estaba asociado a mayor riesgo de mALB. A su vez, se puede observar como a partir de la combinación de alelos de los distintos polimorfismos obtenemos unos valores de significación y odds ratio de riesgo mayor que cuando estudiamos cada polimorfismo de forma separada (figura 5.12).

Figura 5.12 Mapa del desequilibrio de ligamiento y análisis de asociación entre los polimorfismos seleccionados y riesgo de mALB: (A) *CAT* y (B) *RAC2*. Dentro de cada cuadrado esta el valor de la R^2 del LD, los colores más oscuros muestran mayor desequilibrio de ligamiento. Los polimorfismos seleccionados están encuadrados en la figura.

A)



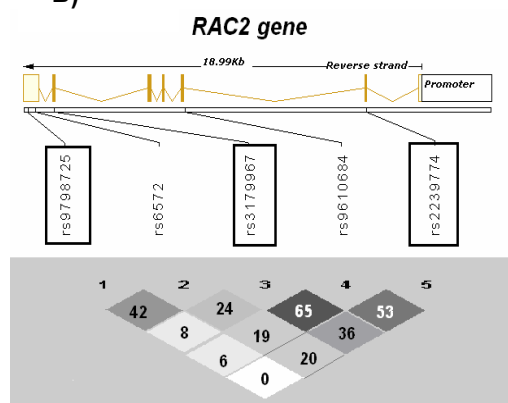
Núm. Haplotipo ¹	Frecuencia	OR mALB		p-valor
		No mALB	mALB (IC 95%)	
1 TGA	0.302	0.394	1.00	
2 CAA	0.311	0.190	0.46 (0.30 – 0.72)	0.0007
3 CGG	0.291	0.304	0.81 (0.56 – 1.20)	0.30
4 TAA	0.049	0.049	0.68 (0.30 – 1.54)	0.35
raros	****		1.03 (0.49 – 2.17)	0.94

¹Polimorfismos utilizado para la construcción del haplotipos del gen *CAT*: rs1049982, rs511895[†] y rs7104301[†].

[†] tag-SNP.

mALB: microalbuminuria

B)



Núm. Haplotipo ¹	Frecuencia	OR mALB		p-valor
		No mALB	mALB (IC 95%)	
1 CTG	0.537	0.431	1.00	
2 ATG	0.237	0.251	1.36 (0.91 - 2.06)	0.140
3 CCC	0.114	0.164	1.81 (1.13 – 2.89)	0.017
4 CCG	0.065	0.071	1.30 (0.62 – 2.72)	0.480
raro	***	0.039	1.81 (0.90 – 3.64)	0.098

¹Polimorfismos utilizado para la construcción del haplotipos del gen *RAC2*: 9798725, rs3179967 y rs2239774[†].

[†] tag-SNP.

mALB: microalbuminuria

5.3.2.3.3 Interacción Gen-Gen en Microalbuminuria

En ninguno de los análisis realizados se encontró una relación estadísticamente significativa entre los diversos genotipos de los distintos polimorfismos analizados y asociados con el riesgo de desarrollar mALB.

5.3.3 Evaluación de Falsos Positivos: “False Positive Report Probability”

Debido al gran número de variables analizadas podríamos haber obtenido algunos resultados como falsos positivos. Para evitar este problema, optamos por emplear la estrategia propuesta por Wacholder *et al.* (2004), que consiste en calcular la probabilidad de reportar un falso positivo. Este cálculo se realiza teniendo en cuenta el poder estadístico, el p-valor y la probabilidad a priori de que exista una asociación entre el polimorfismo y el fenotipo oportuno.

En la tabla 5.17 se presentan todos los resultados de las asociaciones positivas expuestas en los apartados anteriores y la probabilidad asignada de reportar un falso positivo para cada uno de ellos.

Nuestros resultados son consistentes con un valor menor de 0.2 para una probabilidad a priori alta 0.25, debido al poder estadístico, la significación observada y a la función biológica que desempeñarían.

Tabla 5.17. Probabilidad de reportar un falso positivo en las diversas asociaciones obtenidas anteriormente.

Gen	Marcador	Genotipo	Odds ratio (95% CI)	Poder Estadístico ^b	P-valor	Probabilidad a Priori ^a				Población
						0.25	0.1	0.05	0.01	
Hipertensión										
SOD3	rs2536512	AG+GG	0.62 (0.47-0.82)	0.87	0.0006	0.002	0.006	0.013	0.064	C
CAT	rs1049982	CT+TT	0.73 (0.56-0.96)	0.66	0.023	0.095	0.239	0.398	0.775	C
TXNRD2	rs5992495	GG	3.80 (1.81-7.96)	0.89	0.0004	0.001	0.004	0.008	0.043	C
Haplotipo										
SOD3	2	TG	0.80(0.65-0.98)	0.85	0.033	0.104	0.259	0.425	0.794	C
SOD3	4	GG	0.49(0.29-0.81)	0.85	0.006	0.021	0.060	0.118	0.411	C
CAT	3	CG	1.32 (1.05 - 1.65)	0.85	0.005	0.017	0.050	0.101	0.368	C
Microalbuminuria										
XDH	rs10175754	AG+GG	0.16 (0.05-0.56)	0.60	0.0004	0.002	0.006	0.013	0.062	B
CYBA	rs7195830	GA+AA	3.64 (1.46-9.11)	0.85	0.0027	0.009	0.028	0.057	0.239	B
CYBA	rs7195830	AA	1.57 (1.01-2.43)	0.57	0.046	0.195	0.421	0.605	0.889	C
RAC2	rs3179967	TC+CC	1.98 (1.25-3.13)	0.85	0.0049	0.017	0.049	0.099	0.363	C
RAC2	rs2239774	GC+CC	1.91 (1.21-3.02)	0.70	0.008	0.033	0.093	0.178	0.531	C
CAT	rs769217	CT+TT	0.53 (0.30-0.92)	0.89	0.023	0.072	0.189	0.329	0.719	A
CAT	rs511895	AA	0.31 (0.33-0.88)	0.77	0.013	0.048	0.132	0.243	0.626	C
Haplotipo										
CAT	2	CAA	0.46 (0.30 – 0.72)	0.85	0.0007	0.002	0.007	0.015	0.073	C
RAC2	3	CCC	1.81 (1.13 – 2.89)	0.85	0.017	0.057	0.153	0.664	0.952	C

a, Probabilidades de reportar un falso positivo de los odds ratios observados. El sombreado gris indica los resultados significativos para reportar un falso positivo para la mayor probabilidad a priori. b Estimación de la potencia estadística para detectar una odds ratio de 0,67 (1/1.5, es decir, una disminución en el riesgo con el mismo tamaño del efecto como un odds-ratio de 1,5) con un nivel igual al p-valor observado. A: Población de Hipertensos de Valencia, B: Población de Hipertensos de Valladolid y C: Población General de Valladolid.

5.3.4 Sumario de Resultados del Estudio de Asociación de Polimorfismos de Genes Implicados en Estrés Oxidativo.

En el cuadro 5.2 se representa un resumen de las asociaciones con mayor significación entre los genes y sus polimorfismos estudiados y los marcadores de EO, los niveles de PA y el logEUA tanto en población de hipertensos como en población general.

Cuadro 5.2. Resumen de las asociaciones obtenidas de los genes que codifican enzimas de sistemas oxidantes y antioxidantes.

GENES	Marcadores de EO	Presión Arterial		LogEUA	
		Hipertensos	Población General	Hipertensos	Población General
Sistema Oxidantes					
<i>XDH</i> (rs206812/rs2073316/rs10175754)	◆/ - / -	◆/ ◆◆/ -	-/ - / -	-/ - / ◆◆	-/ - / -
<i>CYBA</i> (rs7195830)	-	-	-	◆	◆
<i>CYBB</i>	-	-	-	-	-
<i>NCF1</i>	-	-	-	-	-
<i>NCF2</i> (rs2274064)	◆	◆	-	-	-
<i>NCF4</i>	-	-	-	-	-
<i>RAC1</i>	-	-	-	-	-
<i>RAC2</i> (rs9796725/rs3179967/rs2239774)	-	-	-	◆/ - / -	-/ ◆◆/ ◆◆
Sistema Antioxidantes					
Generales:					
<i>SOD1</i>	-	-	-	-	-
<i>SOD2</i>	-	-	-	-	-
<i>SOD3</i> (rs2536512)	-	◆◆	◆◆	◆◆	-
<i>CAT</i> (rs1049982/rs769217/rs7104301/rs511895)	-	◆◆/ - / - / -	◆◆/ - / ◆◆/ -	-/ ◆/ - / -	-/ - / - / ◆
<i>OGG1</i>	-	-	-	-	-
Sistema GSH:					
Síntesis:					
<i>GCLC</i>	-	-	-	-	-
<i>GCLM</i>	-	-	-	-	-
<i>GSS</i>	-	-	-	-	-
Regeneración:					
<i>GSR</i>	-	-	-	-	-
<i>G6PDH</i>	-	-	-	-	-
Utilización:					
<i>GPX1</i> (rs3448)	◆◆	◆	-	-	-
<i>GPX2</i>	-	-	-	-	-
<i>GPX3</i>	-	-	-	-	-
<i>GPX4</i>	-	-	-	-	-
<i>GPX6</i>	-	-	-	-	-
Sistema Tiorredoxina:					
<i>TXN</i> (rs2301241)	-	◆◆	-	-	-
<i>TXN2</i>	-	-	-	-	-
<i>TXNRD1</i>	-	-	-	-	-
<i>TXNRD2</i> (rs5992495)	-	-	◆	-	-
<i>TXNDR3</i>	-	-	-	-	-

LogEUA: Logaritmo de la Excreción Urinaria de Albúmina. ◆: p-valor de la asociación <0.05. ◆◆: p-valor de la asociación <0.01

Discusión

6. Discusión

6.1 Discusión de Métodos

6.1.1 Diseño de la Tesis

El presente estudio tiene un diseño de corte transversal, formando parte de los estudios de un grupo multicéntrico de estudio sobre hipertensión arterial (HTA) esencial, en el que colaboraron el Servicio de Medicina Interna del Hospital Clínico Universitario de Valencia y Unidad de Hipertensión Arterial y Riesgo Cardiovascular del Hospital de Sagunto, Valencia. Con el objeto de minimizar las fuentes de variabilidad debidas a la selección de los pacientes, el estudio se ha centrado en pacientes hipertensos esenciales de origen caucásico.

En la parte que concierne al estudio que se presenta en este proyecto de tesis doctoral, se seleccionaron inicialmente 69 participantes hipertensos y posteriormente se amplió a 335 individuos. La población de estudio incluyó representantes de pacientes adultos jóvenes que asistieron a la consulta clínica de HTA, con una tasa de prevalencia de microalbuminuria (mALB) 24%. A fin de evitar diversos factores de confusión, se excluyeron pacientes diabéticos, hipercolesterolémicos y con presencia de enfermedad renal, fumadores y de edad avanzada, quienes tienden a aumentar las tasas de excreción urinaria de albúmina (EUA) independiente de los valores de presión arterial (PA).

Los pacientes que nunca habían sido tratados con fármacos antihipertensivos fueron elegidos para proporcionar una mejor estimación de la PA del individuo, del impacto de la elevación de la PA en la mALB y evitar los posibles cambios inducidos por el tratamiento. Para reducir la variabilidad individual, se calculó la media de la EUA a partir de dos muestras de orina de 24 horas tomadas en días diferentes. Las características de los pacientes incluidos en el presente estudio permite la investigación de los factores que influyen en la aparición de mALB en la HTA esencia, evitando diversos factores de confusión.

Con respecto al estudio llevado a cabo sobre la población general de Valladolid, cabría decir que fue diseñado como un estudio transversal observacional polifásico, realizado en el Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario del Río Hortega en Valladolid. La inclusión de esta cohorte nos permitió conocer cómo se asociaban las diversas variantes genéticas analizadas con el riesgo de HTA en una población general. Además, gracias a la extracción de una subcohorte de sujetos hipertensos, que mostraban características similares al grupo de hipertensos de la Comunidad Valenciana, se lograron replicar los datos en dos poblaciones independientes de hipertensos.

Teniendo en cuenta que para lograr una verdadera replicación se debería cumplir una serie de criterios: 1) los sujetos deberían definirse estrictamente de la misma forma que en el trabajo previo, usando los mismos criterios de inclusión y de exclusión; 2) debería aplicarse el mismo campo de muestreo; y 3) debería analizarse la misma o una población de referencia similar. Una limitación del presente estudio es que nunca se puede conseguir una verdadera replicación, dejando abiertas algunas dudas no determinadas sobre la significación real de las diferencias estadísticas observadas. A pesar de seleccionar los hipertensos de la población de Valladolid bajo unos criterios similares a los de la población de Valencia y excluyendo los sujetos tratados, diabéticos y fumadores; el rango de edad de los hipertensos de Valladolid fue sutilmente más alto y sus niveles de mALB eran claramente menores. Lo que explicaría la diferencia de significación entre ambas poblaciones aunque las frecuencias genotípicas y los efectos mostrados por ambas cohortes fueron similares, excepto en la generación de los haplotipos que no llegaron a ser significativos en la población de hipertensos de Valladolid.

Todos los sujetos incluidos en las distintas cohortes de estudio participaron dando su consentimiento informado, que aseguraba la confidencialidad, protección a los participantes y garantía de que los resultados de la investigación fueran de acceso público. Todos los estudios planteados fueron aprobados por el comité ético del Hospital Clínico Universitario de Valencia y del Hospital Río Hortega de Valladolid.

6.1.2 Metodología Empleada

Para evaluar el estrés oxidativo (EO) en sangre se utilizaron células mononucleares y plasma. Se consideró el uso de estas células ya que se sabe que desempeñan un papel importante en el proceso de inflamación de la pared vascular y su evaluación puede ser repetida de forma sencilla a lo largo del tiempo, si fuera necesario, a fin de supervisar los cambios que se producen tras la aplicación del tratamiento antihipertensivo.

Los métodos para medir EO en los sistemas biológicos son numerosos. El EO se evaluó mediante la medición de tres componentes: el contenido de glutatión total y la razón glutatión oxidado y glutatión reducido, lo que indica el estado oxidativo en el momento de la medida, y la 8-oxo-dG nuclear, lo que indica el equilibrio entre la acumulación y la reparación de daños sobre el ADN inducidos por las especies reactivas del oxígeno (EROs) y, por último, el MDA que está indicando la peroxidación lipídica. Estas determinaciones se han realizado mediante detección por HPLC (del inglés *High-performance liquid chromatography*), cuyos protocolos fueron puestos a punto y validados en el laboratorio de la Unidad de de Toxicología Metabólica, del departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de Valencia (Sáez, 2005).

Asimismo, los protocolos comerciales de determinación de metabolitos oxidativos y cuantificación proteica, tanto por técnicas colorí-, fluorí- espectrofotométricas fueron puestos a punto en nuestras muestras, asegurándonos que mostraban una alta especificidad y sensibilidad en las medidas y en la evaluación de la magnitud del EO.

La cuantificación de los niveles de ARNm, se llevó a cabo en nuestro laboratorio de la Unidad de Genotipado y Diagnóstico Genético de la Fundación para la Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia. En él se realizó el diseño, la optimización de la técnica y, por último, la obtención de los resultados.

El principio de cuantificación mediante la técnica de PCR en tiempo real parece sencillo: mientras más copias de ARNm hay, menor número de ciclos de PCR son necesarios para alcanzar el nivel umbral de detección (*Ct*, *Threshold cycle*). Pero en la práctica, la relación entre el número de copias del ARNm molde y el *Ct* no es tan sencilla. En primera instancia, lograr cuantificaciones reproducibles a partir de muestras que se encuentran a baja concentración (<1000 copias) en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, constituye muchas veces una tarea problemática (efecto Monte Carlo, Karrer *et al.*, 1995). Por eso, se optimizó la cantidad de oligonucleótido para obtener amplificaciones de alto rendimiento ($\epsilon = 10^{-1/m} \approx 1.9$) y curvas de fusión de alta pureza. Si la eficiencia es baja, disminuye la sensibilidad del ensayo pero permite cuantificaciones con mayor precisión (mayor reproducibilidad entre repeticiones).

En segundo lugar, es necesario aplicar una adecuada estrategia de corrección que permita controlar la cantidad de material de partida, las variaciones en la eficiencia de amplificación y las diferencias entre muestras. Parte de este problema se solucionó al realizar un ensayo de cuantificación donde se incluyeron muestras con un número de copias conocido. Así obtuvimos curvas estándares para cada gen y para cada reacción de PCR a tiempo real (Shih *et al.*, 2003), con lo que se logró calcular el número absoluto de copias de cada gen. Nuestros análisis mostraron unos coeficientes de regresión próximos a la linealidad ($r^2 \geq 0.99$), con lo que se demostró que existía una buena correlación entre los estándares usados y la interpolación de las muestras. Para reducir la variabilidad intramuestral, éstas fueron amplificadas por duplicado y todos los datos fueron verificados usando la primera derivada de las curvas de fusión.

Por último, fue necesario realizar una normalización de la cantidad ARNm de cada muestra respecto a la cantidad de un gen normalizador, preferentemente de expresión constitutiva en la célula (control endógeno). La selección de este control endógeno es crítica ya que este gen debe mantener un nivel de expresión constante aún en diferentes estados fisiológicos de la célula y no deben afectarse en respuesta a los tratamientos que estamos evaluando, en caso de que así sea. Además, para que este método sea exitoso el rango dinámico entre la muestra y el control endógeno debe ser similar. En nuestro ensayo, seleccionamos como control endógeno el gen de la enzima gliceraldehido-3-fosfato

deshidrogenasa, ya que era la más adecuada para nuestro tipo celular y estudio específico (Wassmann *et al.*, 2004).

La selección de los polimorfismos apropiados para el estudio planteó algunos inconvenientes. Tras elegir los genes candidatos para nuestro estudio, genes implicados en las rutas de producción y eliminación de EO, se comenzó la búsqueda de los polimorfismos que nos aportarán la máxima información de variabilidad para gen.

Aunque son muy abundantes los polimorfismos en el genoma humano, y existen grandes bases de datos de polimorfismos candidatos disponibles para la selección de estos marcadores en el genoma (Sherry *et al.*, 2001; Kerlavage *et al.*, 2002), no todos son adecuados para el desarrollo de los ensayos de genotipado. Se ha reportado en la literatura que normalmente sólo el 50% de SNPs seleccionados al azar en las distintas bases de datos resultan eficaces para determinar la susceptibilidad a una determinada enfermedad, lo que provoca significativos retrasos y costes en la investigación (Marth *et al.*, 2001; Reich *et al.*, 2003; Marsh *et al.*, 2002).

Esta alta tasa de fracaso se debe a tres factores: (1) Muchos de los registros de los polimorfismos que existen en las bases de datos públicas son variantes generadas a partir de secuencia de baja calidad que con frecuencia han demostrado ser artefactos raros o mutaciones raras (Marth *et al.*, 2001), aunque en los últimos años se han ido depurando la mayoría de la bases todavía pueden existir parte de estos errores, (2) la presencia de polimorfismos duplicados de distintas regiones del genoma (Heil *et al.*, 2002), (3), incluso cuando se demuestra que un polimorfismo es una verdadera variante, algunas veces no proporciona la información adecuada sobre una población determinada (Dvornyk *et al.*, 2004). Para intentar evitar estos tres factores, nuestro grupo utilizó varias estrategias: El uso de búsquedas bibliográficas de asociaciones ya descritas anteriormente en cada gen, búsqueda de variantes que por su localización en el gen además de una frecuencia apropiada (alelo menor mayor de un 10% en caucásicos) fueran interesantes y la utilización de una herramienta como el proyecto Hapmap, que permitió aumentar la potencia del estudio de asociación con los caracteres biomédicos (The International HapMap Consortium, 2003). Hapmap proporciona información sobre la estructura de desequilibrio de ligamiento (LD) de cada marcador en el genoma, permite seleccionar los marcadores llamados tagSNP e identificar los haplotipos en los que existan variantes genéticas que influyen en alguna de las cuatro poblaciones mundiales genotipadas.

La técnica de genotipado empleada, SNPlex™ Genotyping System, asume un rendimiento del 95%. Este porcentaje puede variar en función de las características propias de los polimorfismos seleccionados (secuencias adyacentes, tipo de polimorfismo, etc.) y del estado de las muestras (pureza, concentración y tipo de extracción). El hecho de que exista mucha variabilidad entre las muestras dificulta el correcto análisis de los genotipos, por lo que es importante que todas las muestras provengan del mismo tipo de material biológico y sean sometidas al mismo método de extracción de ADN.

Como medida de control de los resultados obtenidos, en el caso de algunos polimorfismos procedimos a verificar los genotipos por secuenciación de un 10% de las muestras. Por otra parte, en cada ensayo de SNPlex se emplearon dos polimorfismos conocidos como controles positivos del ensayo.

En nuestro estudio, seleccionamos 115 marcadores genéticos y obtuvimos una tasa de éxito de genotipado del 96%. El porcentaje de genotipado para cada SNP fue en promedio del 97%, considerándose una tasa buena, ya que la mayoría de programas estadísticos recomiendan una tasa de genotipado de alrededor de 90% y mínima del 75%, (Barret *et al.*, 2005).

A partir de los resultados obtenidos en el análisis estadístico de asociación para cada polimorfismo de forma independiente es importante comentar el tema de los falsos positivos que pueden aparecer y el problema de las comparaciones múltiples. Conociendo que la probabilidad global de hallar un resultado positivo (tomando como tal, p-valor <0.05) aumenta a medida que aumenta el número de ensayos realizados, se suele aplicar la corrección por comparaciones múltiples (*multiple-testing*) donde se ajusta a la baja el umbral del p-valor en función del número ensayos independientes realizados, reduciendo así la probabilidad de encontrar un falso positivo. El método de comparaciones múltiples más empleado es el método de Bonferroni, en el que el p-valor convencional se divide por el número de polimorfismos que se transmiten de forma independiente. En nuestro caso, el p-valor sería fijado en 0.05/115, o 0.0004.

Este método, sin embargo, es probablemente demasiado conservador, y muchos autores han sugerido el uso de otros métodos (Wacholder *et al.*, 2004; Freimer y Sabatti, 2004; Ioannidis, 2008; Province, 2001; Sabatti, 2007). Dos de los más populares son los siguientes: Cálculo del "*False-discovery rate*", que consisten en la estimación de la proporción de asociaciones que son aparentemente "verdaderas" (tras haber pasado un umbral requerido en la prueba). El método clasifica los p-valores de las todas las asociaciones dentro de un estudio y posteriormente lo ajusta en función de su posición en el ranking de p-valor (Benjamín y Hochberg, 1995; Benjamini y Yekutielli, 2001). El segundo método, "*False positive report probability*", utiliza la probabilidad de que una asociación sea falsa cuando se observa un determinado nivel de significación estadística, potencia del estudio y percepción de que esa probabilidad sea una asociación cierta (Wacholder *et al.*, 2004). Además los autores del método han construido una hoja de cálculo fácil de usar que permite su cálculo (Wacholder *et al.*, 2008).

En los análisis estadísticos realizados para cada polimorfismo de forma independiente, y de sus haplotipos, se estimó la corrección del p-valor mediante la segunda aproximación, "*False positive report probability*". Este tipo de análisis nos permitió valorar hasta que punto podían llegar a ser ciertos nuestros resultados apoyándose en una probabilidad "*a priori*" basándose en el hecho funcional y biológico de los mismos y dependiendo de la potencia estadística observada por el estudio. Por ejemplo, en el caso del polimorfismo rs7195830 del gen *CYBA* existe una probabilidad más alta de reportar un falso positivo en comparación con el polimorfismo rs2536512 del gen *SOD3* que nos muestra una baja probabilidad y además está respaldado por otros estudios que lo relacionan con el riesgo de HTA (Naganuma *et al.*,

2008). Por tanto, en el caso del polimorfismo de CYBA, que esta localizado en la región 3'UTR de dicho gen y sin descripciones previas, aunque nos estaría indicando una posible zona de susceptibilidad genética a la enfermedad, deberemos confirmar su efecto en ensayos de funcionalidad,.

En el **análisis de las interacciones**, utilizamos el programa MDR. Este método reduce la dimensión multifactorial de las variables a uno, mediante la agrupación de los diferentes genotipos en dos grupos de riesgo: alto y bajo (Ritchie *et al.*, 2001). A pesar de su utilidad demostrada, el método MDR tiene algunos inconvenientes. Por ejemplo, el método no permite el ajuste por efectos principales ni por variables confusoras, se restringe al uso de las variables categóricas como variables respuesta y la agrupación excesiva de genotipos puede hacer que algunas interacciones importantes no sean detectadas (Calle *et al.*, 2008). Por ello, hemos restringido su uso al intento de aproximación hacia una posible interacción para posteriormente intentar clarificar si ésta es o no una interacción certera. En el apartado 5.3.1.2.3., se muestra cómo podría existir una interacción entre el polimorfismo rs206812 del gen de XDH y el del rs3448 del gen *GPX1*. De hecho, la combinación de estos dos polimorfismos estaría asociada a niveles de PA y cada uno de forma independiente también con niveles de marcadores de EO. Por lo tanto, el programa nos sirve de guía sobre las posibles interacciones, pero debido a las importantes limitaciones, no podemos utilizarlo como una herramienta estadística que nos aporte datos concluyentes.

6.2 Discusión de Resultados

6.2.1 Estudio de Niveles de EO en HTA

La evaluación de EO se ha realizado simultáneamente en plasma y en células mononucleares periféricas. Estas células pueden contribuir a la liberación de EROs en la pared vascular. En ambos sistemas hemos encontrado un comportamiento similar, una disminución de las sustancias antioxidantes y un aumento en los marcadores de EO. Estos resultados concuerdan con lo que otros autores han observado para otros sistemas celulares en sujetos hipertensos (Simic *et al.*, 2006; Laffer *et al.*, 2006; Kedziora *et al.*, 2004).

Concretamente en la HTA, hemos observado una importante reducción de los niveles de glutatión (GSH). Este tripéptido es una importante molécula implicada en regulación de los sistemas biológicos, aparte de un eficiente antioxidante, por lo que su disminución se ha relacionado con la alteración de un gran número de metabolitos y la expresión de diversos genes (Packer., 2005).

Las EROs oxidan el GSH y éste pasa a glutatión oxidado (GSSG), lo que conlleva una reducción en su concentración y un aumento en la de GSSG. Además, a pesar de que el incremento en EROs podría inducir un aumento en la expresión de las enzimas antioxidantes, en realidad, lo que observamos es una disminución en la expresión de algunos sistemas antioxidantes, lo que llevaría a la bajada de actividad antioxidante reportada por algunos autores (Romero y Reckelhoff, 1999; Chaves *et al.*, 2007a). Esta reducción de la actividad de las enzimas antioxidantes en células mononucleares periféricas de sujetos hipertensos iría acompañada por la acumulación de grandes cantidades de productos derivados de la peroxidación lipídica y la oxidación de ADN en las células, lo que se correlaciona significativamente con el aumento en las concentraciones de MDA y 8-oxo-dG, respectivamente (Redon *et al.*, 2003).

El MDA es la sustancia más abundante entre los reactivos aldehídos derivados de la peroxidación lipídica y hemos mostrado que se encuentra significativamente aumentado en plasma, así como en células mononucleares periféricas de nuestra población de hipertensos. Además, este aldehído ha sido descrito como un agente causal en procesos citotóxicos, y es razonable suponer, que la liberación de esta molécula en la membrana celular podría interactuar e inducir modificaciones oxidativas en otras células y en moléculas de LDL, lo que aumenta el riesgo de daño en la enfermedad cardiovascular (Steinberg *et al.*, 1989).

El aumento observado en la oxidación de ADN en células mononucleares periféricas de hipertensos implica la participación del radical hidroxilo (OH⁻) (Balasubramanian *et al.*, 1998). Este radical reacciona fácilmente con el nucleótido guanósina y produce la base mutagénica 8-oxo-dG, por lo que ha sido propuesto como una buena estimación de la formación de OH⁻. Por otra parte, el daño producido por este reactivo estaría afectando a la expresión de varios genes de respuesta a estrés, implicados en la regulación y proliferación del ciclo celular (Prior *et al.*, 1995). Así, progresivamente, el aumento de la oxidación del ADN provocaría un envejecimiento acelerado de las células vasculares de estos pacientes.

Un artículo recientemente publicado por nuestro grupo, muestra además como existe una correlación positiva significativa entre la relación de GSSG/GSH y la determinación de 8-oxo-dG en orina en pacientes hipertensos, lo que haría de este último un excelente marcador de fácil monitorización de los cambios en el estado oxidativo que se producen en el sujeto hipertenso (Espinosa *et al.*, 2007).

Por consiguiente, este desequilibrio redox que se produce en la célula vascular, estaría afectando al funcionamiento de la célula endotelial y contribuyendo al desarrollo y mantenimiento de complicaciones cardiovasculares en la HTA.

Con respecto al tratamiento antihipertensivo, aunque más adelante comentaremos los efectos de éste sobre los niveles de ARNm, destacar que como era de esperar, el tratamiento antihipertensivo redujo significativamente tanto la PA sistólica como la diastólica, tanto para las PA ambulatorias como clínicas a lo largo de tres meses. Además, el tratamiento antihipertensivo logró reducir los parámetros de EO, alcanzando valores cercanos a la normalidad, gracias al aumento en los niveles de GSH y a la reducción de la razón GSSG/GSH (Sáez *et al.*, 2004). Los cambios en estos niveles fueron similares en sujetos que recibieron tratamiento no farmacológico, bloqueante de los receptores de la angiotensina, y en aquellos a los que se les administraba un β -bloqueante.

Por otra parte, durante la evaluación de la **relación entre los valores de PA y marcadores de EO**, observamos como existía una fuerte asociación entre ambos. Esta correlación sugiere que estos marcadores tendrían algún efecto en la modulación de la presión arterial, ya que como consecuencia de este aumento de EROs, sería de esperar una reducción de la vasodilatación, producida por la reducción en la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO), que se produce en las células del músculo liso vascular del endotelio en los pacientes hipertensos (Lassegue y Griendling, 2004; Touyz, 2005). A su vez, la elevación aguda de la presión arterial se ha demostrado que aumenta la producción del radical superóxido (O_2^-) (Harrison *et al.* 1997), lo que explicaría la compleja interdependencia entre estas variables.

Por último, en este apartado analizaremos la relación entre la respuesta oxidante y la mALB. Cuando analizamos los marcadores de EO en sujetos hipertensos, observamos que en las células mononucleares de los sujetos microalbuminúricos se exhibían mayores valores de EO que en los normoalbuminúricos. Este EO fue el principal determinante de la excreción urinaria de albúmina cuando la presión arterial ambulatoria a 24 horas, el nivel de glucosa y los niveles de colesterol se incluyeron en el análisis de regresión múltiple. Este hecho, estaría indicando cómo el desequilibrio redox producido en las células mononucleares estaría afectando a la función de las células endoteliales y contribuiría en el incremento de la EUA. Otros estudios ya habían descrito el aumento en las cifras de EO en microalbuminúricos aunque no la relación entre las EROs y los valores de presión arterial (Lerman *al.*, 2001; Trolliet *et al.*, 2001). Es evidente que las EROs y el EO tienen un papel fundamental en el riñón, dada su importancia en diversas vías metabólicas y efectos directos sobre las células del glomérulo. Por

ejemplo, provocan la disfunción de la barrera de filtración glomerular (Vink y Duling, 1996), interfieren con la biodisponibilidad de NO y activan la producción de mediadores inflamatorios como el factor nuclear kappa B en las células endoteliales glomerulares. Los procesos inflamatorios estarían aumentando la permeabilidad a través del glucocálix, lo que provocaría el incremento de la EUA.

6.2.2 Estudio de Niveles de ARNm de Genes Implicados en Estrés Oxidativo

Esta parte del estudio fue diseñada para evaluar los niveles de ARNm de las principales enzimas antioxidantes intracelulares y el complejo NADPH oxidasa, como oxidante. En este trabajo y en otros (Redón *et al.*, 2003; Chaves *et al.*, 2007b) se observó un aumento de EO, acompañado de la reducción en las actividades de las enzimas antioxidantes en hipertensos. Estos eventos parecen ser en parte como consecuencia del efecto inhibitorio de los EROs sobre estas enzimas antioxidantes y/o una respuesta inadecuada de las enzimas antioxidantes: CuZnSOD, CAT, sistema glutatión (GCLs, GPXs, GSS y GSR).

Los bajos niveles de ARNm de estas enzimas a pesar del aumento de EO, así como la reducción de estos niveles todavía más fuerte cuando los valores de EO se normalizan tras la aplicación del tratamiento, respaldan la existencia de que se esté produciendo en la célula una respuesta inadecuada frente a EO.

A pesar de que en este trabajo no hemos evaluado los niveles de actividad o cantidad de proteína total de estas enzimas, nuestro grupo si que ha desarrollado investigaciones con respecto a estas medidas, observando que existe un descenso de la actividad de la principales enzimas antioxidantes en la HTA. Sin embargo, no está claro si la reducción de los niveles de ARNm de la HTA se debe a la inactivación de enzimas por el aumento de EO o a un mecanismo inhibitorio de la expresión génica condicionada por el entorno hipertenso o a ambas posibilidades.

Hasta el momento, el aumento de EO en hipertensos se había atribuido a la hiperactividad de los mecanismos que aumentan la producción de EROs. Los dos radicales libres principales que se producen en la HTA en humanos, y en una amplia variedad de modelos animales de HTA, son el radical superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo (OH^\cdot), (Wu y Jourlink., 2002; Dobrian *et al.*, 2001; Reckelhoff y Romero, 2003). El O_2^- , uno de los radicales libres más activos en la pared vascular, se produce principalmente por la hiperactividad de la NADPH oxidasa. Según esta hipótesis, hemos encontrado cómo en las células mononucleares, acompañado de este incremento de EO, se produce un aumento en los niveles de algunos de los principales componentes del complejo NADPH oxidasa. Además, durante el tratamiento antihipertensivo los niveles de ARNm de los genes *CYBB*, *NCF1*, *NCF2* y *RAC2*, que inicialmente se encontraron significativamente más altos que en el grupo control, y los de los genes *CYBA* y *RAC1* que inicialmente fueron iguales, disminuyeron significativamente con la reducción en el nivel EO.

Una explicación alternativa para el alto nivel de EO observado en hipertensos, que no excluye la anterior, es la existencia de alteraciones en las actividades enzimáticas antioxidantes. Las enzimas antioxidantes constituyen una parte importante del total de la actividad antioxidante de las células

aeróbicas. La coordinación de las funciones antioxidantes tiene como resultado el mantenimiento de los niveles de las EROs por debajo de los valores críticos, compatibles con el rendimiento y la viabilidad celular. Se conoce que cada una de estas enzimas es susceptible de ser inactivada por las EROs y que su oxidación conduce a su degradación mediada la acción del proteosoma, en gran medida (Salo *et al.*, 1990; Davies, 1987; Pigeolet *et al.*, 1990; Pigeolet y Remacle, 1991). Por otra parte, ya sea directamente o a través de productos derivados, las EROs regulan la expresión de estos genes antioxidantes, entre otros genes, como parte de una respuesta adaptativa (Dalton *et al.*, 1999; Morel y Barouki, 1999).

La reducción de la actividad de las enzimas cobre-zinc superóxido dismutasa (CuZnSOD), catalasa y sistema glutatión se debe, en parte, a una consecuencia de la inactivación de enzimas y la degradación inducida por sus propios productos (Cabelli *et al.*, 1989) o por los radicales libres (Grune *et al.*, 1998). Los niveles de ARNm observados en estas enzimas en la HTA sólo pueden explicarse por la existencia de una alteración en la respuesta de expresión, ya que no se ha descrito importantes regulaciones post-transcripcional o post-translacional de estas enzimas. Por otra parte, la respuesta anormal al EO parece que se mantiene incluso tras el tratamiento cuando estos niveles de EROs disminuyen.

De esta manera, la regulación a la baja de la expresión del gen *SOD1*, que codifica para la enzima CuZnSOD, debida al aumento de EO, se ha descrito en otras condiciones como en el riñón y el hígado de ratas con insuficiencia renal crónica inducida por la reducción de masa renal (Vaziri *et al.*, 2003).

En contraste con el comportamiento del gen *SOD1* observado en la HTA, los niveles de ARNm del gen *SOD2*, que codifica para la superóxido dismutasa mitocondrial (MnSOD), eran más elevados en sujetos hipertensos que en el grupo control, y con el tratamiento antihipertensivo estos niveles se redujeron. Estos resultados controvertidos entre las enzimas MnSOD y CuZnSOD no son inesperados, dado que presentan distintas localizaciones. La MnSOD es activa en la mitocondria mientras que la CuZnSOD en el citoplasma, y sus regiones promotoras difieren bastante entre si. El gen *SOD2* se induce por citoquinas, aparte de presentar una regulación postraducciona muy fuerte (Zelko *et al.*, 2002).

A continuación se comentará las diferencias observadas entre los sistemas antioxidantes glutatión (GSH) y tiorredoxina (TRX): Una parte de este trabajo consistió en la evaluación simultánea de estos dos importantes sistemas en sujetos hipertensos en ausencia y tras el tratamiento antihipertensivo. En hipertensos sin tratar, en presencia de EO crónico, se observaron discrepancias en los niveles de ARNm de los distintos componentes de los sistemas de GSH y TRX. Además de los bajos niveles de GSH, la disminución de los niveles de ARNm de los genes (*GCLM*, *GCLC*, *GSS* y *GSR*) fueron observados en las células mononucleares de sujetos hipertensos, en comparación con los controles. Por tanto, si el ARNm de las enzimas que tienden a mantener los niveles de GSH se reducen, esto puede haber contribuido a los bajos valores observados de GSH.

Además, estos bajos niveles de ARNm disminuyeron aún más tras el tratamiento antihipertensivo, cuando el EO se redujo y los niveles de GSH aumentaron, posiblemente debido a que las necesidades de GSH eran más bajas que en ausencia de tratamiento. Los datos pueden indicar que en los sujetos hipertensos no tratados, la expresión de ARNm del sistema GSH fue el más alto posible y que la reducción de EO por tratamiento antihipertensivo redujo la inducción de estos genes. Estos datos confirman que el EO en la HTA esencial no sólo depende de una mayor producción de EROs, sino también de una respuesta anormal de regulación de los mecanismos antioxidantes como el sistema GSH y CuZnSOD y catalasa, como acabamos de ver.

En contraste con el sistema de GSH, los niveles de ARNm de los genes *TXN* y *TXN2*, así como los de dos de las tiorredoxina reductasas (TNXRDs), *TNXRD1* y *TNXRD2*, fueron significativamente mayores en hipertensos que en los controles. Cuando el tratamiento redujo los niveles de EO, los niveles de ARNm de estos genes se redujeron en paralelo con EO aunque se mantuvieron en niveles más altos que en los controles. Estos datos pueden reflejar que, bajo un EO crónico, el sistema TRX está respondiendo mediante el aumento de expresión de sus genes. La reducción de EO reduce el nivel de estimulación, un patrón de comportamiento similar se ha descrito por una rápida inducción por EO (Haendeler *et al.*, 2004; Hagg *et al.*, 2006).

En muchas situaciones, ambos sistemas están coordinadamente regulados (Hagg *et al.*, 2006; Jurado *et al.*, 2003), pero en nuestros resultados hemos encontrado una profunda disparidad entre ellos. Esto podría explicarse por una diferente regulación bajo los efectos de EO crónico presentes en la HTA esencial. En esta situación, poco se sabe sobre la regulación y la respuesta de ambos sistemas. En condiciones de EO no crónico, la síntesis de GSH es inducida por marcadores de EO mediante la activación de la transcripción de ARNm de dos subunidades de la γ -glutamato cisterna ligasa (GCL), *GCLC* y *GCLM* (Wild y Mulcahy, 2000). Además, la actividad de GCL se coordina con la activación de la glutatión sintasa (GSS) para inducir la síntesis de GSH. Una relación directa se ha observado entre los niveles de ARNm de ambas enzimas (Krzywanski *et al.*, 2004). En el caso de la HTA, los niveles de ARNm de ambas subunidades están disminuidos con respecto a los controles, pero probablemente en ese punto estarán expresando su máxima capacidad, ya que cuando los pacientes son tratados con fármacos antihipertensivos, estos niveles disminuyen. Estos datos indican que los hipertensos muestran su máxima expresión de todas las enzimas antioxidantes en respuesta al presente EO en la patología, pero sus sistemas antioxidantes no son capaces de controlar este exceso de EO.

Por otra parte, las diferencias en el comportamiento de estos dos sistemas estaban presentes no sólo en la situación basal, sino también durante el tratamiento antihipertensivo. Mientras los niveles de ARNm del sistema GSH no mejoraron, a pesar de la reducción de EO, los niveles de ARNm del sistema TRX, aunque disminuyeron, siguieron siendo superiores al de los sujetos control tras el tratamiento. Estos

datos pueden indicar una activación del sistema de TRX debido a los elevados y mantenidos niveles de EO, aunque bajo tratamiento antihipertensivo este sistema responde disminuyendo.

Aunque el estudio no fue diseñado para buscar diferencias entre los distintos tipos de tratamiento, es interesante comentar la ausencia de diferencias entre los distintos grupos de tratamiento. Aunque el tratamiento puede afectar a los niveles de Ang II o a la actividad de inhibidores específicos NAD(P)H-oxidasa, como apocinina, evitando la generación de EROs (Hirota *et al.*, 2002), deben existir otros mecanismos responsables de la generación de EROs en la HTA. De esta manera, el aumento de los niveles de EO y los bajos niveles de ARNm del sistema GSH puede indicar que las células mononucleares de los sujetos hipertensos tienen una menor protección frente a EO. Además, los pacientes en tratamiento muestran una protección más débil y esto puede suponer una mayor sensibilidad a situaciones de EO y, por tanto, facilitar, la progresión de una lesión oxidativa continua o esporádica. Estas alteraciones pueden facilitar el desarrollo de disfunción endotelial y el daño de diversos órganos diana (Modlinger *et al.*, 2004; Raji, 1999; Wilcox, 2005; Zalba *et al.*, 2001).

Por último, los datos actuales también ofrecen información acerca de la importancia relativa del los sistemas GSH y TRX en la defensa contra la sobreproducción crónica de radicales libres en la HTA. De acuerdo con el comportamiento observado y el estado de EO, el sistema de GSH juega un papel más importante que el sistema TRX en el control de EO en la HTA. Probablemente, el sistema TRX está inducido cuando el GSH intracelular es consumido por los efectos crónicos de EO. Sin embargo, a pesar de la inducción del sistema TRX, este sistema no es capaz de controlar el aumento de la generación de EROs, cuando existe una respuesta inadecuada por parte del sistema GSH.

Por otra parte, en el desarrollo de la microalbuminuria se conoce como las altas concentraciones de proteínas en el fluido tubular causan toxicidad renal y la producción de citoquinas proinflamatorias y factores vasoactivos, lo que se traduce en isquemia regional, proliferación de fibroblastos, aumento de la síntesis intracelular de la matriz, infiltración de leucocitos y lesiones glomerulares (Williams y Coles, 1994; Remuzzi *et al.*, 1997). El efecto de los monocitos, y su capacidad para producir un aumento de EO, provocado por la activación del complejo NADPH oxidasa, se han abordado en numerosos estudios (Heinzelmann *et al.*, 1999; Agnihotri *et al.*, 1995; Heitzer *et al.*, 1999; Wenzel *et al.*, 2000; Newman *et al.*, 2000; Rastaldi *et al.*, 2000). Los datos que observamos en el presente estudio se correspondieron con lo anteriormente mencionado. Cuando analizamos los niveles de ARNm en los sujetos microalbuminúricos *versus* normoalbuminúricos, observamos como estos niveles eran mayores en diversos componentes del complejo NAD(P)H-oxidasa, concretamente en el gen *CYBA* que codifica para la subunidad p22phox. Por otra parte, también se observó una activación de los sistemas antioxidantes, como la MnSOD y el sistema TRX, para intentar compensar este exceso de producción de EO que se observa en este grupo de pacientes.

6.2.3 Estudio de Polimorfismos Implicados en EO

El análisis genético de los rasgos y enfermedades multifactoriales, como la HTA o la mALB, esta última como un marcador temprano de daño orgánico, se considera complejo debido a su origen poligénico, a la heterogeneidad genética, a la penetrancia variable y a las interacciones gen-gen, gen-ambiente y ambiente-ambiente que pueden ocurrir (Sharma *et al.*, 1999). En esta tesis se ha evaluado la influencia de diferentes polimorfismos de los sistemas pro-oxidantes y antioxidantes en la presión arterial y la excreción urinaria de albúmina (EUA) en pacientes con HTA esencial. Durante el desarrollo de este trabajo y de manera complementaria, también se genotiparon todos los polimorfismos en otra población general de 1502 individuos. Esta caracterización nos ha permitido obtener información importante sobre el riesgo de HTA y mALB en población general.

A continuación evaluaremos la influencia de cada uno de los polimorfismos donde hemos encontrado alguna asociación en función del gen al que pertenezcan.

6.2.3.1 Sistemas Productores de Estrés Oxidativo

Xantina Oxidorreductasa (XDH)

El gen *XDH* está localizado en el brazo corto del cromosoma 2, se extiende por más de 150kb y se organiza en 36 exones (Terao *et al.*, 1997). Aunque varios polimorfismos se han descrito a lo largo de este gen en las bases de datos, el potencial impacto de las variaciones del gen *XDH* no ha sido analizado.

En nuestros resultados pudimos observar como tres polimorfismos de este gen se asociaron a niveles de PAS, EUA y EO. El haplotipo de dos de ellos, también mostró significación con los valores de PAS.

En el presente estudio, se observó una relación entre dos polimorfismos del gen *XDH*, rs206812 (c.-337 G>A) y rs2073316 (c.564+64T>C), analizado de forma independiente y sus haplotipos con valores de PAS. Además, el EO, medido por los niveles de GSSG, también fue mayor en el genotipo que mostraba un mayor valor de presión arterial sistólica, para el polimorfismo rs206812 (c.-337 G>A).

Por otra parte, encontramos cómo el polimorfismo rs10175754 (c.307-33 A>G), que estaba en desequilibrio de ligamiento con el rs2073316, mostraba una fuerte asociación con los niveles de EUA, en ambas poblaciones de hipertensos analizadas.

En artículos previos, se ha descrito una relación positiva entre los valores de PA y la actividad de la XDH en preeclampsia e HTA esencial (Newaz *et al.*, 1996; Yildirim *et al.*, 2004). Por lo tanto, se podría asumir que determinados polimorfismos podrían facilitar el incremento de la presión arterial en sujetos

con unos genotipos concretos que predisponga a altos niveles de presión arterial y en consecuencia a incrementar las posibilidades de desarrollar HTA.

La posible relación entre los polimorfismos y el aumento de los niveles de presión arterial podría explicarse a través de un aumento de EO inducido por los alelos asociados a los valores más elevados de la presión arterial. La influencia de estos polimorfismos puede ser importante en la producción de radicales libres en hipertensos y esto puede reflejarse por el aumento de los derivados oxidativos. El incremento de EO en el mismo alelo del polimorfismo (c.-337A), en el que hemos encontrado un incremento de la presión arterial puede indicar la influencia de la actividad XDH y su producción de radicales libres en los niveles de presión arterial.

En seres humanos, la actividad de la XDH se ha relacionado con diversas enfermedades renales y cardiovasculares, presión arterial, HTA y disfunción endotelial en varios tejidos (Laakso *et al.*, 2004). Existen evidencias de que la actividad de XDH puede inhibir la vasodilatación dependiente de NO en células musculares lisas e incrementar la disfunción vascular (Houston *et al.*, 1999; Landmesser *et al.*, 2002). También se conoce cómo esta enzima puede estar implicada en la generación de EROs en el riñón en condiciones patológicas, como daño renal (Greene y Paller, 1992) e hipertrofia renal inducida por la HTA (Laakso *et al.*, 2004). En este sentido nuestros datos podrían estar relacionados con este aumento de actividad en la mALB, donde observamos cómo individuos con el genotipo AA para el polimorfismo rs10175754 muestran unos mayores valores de EUA y riesgo de desarrollar mALB.

Hasta ahora, no hay información acerca de la influencia de estos polimorfismos en la actividad de la enzima. El polimorfismo rs206812 (c.-337 G>A) situado en el promotor del gen, podría estar implicado en la regulación de su expresión. Los polimorfismos rs2073316 (c.564+64T>C) y rs10175754 (c.307-33 A>G), podrían causar por si mismos el efecto observado mediante la alteración del procesamiento de ARN mensajero o estar en desequilibrio de ligamiento con otro polimorfismo que fuera el causante de modificaciones en la actividad de la proteína y elevar los niveles de PA y EUA.

En resumen, los polimorfismos del gen *XDH* parecen estar relacionados con los niveles de PAS y EUA en paralelo con un incremento en los parámetros del EO en células mononucleares periféricas (Chaves *et al.*, 2007b).

Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Oxidasa (NAD(P)H Oxidasa)

Numerosos estudios indican el importante papel del complejo NADPH oxidasas en patologías vasculares como la HTA (Rajagopalan *et al.*, 1996) y la aterosclerosis (Barry-Lane *et al.*, 2001). Este complejo NADPH oxidasa es activado por numerosas moléculas como la angiotensina II, noradrenalina y el factor de necrosis tumoral alfa entre otras (Griendling *et al.*, 2000) y es la principal fuente de EO en células de la pared vascular (Griendling *et al.*, 2000). Este complejo puede jugar un papel crucial en la formación de EROs en el riñón en condiciones patológicas, actuando como mediador de procesos de apoptosis en células tubulares o podocitos y proliferación celular en células mesangiales, con lo que provocaría un detrimento de la función renal (Jiang, 2009). En el presente trabajo, hemos encontrado diversas variaciones genéticas asociadas a un incremento en los valores de EUA y a su vez con el riesgo de desarrollar mALB, mostrando como estas variaciones influyen en la patología hipertensiva renal.

El complejo NADPH oxidasa está formado por el citocromo b558 localizado en la membrana (compuesto de una proteína de bajo peso molecular, p22phox, y la subunidad p91phox) y cuatro subunidades citosólicas (p47phox, p67phox, p40phox y rac1 o rac2), que son translocadas y asociadas al citocromo durante la activación del complejo. La activación NADPH oxidasa se produce a través de: 1) modificaciones post-traduccionales de proteínas y 2) la translocación a la membrana citoplasmática de las subunidades de regulación, en particular p47phox aunque la p67phox es esencial (Griendling *et al.*, 2000).

Citocromo b-245, polipéptido alfa (CYBA)

El gen *CYBA* codifica una proteína 22-kD compuesta por 195 aminoácidos con un alto contenido de prolina (10%). Esta proteína, conocida con el nombre subunidad p22phox, forma una parte fundamental del complejo NADPH-oxidasa. El gen *CYBA* está situado en el brazo largo del cromosoma 16 en la posición 24. Se extiende por 8,5 kb y está compuesto de seis exones. Un gran número de polimorfismos genéticos se han identificado en el promotor y regiones codificantes del gen, algunos de los cuales son capaces de influir en la expresión génica y la activación de NADPH oxidasa, dando lugar a importantes diferencias funcionales entre los individuos. Además, algunos de estos polimorfismos se han asociado con diversas enfermedades cardiovasculares, como la HTA, la enfermedad arterial coronaria y la diabetes. Uno de los polimorfismos más extensamente estudiado ha sido el rs4673, c.214C>T conocido como el polimorfismo C242T, que produce el cambio de histidina a tirosina en la posición 72 de su secuencia proteica. Sus resultados de asociación han sido contradictorios, algunos autores confirman la correlación entre el polimorfismo C242T y la HTA arterial en población caucásica (Moreno *et al.*, 2007) y la enfermedad renal (Perianayagam *et al.*, 2007; Doi *et al.*, 2005), mientras que otros reportan la falta de asociación entre este polimorfismo y la pre-eclampsia (Raijmakers *et al.*, 2002). Cuando analizamos este polimorfismo en las distintas poblaciones no encontramos ninguna correlación con respecto a valores de

PA, riesgo de HTA o mALB. Esta falta de asociación podría deberse a que existan demasiados factores de riesgo cardiovascular capaces de confundir los posibles efectos del presente polimorfismo en enfermedades poligénicas como la HTA. Recientemente también se han caracterizado dos variantes genéticas en el promotor del gen, los polimorfismos c.-930A>G y c.-675A>T, que se asocian con una hiperactividad de la NADPH oxidasa en la HTA arterial (Moreno *et al.*, 2007).

Entre nuestros resultados hemos encontrado como el alelo A del polimorfismo rs7195830, localizado en la región 3'UTR del gen en la posición c.*69 G>A, se asoció a valores elevados de EUA tanto en las poblaciones de hipertensos como en población general y a su vez con un mayor riesgo de desarrollar mALB que el alelo G, más frecuente. Debido a su posición este polimorfismo podría estar afectando a la tasa de transcripción al modificar la estabilidad y el procesado del ARNm. Este polimorfismo fue analizado en un estudio multicéntrico caso-control en sujetos con linfoma no *Hodgkin* sin encontrarse asociación alguna (Wang *et al.*, 2004). Ésta es la primera correlación positiva que se encuentra entre valores de EUA y el riesgo de mALB en el complejo NADPH oxidasa, ya que en anteriores trabajos donde se analizó la posible influencia del polimorfismo c.214C>T y niveles de EUA no se halló ninguna relación significativa (Kuznetsova *et al.*, 2008).

Factor citosólico de neutrófilos 2 (P67phox o NCF2)

El Factor citosólico de neutrófilos 2 (NCF2) es una proteína de 526 aminoácidos y masa molecular de 67 kD, codificada por el gen *NCF2*, que está ubicado en el cromosoma 1q25. Éste tiene una longitud de 40 kb y contiene 16 exones que generan un ARNm de 2.4 kb (Kenney *et al.*, 1993). Se han descrito diversas mutaciones en su secuencia genética, todas ellas dan como resultado una ausencia total del producto proteico (Leusen *et al.*, 1996; Bonizzato *et al.*, 1997) y produciendo la enfermedad granulomatosa crónica por deficiencia de NCF2. Ningún polimorfismo en NCF2 se ha demostrado estar asociado con otra enfermedad humana distinta de la enfermedad granulomatosa crónica.

En nuestros resultados hemos encontrado que el alelo C presentaba mayores niveles de PAS que el alelo T en ambas poblaciones de pacientes hipertensos. Además el alelo C también se correlacionaba con mayores niveles de 8-oxo-dG. Este polimorfismo se localiza en el exón 5 del gen y corresponde a una sustitución conservativa del aminoácido lisina a arginina en la posición 181. No se ha encontrado ninguna asociación previa entre este polimorfismo y alguna enfermedad. La asociación hallada en este polimorfismo hace que sea interesante su estudio funcional o la búsqueda de algún otro polimorfismo en desequilibrio de ligamiento con él, que nos ayude a desvelar las claves que podrían estar afectando a la activación del complejo NADPH oxidasa en la regulación de la presión arterial.

Proteína pequeña de unión a GTP (RAC 2)

El gen *RAC2* contiene 7 exones, repartidos a lo largo de 18 kb del cromosoma 22q. La proteína codificada por este gen es una GTPasa que pertenece a la superfamilia RAS de proteínas pequeñas de unión a GTP. Los miembros de esta superfamilia parecen regular gran diversidad de eventos celulares, incluido el control del crecimiento celular, la reorganización del citoesqueleto, y la activación de proteínas quinasas, esenciales para el ensamblaje del complejo NADPH oxidasa, y la producción de EROs.

Cuando analizamos los polimorfismos presentes en este gen y los niveles de EUA y riesgo de mALB, encontramos dos polimorfismos asociados en la población general de Valladolid. El polimorfismo rs3179967 (c.477 T>C; p. A159A), que no produce un cambio de aminoácido, se asoció a mayores niveles de EUA cuando los sujetos presentaban el alelo C. Con respecto al polimorfismo rs2239774 (c.84G>C; p.A27A; tag-SNP) también observamos un aumento en los valores de EUA en los individuos que contenían el alelo minoritario, C. Además cuando incluimos estos dos polimorfismos en el análisis de haplotipos, junto con el polimorfismo rs9798725, situado en la región 3'UTR del gen y que también había mostrado unos niveles elevados de EUA en los individuos que contenían el alelo C de este polimorfismo en ambas poblaciones de hipertensos, se observó como el haplotipo formado por todos los alelos C de cada uno de los polimorfismos presentaban un riesgo incrementado con respecto al grupo de referencia (CTG) para los polimorfismos: 9798725, rs3179967 y rs2239774.

A pesar de que estos polimorfismos no estén alterando la función de la proteína por si solos, podría ser que algún polimorfismo en desequilibrio de ligamiento con ellos o incluso el polimorfismo rs9798725, situado en la región 3'UTR, estuviera modulando la actividad del gen o de la proteína y el ensamblaje de esta subunidad al complejo y en consecuencia nos estarían ayudando a caracterizar la susceptibilidad a la microalbuminuria.

6.2.3.2 Sistemas Protectores frente al EO

Hemos encontrado distintas variaciones asociadas a los niveles de PA, EUA y riesgo de mALB e HTA distribuidas a lo largo de todos los sistemas antioxidantes. Comentaremos cada uno de los genes en donde las hemos encontrado.

Superóxido dismutasa 3, extracelular

El gen *SOD3*, que codifica para la proteína superóxido dismutasa extracelular (ECSOD), se encuentra en el cromosoma 4p16.3-q21, contiene tres exones y dos intrones. En el cuerpo humano, ECSOD está presente en la mayoría de los tejidos pero en pequeñas cantidades. Sin embargo, dentro de los tejidos vasculares su presencia aumenta hasta alcanzar entre 30 y un 50% del total de la actividad SOD, mantenimiento los niveles del radical superóxido bajos y la biodisponibilidad de NO óptima para que se produzca la relajación vascular y una adecuada regulación de la presión arterial (Strålin *et al.*, 1995; Góngora *et al.*, 2006; Fattman *et al.* 2003). Varios estudios han investigado el papel de la ECSOD en la enfermedad vascular y la HTA, teniendo en cuenta que una alteración en la función ECSOD es probable que influyan en el desarrollo de ambas condiciones (Zhou *et al.*, 2006; Góngora *et al.*, 2006; Welch *et al.*, 2006; Welch *et al.* 2005).

Los resultados presentados en esta trabajo mostraron como el alelo A del polimorfismo rs2536512, que produce la sustitución de un aminoácido alanina a treonina en la posición 58 del gen *SOD3*, estaba relacionado con mayores niveles de PAS y PAD tanto en la población de hipertensos como en la población general de Valladolid, además estos valores también fueron mayores en la EUA en la población de hipertensos. El estudio en la población general nos permitió evaluar el riesgo presente de HTA, observando cómo este mismo alelo también estaba asociado a un mayor riesgo de HTA. A su vez el estudio de haplotipos del gen mostró una combinación entre el alelo G del polimorfismo rs2284659, localizado en el promotor del gen, y el alelo G del rs2536512, que estaba presente en el 5% de la población y reducía el riesgo de HTA. Además esta combinación de alelos mostró una reducción en los valores tanto de PAS como PAD en 6 y 2 de mmHg, respectivamente, respecto a los valores de la combinación de referencia, alelo rs2284659-G y rs2536512-A.

Recientemente se publicó un estudio en el que se encontraron diferencias significativas entre sujetos hipertensos y controles en un haplotipo del gen *SOD3*, que contenía el polimorfismo rs2536512 (Naganuma *et al.*, 2008), sugiriendo que este haplotipo podía ser considerado como un marcador genético de HTA. Por otra parte, en el estudio de Tamai y colaboradores describieron la asociación entre el alelo A del polimorfismo rs2536512 con resistencia a la insulina y susceptibilidad a diabetes tipo 2 en sujetos japoneses (Tamai *et al.*, 2006). Además, Tamai reportó cómo el alelo A también estaba asociado

a HTA, lo que apoyaría nuestros datos. Las conclusiones del presente estudio, junto con los dos artículos anteriores, sugieren la posibilidad de que el alelo A se asocia con alteraciones de la función de la proteína ECSOD. En la actualidad se desconoce si el polimorfismo rs2536512 es funcional o está en desequilibrio de ligamiento con alguna variante funcional. Se requieren más estudios para determinar si existen diferencias en la localización o actividad de la proteína para cada variante alélica. Sería de esperar que la alteración en la función de la ECSOD condujera a un aumento de EROs, provocando un aumento de LDL oxidadas y la disminución de la vasodilatación mediada por NO, lo que a su vez puede contribuir al deterioro de la absorción de la glucosa, resistencia a la insulina, y al aumento de la presión sanguínea.

Catalasa

Catalasa (CAT) es una enzima antioxidante endógena que protege a las células contra el daño producido por EROs al convertir al peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, evitando así lesiones celulares (Rohrdanz y Kahl, 1998). Los individuos con la actividad de CAT reducida tienen una mayor incidencia de enfermedades relacionadas con EO, como aterosclerosis (Cojocarú *et al.*, 2004), diabetes (Góth y Eaton, 2000; Góth *et al.*, 2005) y dislipemia (Góth, 2000). Hace algunos años, se investigó la posible asociación de varios polimorfismos del gen *CAT* con HTA (Jiang *et al.*, 2001), diabetes (Chistiakov *et al.*, 2004) y enfermedad de Alzheimer (Goulas *et al.*, 2002) y se describieron dos polimorfismos en la región promotora del gen, c.-844A>G (rs769214) y c.-262T>C, que estarían asociados a valores elevados de PAS (Jiang, *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2005). Estos dos polimorfismos estarían alterando la zona de reconocimiento de varios factores de transcripción, MZF1 y AP2 en el caso de c.-844A>G (Jiang, *et al.*, 2001) y AP1 y SP1 en el de c.-262T>C (Forsberg *et al.*, 2001) lo que provocaría diferencias en la actividad transcripcional del gen.

En nuestro estudio hemos encontrado como el alelo T del polimorfismo rs1049982 del gen *CAT* mostraba menores valores de PAS que el alelo C en sujetos hipertensos de ambas poblaciones y además en la población general también estaba asociado a menores valores de PAD y riesgo de HTA. Este polimorfismo localizado como los anteriormente descritos en la región 5'UTR, c.-20C>T, ha sido asociado recientemente con el menor riesgo de osteonecrosis de la cabeza del fémur en población coreana (Kim *et al.*, 2008), enfermedad donde el exceso de EROs juega un papel importante en la patogénesis (Ichiseki *et al.*, 2004; Ichiseki *et al.* 2006). Por otra parte, hallamos cómo el genotipo GG del polimorfismo rs7104301, considerado como tag-SNP en población caucásica y localizado en la región 3'UTR, c.*658A>G, estaba asociado a mayores niveles de PAS que los genotipos AA y AG en la población general de Valladolid.

Cuando en el análisis de haplotipos se incluyeron los polimorfismos rs1049982 y rs714301, encontramos que el haplotipo CG mostraba un mayor riesgo de HTA con respecto al haplotipo de referencia TA y también observamos cómo su significación fue mucho mayor que al analizarlos de forma individual. De este último dato podemos extraer la apreciación compartida con otros autores (Zhang *et al.*, 2002) de que el análisis de haplotipos es una herramienta mucho más eficaz para calcular la

susceptibilidad de algunos genes a una determinada enfermedad multifactorial (Sharma *et al.*, 1999; Ombra *et al.*, 2001) que el análisis de asociación de cada marcador de forma independiente.

Por otra parte, cuando evaluamos el riesgo de mALB en los polimorfismos de este gen, hallamos cómo el alelo T del polimorfismo rs769217 mostraba valores menores de EUA y menor riesgo de desarrollar mALB que el alelo C. Algunos autores han sugerido que este polimorfismo (c.1167C>T o p.D389D) en el exón 9 del gen es un lugar susceptible de menor riesgo de hipocatalasemia (Góth *et al.*, 2005) y vitiligo en los coreanos (Park *et al.*, 2006) por lo que podría estar influyendo en la actividad de esta enzima. Además en población general encontramos otro polimorfismo, rs511895, que está asociado a los niveles de mALB y el riesgo de mALB. El genotipo AA de este polimorfismo, que se localiza en el intrón 10, c.1326+1947G>A y es considerado como tag-SNP del gen *CAT*, estaba asociado a menores niveles de EUA y menor riesgo de mALB. El análisis de haplotipos realizado entre los polimorfismos rs1049982, rs714301 y rs511895, reveló cómo un haplotipo del gen que contenían el alelo A del rs511895 presentaban un bajo riesgo de mALB (p-valor <0.001). Al igual que el anterior mostraba una asociación mucho más fuerte que al analizar los polimorfismos de forma separada.

En resumen, estos resultados sugieren que los polimorfismos del gen de la *CAT* se asocian con la susceptibilidad a la HTA y mALB. Aunque se necesitan pruebas funcionales que confirmen esta correlación, ya que el uso de los polimorfismos tag-SNP nos agrupa la variabilidad que existe en un gen pero no nos muestra qué polimorfismo concreto sería el causante sino uno que está en desequilibrio de ligamiento con él.

Sistema Glutación

Dentro del sistema glutación solo hemos encontrado alguna asociación en la enzima glutación peroxidasa 1 (GPX1). Esta enzima está codificada por el gen *GPX1*, que está localizado en el cromosoma 3p21.3 y contiene dos exones. Esta enzima está ubicuamente expresada en todos los tejidos humanos y es particularmente abundante en eritrocitos, riñón e hígado. GPX1 es conocida por su papel como enzima antioxidante y clave en las células endoteliales vasculares, tras demostrarse que ejercía un efecto protector contra la presencia de enfermedad arterial coronaria (Schnabel *et al.*, 2005). Con respecto a los estudios de polimorfismos realizados sobre esta enzima existen resultados contradictorios. Generalmente el polimorfismo estudiado es el rs1050450, que produce un cambio de aminoácido (p. P198L). Este polimorfismo se ha encontrado asociado a la enfermedad cardiovascular y a diversos tipos de cáncer, resultando el aminoácido leucina reductor en un 40% de la actividad de la enzima en ensayos *in vitro* (Ravn-Haren *et al.*, 2006; Kato *et al.*, 2008). Aunque con respecto a hipertensión no se han encontrado asociaciones positivas, recientemente se publicó un artículo donde se describía la falta de correlación

entre este polimorfismo y el riesgo de hipertensión, aunque encontraban una asociación con los niveles de PAS y PAD en hombres (Yamada *et al.*, 2006)

En nuestro trabajo el polimorfismo P198L no mostró diferencias significativas para ningún parámetro analizado en ninguna población tanto en hombres como mujeres, pero por el contrario observamos una reducción en los valores de PAS en los individuos hipertensos de ambas poblaciones que presentaban el alelo T del polimorfismo rs3448. Esta variación genética situada en la región 3'UTR del gen *GPX1*, c.*891C>T, podría estar regulando la expresión del mismo, o ligado a otro. En nuestros datos observamos cómo los individuos con el alelo T también muestran una reducción en los valores de EO en comparación con los individuos que presentan el alelo C. Esto nos estaría indicando que este polimorfismo estaría implicado en la reducción de EO y como consecuencia en la reducción de la PA.

Sistema Tiorredoxina

Las proteínas tiorredoxinas (TRX1 y TRX2) tienen importantes funciones redox-catalíticas. La TRX1 es una de las selenoproteínas más estudiadas por su papel protector frente a EO y la aterogénesis en la pared vascular. Por el contrario todavía no parece estar muy claro el papel que debe desarrollar la TRX2 de localización mitocondrial. La TRX1 actúa regulando la función de al menos 30 proteínas dianas, diferentes factores de transcripción como NF- κ B o AP1 y distintas actividades enzimáticas, estimulando el crecimiento celular e inhibiendo la apoptosis.

Las tiorredoxina reductasas (TRXR), que reciben este nombre por su capacidad de reducir a las proteínas TRX1 y TRX2, juegan un papel fundamental en la defensa antioxidante y en la regeneración de las TRXs. Se ha confirmado la existencia de dos formas de estas reductasas, TRXR1 y TRXR2, que son codificadas por los genes *TXNRD1* y *TXNRD2*, respectivamente.

Tiorredoxina

El gen *TXN* que codifica para la proteína TRX de 105 aminoácidos, se localiza en el cromosoma 9 y contiene 5 exones a lo largo de 12.84 Kb. Funcionalmente, este gen se ha propuesto que participa en diversos procesos (movilidad y proliferación celular, señalización célula-célula, señales de transducción, homeostasis del estado redox, transporte de electrones).

Nuestros resultados mostraron cómo el alelo C del polimorfismo rs2301241, considerado como tag-SNP en población caucásica, se encontraba asociado a niveles de PAS y PAD menores que el alelo T en ambas poblaciones de hipertensos. Este polimorfismo localizado en la región promotora, c.-793C>T, podría estar modulando la expresión de la proteína y regulando los niveles de EROs que influirían a su vez

sobre los niveles de PA. A su vez en un estudio en paralelo hemos observado cómo el mismo alelo T de este polimorfismo estaba asociado a menores valores de índice de masa corporal, perímetro de cintura y presenta menor riesgo de obesidad y obesidad central (Mansego *et al.*, 2009, sometido). Este encuentro nos explicaría como polimorfismos de EO pueden estar mediando en el desarrollo de varias patologías y su compleja interacción.

Tiorredoxina reductasa 2

El gen *TXNRD2* está localizado en el cromosoma 22.y se extiende a lo largo de 66.48 kb, conteniendo en su estructura génica 16 exones. Los polimorfismos analizados se encuentran distribuidos a lo largo de su estructura. A partir de los análisis de asociación hemos encontrado cómo el alelo G del polimorfismo rs5992495, que corresponde al cambio de un aminoácido de serina en posición 299 a arginina, se asocia a elevados valores de PA tanto sistólica como diastólica y a su vez a un mayor riesgo de HTA en población general. No existen referencias sobre pérdida de función de esta proteína debida a la presencia de este polimorfismo. Tampoco hemos replicado estos datos en otra población general, por lo que estos datos todavía están por confirmar su posible efecto. En el caso de confirmarse nuestros hallazgos, este polimorfismo aportaría susceptibilidad genética a la HTA.

6.2.3.3 Interacción entre los Sistemas

El presente estudio mostró por primera vez la interacción entre los polimorfismos rs206812 del gen XDH y el rs3448 del gen TXN en la HTA. Utilizando el método MDR, establecimos la asociación entre estos polimorfismos con la elevación de la PAS en sujetos hipertensos. La combinación de alelos de riesgo para ambos polimorfismos aumentaron 5% el valor de la PAS en estos sujetos hipertensos y en consecuencia se estaría incrementando el riesgo de morbilidad y mortalidad cardiovascular (Lewington *et al.*, 2002; Staessen *et al.*, 2003). El mecanismo biológico que explique esta posible asociación todavía no está esclarecido. Una explicación lógica sería que estas variantes genéticas estarían alterando la función de las proteínas en las que se encuentran y esto provocaría un aumento en la concentración de EROs, tanto por un aumento en la producción por parte de la XDH como por un descenso en la actividad antioxidante de la enzima GPX1. Como hemos visto al principio de esta discusión el aumento de EROs se correlacionaba con un aumento en los valores de la PA y subsecuencialmente el aumento de riesgo de complicaciones cardiovasculares a la larga.

La falta de interacción entre el resto de polimorfismos analizados en este estudio no excluye la presencia de otras posibles importantes interacciones entre otras variantes de estos genes. La aproximación utilizada para la selección de los polimorfismos, utiliza una frecuencia del alelo menor mayor de un 10%. Esto implicaría que las variantes raras que pudieran causar una importante susceptibilidad queden excluidas. También es posible que variantes comunes en estos genes interactúen como en genes de otras rutas biológicas también relevantes en el desarrollo de la enfermedad. Por ejemplo, estudios de epistasis modular en el metabolismo de levadura sugieren que las posibles interacciones se extienden más allá de los módulos funcionales de los genes que los contienen y con frecuencia se relacionan entre distintos módulos funcionales (Segre *et al.*, 2005).

También el método utilizado para la búsqueda de estas interacciones puede estar mostrando una fuerza moderada, como ya hemos comentado anteriormente. Por ello, nos deberíamos plantear cómo implementar estos métodos para lograr identificar las interacciones reales gen-gen para las distintas enfermedades, donde se puedan analizar las distintas variantes comunes a lo largo de todo el genoma, junto con los ajustes apropiados.

6.3 Límites y Otras Consideraciones

Las limitaciones del presente trabajo fueron, por una parte, el bajo número de muestras con datos completos de parámetros de EO, ARNm y genotipos para poder correlacionar estos tres aspectos en la hipertensión y la microalbuminuria. Por otra parte, la ausencia del estudio funcional de los distintos polimorfismos analizados, así como de sus haplotipos y de las posibles interacciones. Esto nos ayudaría a interpretar los posibles efectos de estas combinaciones y entender cómo realmente están actuando estas variantes de las secuencias genéticas sobre la modulación de las proteínas que las contienen o sobre otras proteínas próximas y así como los procesos biológicos donde están actuando.

Por otra parte, una de las ventajas o fuerza que presenta el trabajo es el abordaje del estudio del EO desde tres puntos de vista diferentes pero interrelacionado como son: 1) el estudio de los parámetros de EO, donde se observan las consecuencias de este EO; 2) el estudio de los ARNm: mecanismo intermediario de la generación de la maquinaria necesaria para la producción o la eliminación de este EO) y 3) el estudio de polimorfismos como el origen de la modulación de los genes de estas enzimas implicadas en EO y su replicación en dos grupos de pacientes hipertensos y en población general.

Además del estudio de polimorfismos, podemos destacar la baja tasa de inmigración que nos estaría introduciendo una fuente de variabilidad, el análisis de haplotipos completos que nos permite interpretar el efecto de la combinación de los polimorfismos en el gen y también el hecho de haber podido replicar los resultados en otra población. Como ya hemos comentado anteriormente, es importante el tema de la replicación de las asociaciones de polimorfismos, ya que hasta el momento, se podían encontrar falsos positivos en la literatura, producidos debido a un tamaño muestral insuficiente, caracterización inadecuada de los fenotipos, estratificación de las poblaciones, etc. En nuestros resultados, a pesar de que el tamaño es relativamente pequeño, se observa cómo los resultados son consistentes y replicados en dos poblaciones independientes de similares características, proporcionando credibilidad a los mismos.

6.4 Resumen y Visión de Futuro

Con lo revisado y planteado en el presente trabajo queda evidenciado que los daños oxidativos están presentes en la fisiopatología de la HTA esencial, como consecuencia del deterioro de los sistemas antioxidantes que promueven un estado crónico de EO en los sujetos hipertensos.

En relación a este EO en la HTA, es importante remarcar como los sistemas antioxidantes sí que están respondiendo al aumento de EROs ya que tras el tratamiento disminuyen su expresión, pero el sujeto hipertenso muestra unos niveles de ARNm de partida inferiores a los de los controles, por lo que estos pacientes se encontrarían desprotegidos frente al EO. Aunque la patogenia bioquímica-molecular sobre esta desregulación de las enzimas antioxidantes todavía no este clara, el estudio de las variantes génicas presentes en estos genes nos podría ayudar a dilucidar nuevas dianas terapéuticas para su mejora.

Además, en el estudio de este tipo de enfermedades complejas, que son controladas por mecanismos moleculares interrelacionados y caracterizados por la acción conjunta de varios genes de pequeño efecto, se hace necesario el desarrollo de nuevas estrategias más avanzadas y eficientes para la identificación de estas interacciones epistáticas y de nuevos patrones de susceptibilidad. Por ello, comprender los efectos de éstos y otros genes junto con los factores ambientales en el desarrollo de esta patología debe ser uno de los objetivos principales de futuras investigaciones.

Conclusiones

7. Conclusiones

1. El balance entre los sistemas oxidantes y antioxidantes se altera en el curso de la hipertensión arterial esencial, resultando un incremento de estrés oxidativo.
2. El presente modelo de hipertensión arterial esencial analizado posee un aumento en los niveles de estrés oxidativo tanto en plasma como en células monolinfocitarias, y a su vez, este aumento se ve correlacionado con los niveles de PA que muestran los sujetos.
3. El estrés oxidativo se relaciona con el aumento de los niveles de excreción urinaria de albúmina e independientemente de los valores de PA.
4. El aumento de los niveles de ARNm de genes que codifican las distintas subunidades de NAD(P)H oxidasa y la disminución de los niveles de ARNm de las enzimas antioxidantes en monolinfocitos, se relacionan con el estado crónico de estrés oxidativo presente en la hipertensión, a pesar de la activación del sistema tioredoxina y la enzima Manganese Superóxido Dismutasa. Por tanto, los pacientes hipertensos tanto en presencia o en ausencia de microalbuminuria se encuentran peor protegidos frente a EO que los sujetos control.
5. Independientemente del tratamiento antihipertensivo utilizado, los niveles de los marcadores bioquímicos de EO se reducen, y en consecuencia también los niveles de ARNm de todas las enzimas implicadas.
6. Los análisis de asociación han confirmado como ciertas variantes encontradas en los genes de las enzimas xantina oxidoreductasa, factor citosólico de neutrófilos 2 y glutatión peroxidasa 1 se asocian a mayores niveles de EO en sujetos hipertensos.
7. El análisis de los polimorfismos genéticos en los genes candidatos que codifican enzimas productoras o protectoras frente EO nos muestra la presencia de ciertas variantes modulando tanto los niveles de PA como de EUA y el riesgo de microalbuminuria en sujetos hipertensos. Hay que destacar que estos datos se han replicado en otra población de hipertensos independiente y que al extrapolar la investigación a la población general han surgido nuevas variantes asociadas y dos de ellas se mantuvieron también tanto en sujetos hipertensos como normotensos.
8. En el análisis de haplotipos se describió la interacción entre distintas variantes alélicas de un mismo gen en la hipertensión. Cabe destacar la importancia de los haplotipos de los genes xantina

oxidorreductasa, superóxido dismutasa extracelular y catalasa, ya que al genotipar solo unos pocos polimorfismos estaríamos obteniendo la variabilidad completa de estos genes y su nivel de riesgo de hipertensión o microalbuminuria.

9. Por último, en el análisis intergénico observamos la interacción entre el gen de la enzima xantina oxidorreductasa y glutatión peroxidasa 1 en la población de hipertensos. Estas interacciones nos advierte de la naturaleza compleja de esta patología y de la necesidad de enfocar las nuevas investigaciones hacia el estudio de las interacciones entre los distintos genes y éstos con los factores ambientales.

Bibliografía

8. Bibliografía

- ❖ Adler V, Yin Z, Tew KD, Ronai Z. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene*. 1999. 1;18(45):6104-11.
- ❖ Agnihotri N, Ganguly NK, Kaur S, Khullar M, Sharma SC, Chugh KS. Role of reactive oxygen species in renal damage in experimental leprosy. *Lepr Rev*. 1995; 66: 201-209.356.
- ❖ Albertini R, Rindi S, Passi A, Bardoni A, Salvini R, Pallavicini G, DeLuca G. The effect of cornea proteoglycans on liposome peroxidation. *Arch. Biochem.Biophys*. 1996; 327, 207-214
- ❖ Alexander-North LS, North JA, Kiminyo KP, Buettner GR, Spector AA. Polyunsaturated fatty acids increase lipid radical formation induced by oxidant stress in endothelial cells. *J Lipid Res*. 1994;35(10):1773-85.
- ❖ Ames BN., Cathcart R., Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense against oxidant and radical. *Proc. Natl. Acad. Sci.*1981; 78, 6858-6862.
- ❖ Anker SD, Doehner W, Rauchhaus M, Sharma R, Francis D, Knosalla C, Davos CH, Ciccoira M, Shamim W, Kemp M, Segal R, Osterziel KJ, Leyva F, Hetzer R, Ponikowski P, Coats AJ. Uric acid and survival in chronic heart failure: validation and application in metabolic, functional, and hemodynamic staging. *Circulation*. 2003;107(15):1991-7.
- ❖ Arnér ESJ, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem*. 2000;267(20):6102-9.
- ❖ Arnér ESJ, Holmgren A. The thioredoxin system in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2006;16(6):420-6.
- ❖ Asensi M; Sastre J; Pallardó FV; García-Asunción J; Estrela JM; Viña J. A high performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples. *Anal. Biochem*.1994; 217: 323-328
- ❖ Asensi, M; Sastre J; Pallardó FV; Estrela JM.; Viña J. Determination of oxidized glutathione in blood by high performance liquid chromatography. *Method. Enzymol*. 1994; 251: 237-243
- ❖ Aydin T, Varol FG, Sayin NC. Third trimester maternal plasma total fibronectin levels in pregnancyinduced hypertension: results of a tertiary centre. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2006;12(1):33-9.
- ❖ Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood*. 1999;93:1464–76.
- ❖ Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 1994;12, 141-179.
- ❖ Balasubramanian B, Pogozeleski WK, Tullius TD. DNA strand breaking by the hydroxyl radical is governed by the accessible surface areas of the hydrogen atoms of the DNA backbone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95:9738-43.
- ❖ Banegas JR, Rodríguez Artalejo F, Cruz JJ, Guallar P, Rey J. Blood pressure in Spain: distribution, awareness, control, and benefits of a reduction in average pressure. *Hypertension*. 1998;32:998-1002.

-
- ❖ Banegas JR, Rodríguez-Artalejo F, Ruilope LM, Graciani A, Luque M, de la Cruz-Troca JJ, García-Robles R, Tamargo J, Rey-Calero J. Hypertension magnitude and management in the elderly population of Spain. *J Hypertens*. 2002;20:2157-64.
 - ❖ Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005;21(2):263-5.
 - ❖ Barry-Lane PA, Patterson C, van der Merwe M, Hu Z, Holland SM, Yeh ET, Runge MS. p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE_{-/-} mice. *J Clin Invest*. 2001;108:1513–22.
 - ❖ Bautista R, Manning R, Martinez F, Avila-Casado Mdel C, Soto V, Medina A, Escalante B. Angiotensin II-dependent increased expression of Na⁺-glucose cotransporter in hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;286(1):F127-33.
 - ❖ Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res*. 2004; 61: 461–470.
 - ❖ Beckman JS, Chen J, Crow JP, Ye YZ. Reactions of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite with superoxide dismutase in neurodegeneration. *Prog Brain Res*. 1994;103:371-80.
 - ❖ Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*. 1996 Nov;271(5 Pt 1):C1424-37.
 - ❖ Behar D, Czaszski G, Rabami J, Dorfman L. M., and Schwarz, H. A. The acid dissociation constant and decay kinetics of parhydroxyl radical. *J. Phys.Chem.*1979; 74, 3209-3215.
 - ❖ Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B*. 1995;57:289- 300.
 - ❖ Benjamini Y, Yekutieli D. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Ann Stat*. 2001;29:1165-1188.
 - ❖ Bernard PS, Wittwer CT. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin Chem*. 2002 Aug;48(8):1178-85.
 - ❖ Bhunia AK, Han H, Snowden A, Chatterjee S. Redox-regulated signalling by lactosylceramide in the proliferation of human aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1997;272:15642–15649.
 - ❖ Bigazzi R, Bianchi S, Baldari D, Campese VM. Microalbuminuria predicts cardiovascular events and renal insufficiency in patients with essential hypertension. *J Hypertens*. 1998;16:1325-1333.
 - ❖ Bonizzato A, Russo MP, Donini M, Dusi S. Identification of a double mutation (D160V-K161E) in the p67phox gene of a chronic granulomatous disease patient. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 231:861-3.
 - ❖ Borel P, Grolier P, Boirie Y, Simonet L, Verdier E, Rochette Y, Alexandre-Gouabau MC, Beaufrere B, Lairon D, Azais-Braesco V. Oxidative stress status and antioxidant status are apparently not related to carotenoid status in healthy subjects. *J Lab Clin Med*. 1998;132, 61- 66.
 - ❖ Boshtam M, Rafiei M, Sadeghi K, Sarraf-Zadegan N: Vitamin E can reduce blood pressure in mild hypertensives. *Int J Vitam Nutr Res*. 2002; 72: 309–314

-
- ❖ Boveris A, Oshino N, Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 1972;128, 617-630.
 - ❖ Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Rad. Biol. Med.* 1995; 18, 1033-1077.
 - ❖ Brigelius R, Muckel C, Akerboom TPM, Sies H. Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relation to glutathione disulfides. *Biochem Pharmacol.* 1983;32:2529–2534.
 - ❖ Bush PA, González NE, Griscavage JM, Ignarro LJ. Nitric oxide synthase from cerebellum catalyzes the formation of equimolar quantities of nitric oxide and citrulline from L-arginine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1992; 185, 960-966.
 - ❖ Cabelli DE, Allen D, Bielski BH, Holcman J. The interaction between Cu(I) superoxide dismutase and hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 1989 Jun 15;264(17):9967-71.
 - ❖ Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000;87(10):840-4.
 - ❖ Calle ML, Urrea V, Vellalta G, Malats N, Steen KV. Improving strategies for detecting genetic patterns of disease susceptibility in association studies. *Stat Med.* 2008;27(30):6532-46.
 - ❖ Carranza J, Chávez F, Huape S, Moreno A, Camargo A, Hipertensión esencial enfermedad subdiagnosticada, pero ¿también sobreestimada? *Rev Asoc Med Inte Mex.* 1995;2(1):37-40.
 - ❖ Casp CB, She JX, McCormack WT. Genetic association of the catalase gene (CAT) with vitiligo susceptibility. *Pigment Cell Res.* 2002;15(1):62-6.
 - ❖ Castelli WP. Lipids, risk factors and ischaemic heart disease. *Atherosclerosis.* 1996;124 Suppl:S1-9.
 - ❖ Chabrashvili T, Kitiyakara C, Blau J, Karber A, Aslam S, Welch WJ, Wilcox CS. Effects of ANG II type 1 and 2 receptors on oxidative stress, renal NADPH oxidase, and SOD expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;285(1):R117-24.
 - ❖ Chamulitrat W, Stremmel W, Kawahara T, Rokutan K, Fujii H, Wingler K, Schmidt HH, Schmidt R. A constitutive NADPH oxidase-like system containing gp91phox homologs in human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2004;122(4):1000-9.
 - ❖ Chaves FJ, Corella D, Blesa S, Mansego ML, Marín P, Portoles O, Sorlí JV, González-Albert V, Tormos MC, García-García AB, Sáez G, Redon J. Xanthine oxidoreductase polymorphisms: influence in blood pressure and oxidative stress levels. *Pharmacogenet Genomics.* 2007b ;17(8):589-96.
 - ❖ Chaves FJ, Mansego ML, Blesa S, Gonzalez-Albert V, Jiménez J, Tormos MC, Espinosa O, Giner V, Iradi A, Saez G, Redon J. Inadequate cytoplasmic antioxidant enzymes response contributes to the oxidative stress in human hypertension. *Am J Hypertens.* 2007a ;20(1):62-9.
 - ❖ Chen X, Touyz RM, Bae Park J, Schiffrin EL. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutasa in stroke-prone SHR. *Hypertension.* 2001; 38: 606–611.
 - ❖ Cheng G, Cao Z, Xu X, Meir EGV & Lambeth JD Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene.* 2001;269 131–140

-
- ❖ Cheng G, Lambeth JD. Alternative mRNA splice forms of NOXO1: differential tissue expression and regulation of Nox1 and Nox3. *Gene*. 2005;356:118-26.
 - ❖ Chistiakov DA, Savost'yanov KV, Turakulov RI, Titovich EV, Zilberman LI, Kuraeva TL, Dedov II, Nosikov VV. A new type 1 diabetes susceptibility locus containing the catalase gene (chromosome 11p13) in a Russian population. *Diabetes Metab Res Rev*. 2004;20(3):219-24.
 - ❖ Choi AM, Sylvester S, Otterbein L, Holbrook NJ. Molecular responses to hyperoxia in vivo: relationship to increased tolerance in aged rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995;13(1):74-82.
 - ❖ Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res*. 1992 ;20(7):1717-23.
 - ❖ Cojocaru IM, Cojocaru M, Muşuroi C, Botezat M, Lazăr L, Drută A. Lipid peroxidation and catalase in diabetes mellitus with and without ischemic stroke. *Rom J Intern Med*. 2004;42(2):423-9.
 - ❖ Cooper ME, Gilbert RE, Epstein M. Pathophysiology of diabetic nephropathy. *Metabolism*. 1998; 47(12, Suppl 1): 3–6.
 - ❖ Cooper ME. Interaction of metabolic and haemodynamic factors in mediating experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia*. 2001;44(11):1957-72.
 - ❖ Cross AR, Segal AW. The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1657(1):1-22.
 - ❖ Dalton TP, Shertzer HG, Puga A.. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999; 39:67-101.
 - ❖ Davies KJ. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J Biol Chem*. 1987; 262:9895-901.
 - ❖ De Keulenaer GW, Alexander RW, Ushio-Fukai M, Ishizaka N, Griending KK. Tumour necrosis factor a activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochem J*. 1998;329: 653–657.
 - ❖ Della Corte E, Stirpe F. The regulation of rat liver xanthine oxidase: Activation by proteolytic enzymes. *FEBS Lett*. 1968; 2, 83-84
 - ❖ Den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: A discussion. *Hum Mut*. 2000;15: 7-12
 - ❖ Dobrian AD, Davies MJ, Schriver SD, Lauterio TJ, Prewitt RL. Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension. *Hypertension* 37(2 Part 2) . 2001:554-560.
 - ❖ Doi K, Noiri E, Nakao A, Fujita T, Kobayashi S, Tokunaga K. Haplotype analysis of NAD(P)H oxidase p22 phox polymorphisms in end-stage renal disease. *J Hum Genet*. 2005;50(12):641-7.
 - ❖ Duffy SJ, Gokce N, Holbrook M, Hunter LM, Biegelsen ES, Huang A, Keaney JF Jr, Vita JA. Effect of ascorbic acid treatment on conduit vessel endothelial dysfunction in patients with hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; 280: H528–H534.

-
- ❖ Dvornyk V, Long JR, Xiong DH, Liu PY, Zhao LJ, Shen H, Zhang YY, Liu YJ, Rocha-Sanchez S, Xiao P, Recker RR, Deng HW. Current limitations of SNP data from the public domain for studies of complex disorders: a test for ten candidate genes for obesity and osteoporosis. *BMC Genet.* 2004;5:4.
 - ❖ Espinosa O, Jiménez-Almazán J, Chaves FJ, Tormos MC, Clapes S, Iradi A, Salvador A, Fandos M, Redón J, Sáez GT. Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG), a reliable oxidative stress marker in hypertension. *Free Radic Res.* 2007;41(5):546-54.
 - ❖ Ezzati M, Lopez AD, Rodgers A, Vander Hoorn S, Murray CJ. Comparative Risk Assessment Collaborating Group. Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *Lancet.* 2002; 360: 1347-1360.
 - ❖ Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic Biol Med.* 2003 Aug 1;35(3):236-56.
 - ❖ Fernandez-Llama P, Poch E, Oriola J, Botey A, Coll E, Darnell A, Rivera F, Revert L. Angiotensin converting enzyme I/D polymorphism in essential hypertension and nephroangiosclerosis. *Kidney Int.* 1998;53:1743-1747.
 - ❖ Forsberg L, Lyrenäs L, de Faire U, Morgenstern R. A common functional C-T substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels. *Free Radic Biol Med.* 2001;30(5):500-5.
 - ❖ Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action. *Am. J. Med.* 1994; 97(3A): 5S-13S.
 - ❖ Freimer N, Sabatti C. The use of pedigree, sibpair and association studies of common diseases for genetic mapping and epidemiology. *Nat Genet.* 2004; 36(10):1045-1051.
 - ❖ Fridovich I. Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity. *Free radicals in biology.* 1. Pryor W.A. (ed) New York, Academic Press. 1986;239-246.
 - ❖ Friedel HA, Goa KL, Benfield P. S-adenosyl- L-methionine. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in liver dysfunction and affective disorders in relation to its physiological role in cell metabolism. *Drugs.* 1989; 38, 389-416
 - ❖ Gerstein HC, Mann JF, Yi Q, Zinman B, Dinneen SF, Hoogwerf B, Halle JP, Young J, Rashkow A, Joyce C, Nawaz S, Yusuf S; HOPE Study Investigators. Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. *JAMA.* 2001;286:421-426.
 - ❖ Gongora MC, Qin Z, Laude K, Kim HW, McCann L, Folz JR, Dikalov S, Fukai T, Harrison DG. Role of extracellular superoxide dismutase in hypertension. *Hypertension.* 2006; 48: 473-481.
 - ❖ González-Pacheco FR, Caramelo C, Castilla MA, Deudero JJ, Arias J, Yagüe S, Jiménez S, Bragado R, Alvarez-Arroyo MV. Mechanism of vascular smooth muscle cells activation by hydrogen peroxide: role of phospholipase C gamma. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17(3):392-8.
 - ❖ Góth L, Eaton JW. Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes. *Lancet.* 2000;356(9244):1820-1.
 - ❖ Góth L, Vitai M, Rass P, Sükei E, Páy A. Detection of a novel familial catalase mutation (Hungarian type D) and the possible risk of inherited catalase deficiency for diabetes mellitus. *Electrophoresis.* 2005;26(9):1646-9.

- ❖ Góth L. Lipid and carbohydrate metabolism in acatalasemia. *Clin Chem*. 2000;46(4):564-6.
- ❖ Goulas A, Fidani L, Kotsis A, Mirtsou V, Petersen RC, Tangalos E, Hardy J. An association study of a functional catalase gene polymorphism. *Neurosci Lett*. 2002 Sep 20;330(2):210-3.
- ❖ Gragasin FS, Xu Y, Arenas IA, Kainth N, Davidge ST. Estrogen reduces angiotensin II-induced nitric oxide synthase and NAD(P)H oxidase expression in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(1):38-44.
- ❖ Greene EL, Paller MS. Xanthine oxidase produces O₂ in posthypoxic injury of renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 1992; 263: F251–F255.
- ❖ Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1994;74:1141–1148.
- ❖ Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase. Role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000;86:494–501.
- ❖ Grisham MB, Jour'dHeuil D, Wink DA. Nitric oxide I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol*. 1999; 276, G315-321.
- ❖ Gromer S, Urig S, Becker K. The thioredoxin system--from science to clinic. *Med Res Rev*. 2004;24(1):40-89
- ❖ Grune T, Blasig IE, Sitte N, Roloff B, Haseloff R, Davies K.J. Peroxynitrite increases the degradation of aconitase and other cellular proteins by proteasome. *J Biol Chem*. 1998; 273:10857-62.
- ❖ Guidelines Committee. 2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertens* 2003; 21: 1011-1053.
- ❖ Guo G, Yan-Sanders Y, Lyn-Cook BD, Wang T, Tamae D, Ogi J, Khaletskiy A, Li Z, Weydert C, Longmate JA, Huang TT, Spitz DR, Oberley LW, Li JJ. Manganese superoxide dismutase-mediated gene expression in radiation-induced adaptive responses. *Mol Cell Biol*. 2003;23(7):2362-78.
- ❖ Haddad JJ. Oxygen-sensing mechanisms and the regulation of redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology. *Respir Res*. 2002;3:26.
- ❖ Haendeler J, Tischler V, Hoffmann J, Zeiher AM, Dimmeler S. Low doses of reactive oxygen species protect endothelial cells from apoptosis by increasing thioredoxin-1 expression. *FEBS Lett*. 2004;577:427-33.
- ❖ Hageman JJ, Bast A, Vermeulen NP. Monitoring of oxidative free radical damage in vivo: Analytical aspects. *Chem Biol Interact*. 1992;82(3):243-93.
- ❖ Hagg D, Englund MC, Jernas M, Schmidt C, Wiklund O, Hulten LM, Ohlsson BG, Carlsson LM, Carlsson B, Svensson PA. Oxidized LDL induces a coordinated up-regulation of the glutathione and thioredoxin systems in human macrophages. *Atherosclerosis* 2006;185:282-9.
- ❖ Hahn LW, Ritchie MD, Moore JH. Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions. *Bioinformatics*. 2003;19:376-82.
- ❖ Halliwell B, Auroma OI. DNA damage by oxygen derived species. Its mechanism of action and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett*. 1991;281, 9-19

-
- ❖ Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence? *Lancet*. 1994; 344: 721-724.
 - ❖ Harrap SB. Hypertension: genes versus environment. *Lancet*. 1994; 344:169-171.
 - ❖ Harrison JM, Kiel JW, Smith S. Effect of ocular perfusion pressure on retinal function in the rabbit. *Vision Res*. 1997;37(17):2339-47.
 - ❖ Heil J, Glanowski S, Scott J, Winn-Deen E, McMullen I, Wu L, Gire C, Sprague A. An automated computer system to support ultra high throughput SNP genotyping. *Pac Symp Biocomput*. 2002:30-40.
 - ❖ Heinzelmann M, Mercer-Jones MA and Passmore JC. Neutrophils and renal failure. *Am J Kidney Dis*. 1999; 34: 384-399.
 - ❖ Heitzer T, Wenzel U, Hink U, Krollner D, Skatchkov M, Stahl RA, MacHarzina R, Bräsen JH, Meinertz T, Münzel T. Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C. *Kidney Int*. 1999;55(1):252-60.
 - ❖ Hirota K, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J. Thioredoxin superfamily and thioredoxin-inducing agents. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;957:189-99.
 - ❖ Hoagland KM, Maier KG, Roman RJ. Contributions of 20- HETE to the antihypertensive effects of Tempol in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension*. 2003; 41: 697–702.
 - ❖ Holland JA, Meyer JW, Chang MM, O'Donnell RW, Johnson DK, Ziegler LM. Thrombin stimulated reactive oxygen species production in cultured human endothelial cells. *Endothelium*. 1998;6:113–121.
 - ❖ Houston M, Estevez A, Chumley P, Aslan M, Marklund S, Parks DA, Freeman BA. Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium. Kinetic characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling. *J Biol Chem*. 1999;274:4985-4994.
 - ❖ Huang CS, Chang LS, Anderson ME, Meister A. Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem*. 1993;268(26):19675-80.
 - ❖ Ichiseki T, Matsumoto T, Nishino M, Kaneuji A, Katsuda S. Oxidative stress and vascular permeability in steroid-induced osteonecrosis model. *J Orthop Sci*. 2004;9:509e15.
 - ❖ Ichiseki T, Ueda Y, Katsuda S, Kitamura K, Kaneuji A, Matsumoto T. Oxidative stress by glutathione depletion induces osteonecrosis in rats. *Rheumatology*. 2006;45:287e90.
 - ❖ Ioannidis JP. Calibration of credibility of agnostic genome-wide associations. 2008;147B(6):964-72.
 - ❖ Jager A, Kostense PJ, Ruhe HG, Heine RJ, Nijpels G, Dekker JM, Bouter LM, Stehouwer CD. Microalbuminuria and peripheral arterial disease are independent predictors of cardiovascular and all-cause mortality, especially among hypertensive subjects: five-year follow-up of the Hoorn Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:617-624
 - ❖ Jiang F. NADPH oxidase in the kidney: a Janus in determining cell fate. *Kidney Int*. 2009;75(2):135-7.
 - ❖ Jiang Z, Akey JM, Shi J, Xiong M, Wang Y, Shen Y, Xu X, Chen H, Wu H, Xiao J, Lu D, Huang W, Jin LA polymorphism in the promoter region of catalase is associated with blood pressure levels. *Hum Genet*. 2001;109(1):95-8.

- ❖ Joint National Committee on Detection EaToHBP. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA*.2003;289(19):2560-72.
- ❖ Jurado J, Prieto-Alamo MJ, Madrid-Risquez J, Pueyo C. Absolute gene expression patterns of thioredoxin and glutaredoxin redox systems in mouse. *J Biol Chem*. 2003;278:45546-54.
- ❖ Juránek I, Bezek S. Controversy of free radical hypothesis: reactive oxygen species cause or consequence of tissue injury? *Gen Physiol Biophys*. 2005; 24: 263–278.
- ❖ Karrer EE, Lincoln JE, Hogenhout S, Bennett AB, Bostock RM, Martineau B, Lucas WJ, Gilchrist DG, Alexander D. In situ isolation of mRNA from individual plant cells: creation of cell-specific cDNA libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(9):3814-8.
- ❖ Kato K, Oguri M, Kato N, Hibino T, Yajima K, Yoshida T, Metoki N, Yoshida H, Satoh K, Watanabe S, Yokoi K, Murohara T, Yamada Y. Assessment of genetic risk factors for thoracic aortic aneurysm in hypertensive patients. *Am J Hypertens*. 2008;21(9):1023-7.
- ❖ Kawashima S, Yokoyama M. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(6):998-1005.
- ❖ Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*. 2005; 365: 217-223.
- ❖ Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Whelton PK, He J. Worldwide prevalence of hypertension: a systematic review. *J Hypertens*. 2004; 22: 11-19.
- ❖ Kedziora-Kornatowska K, Czuczejko J, Pawluk H, Kornatowski T, Motyl J, Szadujkis-Szadurski L, Szewczyk-Golec K, Kedziora J. The markers of oxidative stress and activity of the antioxidant system in the blood of elderly patients with essential arterial hypertension. *Cell Mol Biol Lett*. 2004;9(4A):635-41.
- ❖ Kenney RT, Malech HL, Epstein ND, Roberts RL, Leto TL. Characterization of the p67phox gene: genomic organization and restriction fragment length polymorphism analysis for prenatal diagnosis in chronic granulomatous disease. *Blood*. 1993;82:3739-44.
- ❖ Kerlavage A, Bonazzi V, di Tommaso M, Lawrence C, Li P, Mayberry F, Mural R, Nodell M, Yandell M, Zhang J, Thomas P. The Celera discovery system. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(1):129-36.
- ❖ Ketteler M, Noble NA, Border WA. Transforming growth factor-beta and angiotensin II: the missing link from glomerular hyperfiltration to glomerulosclerosis? *Annu Rev Physiol*. 1995; 57: 279–295.
- ❖ Kim TH, Hong JM, Oh B, Cho YS, Lee JY, Kim HL, Shin ES, Lee JE, Park EK, Kim SY. Genetic association study of polymorphisms in the catalase gene with the risk of osteonecrosis of the femoral head in the Korean population. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008;16(9):1060-6.
- ❖ Kofler DM, Büning H, Mayr C, Bund D, Baumert J, Hallek M, Wendtner CM. Haddad, Engagement of the B-cell antigen receptor (BCR) allows efficient transduction of ZAP-70-positive primary B-CLL cells by recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Gene Ther*. 2004;11(18):1416-24.

- ❖ Koga H, Terasawa H, Nunoi H, Takeshige K, Inagaki F, Sumimoto H. Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem.* 1999 27;274(35):25051-60.
- ❖ Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol.* 1992;5(6):834-42.
- ❖ Korycka-Dahi M, Richardson T. Initiation of oxidative changes in food. Symposium: oxidative changes in milk. *J. Dairy Sciences.* 1981; 63: 1181-1208.
- ❖ Krzywanski DM, Dickinson DA, Iles KE, Wigley AF, Franklin CC, Liu RM, Kavanagh TJ, Forman HJ. Variable regulation of glutamate cysteine ligase subunit proteins affects glutathione biosynthesis in response to oxidative stress. *Arch Biochem Biophys.* 2004;423:116-25.
- ❖ Kumar CA, Das UN. Oxidant stress in pre-eclampsia and essential hypertension. *J Assoc Physicians India.* 2002;50:1372-5.
- ❖ Kurland L, Lind L, Melhus H. Using genotyping to predict responses to anti-hypertensive treatment. *Trends Pharmacol Sci.* 2005;26(9):443-7.
- ❖ Kuznetsova Tlu, Gavrilov DV, Dudanov IP, Makarevich PI, Balatskiĭ AV, Samokhodskaia LM, Parfenova EV. Influence of polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene and polymorphism of NADPH oxidase gene on development of complications of arterial hypertension. *Kardiologiya.* 2008;48(3):27-33.
- ❖ Laakso JT, Teravainen TL, Martelin E, Vaskonen T, and Lapatto R. Renal xanthine oxidoreductase activity during development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2004;22(7):1333-40.
- ❖ Lacy F, Kailasam MT, O'Connor DT, Schmid-Schönbein GW, Parmer RJ. Plasma hydrogen peroxide production in human essential hypertension: role of heredity, gender, and ethnicity. *Hypertension.* 2000;36(5):878-84.
- ❖ Laffer CL, Bolterman RJ, Romero JC, Elijovich F. Effect of salt on isoprostanes in salt-sensitive essential hypertension. *Hypertension.* 2006;47(3):434-40.
- ❖ Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest.* 2003;111(8):1201-9.
- ❖ Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, Harrison DG, Hornig B, Drexler H. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation.* 2002;106:3073-3078.
- ❖ Lapouge k, Smith SJ, Walker PA, Gambin SJ, Smerdon SJ, Rittinger K. Structure of TPR domain of p67phox in complex Rac.GTP. *Mol Cell.* 2000; 6:899-907.
- ❖ Lassègue B, Griendling KK. Reactive oxygen species in hypertension; An update. *Am J Hypertens.* 2004;17(9):852-60.
- ❖ Law CM, De Sweit M, Osmond C, Fayers PM, Barrer DJP, Crudas AM, et al. Initiation of hypertension in uterus and its amplification throughout the life. *Br Med J.* 1993; 306: 24-27.

- ❖ Lerman LO, Nath KA, Rodriguez-Porcel M, Krier JD, Schwartz RS, Napoli C, Romero JC. Increased oxidative stress in experimental renovascular hypertension. *Hypertension*. 2001; 37(Pt 2): 541–6.
- ❖ Leusen JH, de Klein A, Hilarius PM, Ahlin A, Palmblom J, Edvard Smith, CI, Diekmann D, Hall A, Verhoeven AJ, Roos D. Disturbed interaction of p21-rac with mutated p67-phox causes chronic granulomatous disease. *J Exp Med*. 1996;184:1243-9.
- ❖ Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R, for the Prospective Studies Collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*. 2002;360:1903–1913.
- ❖ Li JM, Shah AM. Mechanism of endothelial cell NADPH oxidase activation by angiotensin II. Role of the p47phox subunit. *J Biol Chem*. 2003;278(14):12094-100.
- ❖ Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. Oxidized lowdensity lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 1995;270:319-324.
- ❖ Liga española para la lucha contra la hipertensión arterial. Sociedad española de hipertensión: Control de la Hipertensión arterial en España. *Rev Esp Salud Pública*. 1996, 70:139-210.
- ❖ Liochev SI, Fridovich I. The role of O₂⁻ in the production of HO₂·: In vitro and in vivo. *Free Rad. Biol. Med*. 1994;16, 29-33.
- ❖ Lippman RD. Rapid in vivo quantification and comparison of hydroperoxides and oxidized collagen in aging mice, rabbits and man. *Exp. Gerontol*. 1985;20: 1-5.
- ❖ Lipton SA, Chol YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HSV, Loscalzo J, Singel DL, Stamler S. A redoxbased mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*. 1993;364, 626-632.
- ❖ Ljungman S: Microalbuminuria in essential hypertension. *Am.J.Hypertens*. 1990, 3:956-960.
- ❖ Long DA, Price KL, Herrera-Acosta J, Johnson RJ. How does angiotensin II cause renal injury? *Hypertension*. 2004; 43: 722–723.
- ❖ Lu JL, Schmiege LM, 3rd Kuo L, Liao JC. Downregulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase expression by lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 225:1-5.
- ❖ Lunec J, Herbert KE, Jones GDD, Dickinson L, Evans M, Mistry N, Mistry P, Chauhan D, Capper G, Zheng Q. Development of a quality control material for the measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, an in vivo marker of oxidative stress, and comparison of results from different laboratories. *Free Radic Res*. 2000; 33 Suppl:S27-31.
- ❖ Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, Grassi G, Heagerty AM, Kjeldsen SE, Laurent S, Narkiewicz K, Ruilope L, Rynkiewicz A, Schmieder RE, Boudier HA, Zanchetti A; ESH-ESC Task Force on the Management of Arterial Hypertension. 2007 ESH-ESC Practice Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: ESH-ESC Task Force on the Management of Arterial Hypertension. *J Hypertens*. 2007;25(9):1751-62.

-
- ❖ Mansego ML, Martínez F, González-Albert V, Martín-Escudero JC, Redon J, Chaves FJ. The implication of oxidative stress genes polymorphisms with waist perimeter and abdominal obesity risk. 2009. *Sometido*
 - ❖ Marsh S, Kwok P, McLeod HL. SNP databases and pharmacogenetics: great start, but a long way to go. *Hum Mutat.* 2002;20(3):174-9.
 - ❖ Marth G, Yeh R, Minton M, Donaldson R, Li Q, Duan S, Davenport R, Miller RD, Kwok PY. Single-nucleotide polymorphisms in the public domain: how useful are they?. *Nat Genet.* 2001;27(4):371-2.
 - ❖ Martín-Escudero JC, Simal-Blanco F, Carretero JL, Bellido J, Arzúa D, Mena-Martínez FJ, Tabuyo M, Alvarez-Hurtado A, Gonzalez-Melgosa I, Alonso B, Noriega A, Dueñas A, Tasende J, Mayo A, Castrodeza JJ, Herreros V. Prevalencia, grado de detección, tratamiento y control de la hipertensión arteriales población general. *Estudio Hortega. Hipertensión.* 2003; 20(04):148-154.
 - ❖ Martyn CN, Greewald SE. Impaired synthesis of elastin in walls of aorta and large conduit arteries during early development as an initiating event in pathogenesis of systemic hypertension. *Lancet.* 1997; 350: 935-955.
 - ❖ Marumo T, Schini-Kerth VB, Fisslthaler B, Busse R. Platelet-derived growth factor-stimulated superoxide anion production modulates activation of transcription factor NF- κ B and expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human aortic smooth muscle cells. *Circulation.* 1997;96:2361–2367.
 - ❖ McCord JM, Roy RS. The pathophysiology of superoxide: roles in inflammation and ischemia. *Can J Physiol Pharmacol.* 1982;60, 1346-1352
 - ❖ McQuillan LP, Leung GK, Marsden PA, Kostyk SK, and Kourembanas S. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1994;267:1921-1927.
 - ❖ Meister A, Tate SS. Glutathione and related γ -glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Ann Rev Biochem.* 1976;45:559.
 - ❖ Mena-Martin FJ, Martín-Escudero JC, Simal-Blanco F, Carretero-Ares JL, Arzua-Mouronte D, Herreros-Fernandez V. Health-related quality of life of subjects with known and unknown hypertension: results from the population-based Hortega study. *J Hypertens.* 2003;21(7):1283-9.
 - ❖ Mercurio F, Manning AM. NF- κ B as a primary regulator of the stress response. *Oncogene.* 1999; 18(45):6163-71.
 - ❖ Minc E, de Coppet P, Masson P, Thiery L, Dutertre S, Amor-Guélet M, Jaulin C. The human copper-zinc superoxide dismutase gene (SOD1) proximal promoter is regulated by Sp1, Egr-1, and WT1 via non-canonical binding sites. *J Biol Chem.* 1999; 274(1):503-9.
 - ❖ Miranda-Vizueté A, Damdimopoulos AE, Pedrajas JR, Gustafsson JA, Spyrou G. Human mitochondrial thioredoxin reductase cDNA cloning, expression and genomic organization. *Eur J Biochem.* 1999;261(2):405-12.
 - ❖ Miyajima K, Minatoguchi S, Ito Y, Hukunishi M, Matsuno Y, Kakami M, Kawasaki M, Nishigaki K, Takemura G, Fujiwara H. Reduction of QTc dispersion by the angiotensin II receptor blocker valsartan may be related to its anti-oxidative stress effect in patients with essential hypertension. *Hypertens Res.* 2007; 30: 307–313.

- ❖ Modlinger PS, Wilcox CS, Aslam S. Nitric oxide, oxidative stress, and progression of chronic renal failure. *Semin Nephrol.* 2004;24:354-65.
- ❖ Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 1991;43, 109-142.
- ❖ Morel Y, Barouki R. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J.* 1999; 342:481-496.
- ❖ Moreno MU, San José G, Fortuño A, Beloqui O, Redón J, Chaves FJ, Corella D, Díez J, Zalba G. A novel CYBA variant, the -675A/T polymorphism, is associated with essential hypertension. *J Hypertens.* 2007;25(8):1620-6.
- ❖ Morris CR, Suh JH, Hagar W, Larkin S, Bland DA, Steinberg MH, Vichinsky EP, Shigenaga M, Ames B, Kuypers FA, Klings ES. Erythrocyte glutamine depletion, altered redox environment, and pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood.* 2008;111(1):402-10.
- ❖ Muniz J, Juane R. Arterial hypertension in Spain. *Rev.Esp.Cardiol.* 1995, 48 Suppl 4:3-8.
- ❖ Muñoz P, Valls V, Perez-Broseta C, Iradi A, Climent JV, Oliva MR, Sáez GT. The role of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rifamycin-induced DNA damage. *Free Radic BiolMed* 1995;18(4): 747-55.
- ❖ Myhrstad MC, Husberg C, Murphy P, Nordström O, Blomhoff R, Moskaug JO, Kolstø AB. TCF11/Nrf1 overexpression increases the intracellular glutathione level and can transactivate the gamma-glutamylcysteine synthetase (GCS) heavy subunit promoter. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1517(2):212-9.
- ❖ Naganuma T, Nakayama T, Sato N, Fu Z, Soma M, Aoi N, Usami R. A haplotype-based case-control study examining human extracellular superoxide dismutase gene and essential hypertension. *Hypertens Res.* 2008;31(8):1533-40.
- ❖ Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J. Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:351-69.
- ❖ National Statistics Institute. <http://www.ine.es/inebase/cgi/axi>. [Accessed 26 October 2005]
- ❖ Newaz MA, Adeb NN, Muslim N, Razak TA, Htut NN. Uric acid, xanthine oxidase and other risk factors of hypertension and in normotensive subjects. *Clin Exp Hypertens.* 1996;18:1035-1050.
- ❖ Newman DJ, Thakkar H and Gallagher H. Progressive renal disease: Does the quality of the proteinuria matter or only the quantity? *Clin Chim Acta.* 2000; 297: 43-54.
- ❖ Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, Murphy TJ. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest.* 1992;90:2092-2096.
- ❖ Nordberg J, Arnér ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 2001;31(11):1287-312.
- ❖ Nosadini R, Semplicini A, Fioretto P, Lusiani L, Trevisan R, Donadon V, Zanette G, Nicolosi GL, Dall'Aglio V, Zanuttini D. Sodium-lithium countertransport and cardiorenal abnormalities in essential hypertension. *Hypertension.* 1991, 18:191-198.

-
- ❖ Ombra MN, Forabosco P, Casula S, Angius A, Maestrale G, Petretto E, Casu G, Colussi G, Usai E, Melis P, Pirastu M. Ombra MN, Forabosco P, Casula S, et al: Identification of a new candidate locus for uric acid nephrolithiasis. *Am J Hum Genet.* 2001; 68: 1119–1129.
 - ❖ Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la salud. Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas. Normas éticas internacionales para las investigaciones biomédicas con sujetos humanos. Estados unidos: OPS. Organización panamericana de la Salud; 1996. p.59 (Publicación Científica Pc N° 563).
 - ❖ Ortiz GG, Crespo-López ME, Morán-Moguel C, García JJ, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. Protective role of melatonin against MPTP-induced mouse brain cell DNA fragmentation and apoptosis in vivo. *Neuro Endocrinol Lett.* 2001;22(2):101-8.
 - ❖ Packer CS. Biochemical markers and physiological parameters as indices for identifying patients at risk of developing pre-eclampsia. *J Hypertens.* 2005;23(1):45-6.
 - ❖ Park HH, Ha E, Uhm YK, Jin SY, Kim YJ, Chung JH, Lee MH. Association study between catalase gene polymorphisms and the susceptibility to vitiligo in Korean population. *Exp Dermatol.* 2006;15(5):377-80.
 - ❖ Park JB, Charbonneau F, Schiffrin EL. Correlation of endothelial function in large and small arteries in human essential hypertension. *J Hypertens.* 2001;19:415-20.
 - ❖ Parks DA, Granger DN. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1986;548, 87-99
 - ❖ Perianayagam MC, Liangos O, Kolyada AY, Wald R, MacKinnon RW, Li L, Rao M, Balakrishnan VS, Bonventre JV, Pereira BJ, Jaber BL. NADPH oxidase p22phox and catalase gene variants are associated with biomarkers of oxidative stress and adverse outcomes in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2007(1):255-63.
 - ❖ Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, Lambert D, Michiels C, Raes M, Zachary M.D, Remacle J. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev.* 1990; 51:283-97.
 - ❖ Pigeolet E, Remacle J. Susceptibility of glutathione peroxidase to proteolysis after oxidative alteration by peroxides and hydroxyl radicals. *Free Radic. Biol. Med.* 1991; 11:191-5.
 - ❖ Pontremoli R, Sofia A, Tirotta A, Ravera M, Nicoletta C, Viazzi F, Bezante GP, Borgia L, Babola N, Ravazzolo R, Sacchi G, Deferrari G. The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with target organ damage in essential hypertension. *J Am Soc Nephrol.* 1996;7:2550-2558.
 - ❖ Poole LB, Reynolds CM, Wood ZA, Karplus PA, Ellis HR, Calzi ML. NADH:peroxiredoxin oxidoreductases, homologues of low Mr thioredoxin reductase. *Eur J Biochem.* 2000; 267: 6126-6133.
 - ❖ Prior M, Arosio E, Ferrari M, Lucchese L, Guidi GC, Bosello O. Lipoprotein(a) and general risk factors in patients with angiographically assessed peripheral arterial disease. *Int Angiol.* 1995;14(4):357-63.
 - ❖ Province MA. Sequential methods of analysis for genome scans. *Adv Genet.* 2001;42:499-514.

-
- ❖ Qamirani E, Ren Y, Kuo L, Hein TW. C-reactive protein inhibits endothelium-dependent NO-mediated dilation in coronary arterioles by activating p38 kinase and NAD(P)H oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(5):995-1001.
 - ❖ Raji L. Nitric oxide, salt sensitivity, and cardiorenal injury in hypertension. *Semin Nephrol.* 1999;19:296-303.
 - ❖ Rajmakers, M. T., Roes, E. M., Steegers, E. A. and Peters, W. H. The C242T-polymorphism of the NADPH/NADH oxidase gene p22phox subunit is not associated with pre-eclampsia. *J Hum Hypertens.* 2002 Jun;16(6):423-5.
 - ❖ Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest.* 1996;97:1916–23.
 - ❖ Rastaldi MP, Ferrario F, Crippa A, Dell'Antonio G, Casartelli D, Grillo C, D'Amico G. Glomerular monocyte-macrophage features in antineutrophil cytoplasmic antibody-positive renal vasculitis and cryoglobulinemic nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2000; 11: 2036-2043.
 - ❖ Ravn-Haren G, Olsen A, Tjønneland A, Dragsted LO, Nexø BA, Wallin H, Overvad K, Raaschou-Nielsen O, Vogel U. Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. *Carcinogenesis.* 2006; 27(4):820-5..
 - ❖ Reckelhoff JF, Romero JC. Role of oxidative stress in angiotensin-induced hypertension. *Am J Physiol Integr Comp Physiol.* 2003;284;R893-12.
 - ❖ Redón J, Oliva MR, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A, Sáez GT. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension.* 2003;41(5):1096-101.
 - ❖ Reich DE, Gabriel SB, Altshuler D. Quality and completeness of SNP databases. *Nat Genet.* 2003;33(4):457-8.
 - ❖ Remuzzi G, Ruggenenti P, Benigni A. Understanding the nature of renal disease progression. *Kidney Int.* 1997; 51: 2-15.
 - ❖ Rixen NP, Rongen GA, Blom HJ, Russel FG, Boers GH, Smits P. Potential role for adenosine in the pathogenesis of the vascular complications of hyperhomocysteinemia. *Cardiovasc Res.* 2003 ;59(2):271-6.
 - ❖ Ristoff E, Larsson A. Patients with genetic defect in the gamma-glutamyl cycle. *Chem Biol Interact.* 1998;111-112:113
 - ❖ Ritchie MD, Hahn LW, Roodi N, Bailey LR, Dupont WD, Parl FF, Moore JH. Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer. *Am.J.Hum.Genet.* 2001;69:138-147.
 - ❖ Rodrigo R, Passalacqua W, Araya J, Orellana M, Rivera G. Implications of oxidative stress and homocysteine in the pathophysiology of essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003; 42: 453–461.
 - ❖ Roest M, Banga JD, Janssen WM, Grobbee DE, Sixma JJ, de Jong PE, de Zeeuw D, van Der Schouw YT. Excessive urinary albumin levels are associated with future cardiovascular mortality in postmenopausal women. *Circulation.* 2001;103:3057-3061.

-
- ❖ Röhrdanz E, Kahl R. Alterations of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med.* 1998;24(1):27-38.
 - ❖ Romero FJ, Cadenas E. Hydroperoxide metabolism in vitamin E-deficient hepatocytes. Studies on low-level chemiluminescence, lipid peroxidation, and glutathione status. *Pharmacol Ther.* 1987; 33, 179-186.
 - ❖ Romero JC, Reckelhoff JF. State-of-the-Art lecture. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension.* 1999;34(4 Pt 2):943-9.
 - ❖ Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 2000;132:365-86.
 - ❖ Rundlöf AK, Arnér ESJ. Regulation of the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase 1 in relation to cellular phenotype, growth, and signaling events. *Antioxid Redox Signal.* 2004;6(1):41-52.
 - ❖ Sabatti C. Avoiding false discoveries in association studies. *Methods Mol Biol.* 2007;376:195-211.
 - ❖ Sáez G, Tormos C, Giner V, Chaves J, Lozano JV, Iradi A, Redón J. Factors related to the impact of antihypertensive treatment in antioxidant activities and oxidative stress by-products in human hypertension. *Am J Hypertens.* 2004;17(9):809-16.
 - ❖ Sáez G. *Biopatología de los radicales libres.* Madrid, Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia. 2005.
 - ❖ Saksela M, Raivio KO. Cloning and expression in vitro of human xanthine dehydrogenase/oxidase. *Biochem J* 1996; 315 (Pt 1), 235-239
 - ❖ Salo DC, Pacifici RE, Lin SW, Giulivi C, Davies KJ. Superoxide dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation. *J Biol Chem.* 1990; 265:11919-11927.
 - ❖ San José G, Fortuño A, Beloqui O, Díez J, Zalba G. NADPH oxidase CYBA polymorphisms, oxidative stress and cardiovascular diseases. *Clin Sci (Lond).* 2008;114(3):173-82.
 - ❖ Schiffrin EL, Park JB, Intengan HD, Touyz RM. Correlation. Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation.* 2000; 101(14):1653-9.
 - ❖ Schnabel R, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, Torzewski M, Lubos E, Bickel C, Cambien F, Tired L, Münzel T, Blankenberg S. Glutathione peroxidase-1 and homocysteine for cardiovascular risk prediction: results from the AtheroGene study. *J Am Coll Cardiol.* 2005;17;45(10):1631-7
 - ❖ Schnwchenberg ChG. Oxigen radicals in cardiovascular-renal disease. *Current opinion in Pharmacology.* 2002; 2: 121-125.
 - ❖ Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun.* 1992; 17, 221-237.
 - ❖ Schulze-Osthoff K, Los M, Baeuerle PA. Redox signalling by transcription factors NF-kappa B and AP-1 in lymphocytes. *Biochem Pharmacol.* 1995;50(6):735-41.
 - ❖ Segre D, Deluna A, Church GM, Kishony R. Modular epistasis in yeast metabolism. *Nat Genet.* 2005;37: 77-83.

- ❖ Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *Faseb J.* 1996;10:709-720.
- ❖ Sharma P, Hingorani A, Jia H, Hopper R, Brown MJ: Quantitative association between a newly identified molecular variant in the endothelin-2 gene and human essential hypertension. *J Hypertens.* 1999; 9: 1281–1287.
- ❖ Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(1):308-11.
- ❖ Shibutani S, Takeshita M, and Grollman A. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature.* 1992;349, 431-434.
- ❖ Shih SC, Ju M, Liu N, Smith LE. Selective stimulation of VEGFR-1 prevents oxygen-induced retinal vascular degeneration in retinopathy of prematurity. *J Clin Invest.* 2003;112(1):50-7.
- ❖ Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chem.* 1986;25, 1058-1071.
- ❖ Simic DV, Mimic-Oka J, Pljesa-Ercegovac M, Savic-Radojevic A, Opacic M, Matic D, Ivanovic B, Simic T. Byproducts of oxidative protein damage and antioxidant enzyme activities in plasma of patients with different degrees of essential hypertension. *J Hum Hypertens.* 2006;20(2):149-55.
- ❖ Sirotkin, dbSNP: the NCBI database of genetic variation, *Nucl. Acids Res.* 2001; 29: 308–311.
- ❖ Sociedad Española para el Estudio de la obesidad (SEEDO). Consenso español 1995 para la evaluación de la obesidad y para la realización de estudios epidemiológicos. *Med Clin.* 1996;107: 782-787.
- ❖ Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics.* 2006;22:1928-9.
- ❖ Sowers JR, Epstein M, Frohlich ED. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: An update. *Hypertension.* 2001;37(4):1053-9.
- ❖ Sowers JR: Recommendations for special populations: Diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *Am J Hypertens.* 2003. 16: 41S–45S.
- ❖ Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Free Radic Res.* 2006;40(12):1250-8.
- ❖ Staessen JA, Wang JG, Thijs L. Cardiovascular prevention and blood pressure reduction: a quantitative overview updated until 1 March 2003. *J Hypertens.* 2003;21:1055–1076.
- ❖ Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med.* 1989;320(14):915-24.
- ❖ Strålin P, Karlsson K, Johansson BO, Marklund SL: The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15: 2032–2036.
- ❖ Su D, Novoselov SV, Sun QA, Moustafa ME, Zhou Y, Oko R, Hatfield DL, Gladyshev VN. Mammalian selenoprotein thioredoxin-glutathione reductase. Roles in disulfide bond formation and sperm maturation. *J Biol Chem.* 2005;280(28):26491-8.
- ❖ Takakura Y, Yoshida T, Yoshioka K, Umekawa T, Kogure A, Toda H, Kagawa K, Fukui S, Yoshikawa T. Angiotensinogen gene polymorphism (Met235Thr) influences visceral obesity and insulin resistance in obese Japanese women. *Metabolism.* 2006;55(6):819-24.

-
- ❖ Tamai M, Furuta H, Kawashima H, et al: Extracellular superoxide dismutase gene polymorphism is associated with insulin resistance and the susceptibility to type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2006; 71: 140–145.
 - ❖ Terao M, Kurosaki M, Zanotta S, Garattini E. The xanthine oxidoreductase gene: structure and regulation. *Biochem Soc Trans.* 1997;25:791-796.
 - ❖ The GISEN Group. Randomised placebo-controlled trial of effect of ramipril on decline in glomerular filtration rate and risk of terminal renal failure in proteinuric, non-diabetic nephropathy. The GISEN Group (Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia). *Lancet.* 1997, 349:1857-1863.
 - ❖ The International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature.* 2003;426(6968):789-96.
 - ❖ Touyz R. Estrés oxidativo en la hipertensión arterial *Boletín del Consejo Argentino de HTA.* 2005;6:22-9.
 - ❖ Touyz RM, Wu XH, He G, Salomon S, Schiffrin EL. Increased angiotensin II-mediated Src signaling via epidermal growth factor receptor transactivation is associated with decreased C-terminal Src kinase activity in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2002;39(2 Pt 2):479-85.
 - ❖ Touyz RM, Yao G, Quinn MT, Pagano PJ, Schiffrin EL. p47phox associates with the cytoskeleton through cortactin in human vascular smooth muscle cells: role in NAD(P)H oxidase regulation by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(3):512-8.
 - ❖ Trolliet MR, Rudd MA, Loscalzo J. Oxidative stress and renal dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Kidney Blood Press Res.* 2001; 24: 116–23.
 - ❖ Turanov AA, Su D, Gladyshev VN. Characterization of Alternative Cytosolic Forms and Cellular Targets of Mouse Mitochondrial Thioredoxin Reductase. *J Biol Chem.* 2006; 281(32):22953-63.
 - ❖ Uddin M, Yang H, Shi M, Polley-Mandal M, Guo Z. Elevation of oxidative stress in the aorta of genetically hypertensive mice. *Mech Ageing Dev.* 2003;124(7):811-7.
 - ❖ Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology.* 2002;3:34.1-34.11.
 - ❖ Vaziri ND, Dicus M, Ho ND, Boroujerdi-Rad L, Sindhu RK. Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Int.* 2003; 63:179-85.
 - ❖ Vink H, Duling BR. Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes, and leukocytes within mammalian capillaries. *Circ Res.* 1996;79:581–589.
 - ❖ Viridis A, Neves MF, Amiri F, Touyz RM, Schiffrin EL. Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. *J Hypertens.* 2004;22(3):535-42.
 - ❖ Wacholder S, Chanock S, Garcia-Closas M, El Ghormli L, Rothman N. Assessing the probability that a positive report is false: an approach for molecular epidemiology studies. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96(6):434-442.
 - ❖ Wacholder S, Chanock S, Garcia-Closas M, El Ghormli L, Rothman N. Assessing the probability that a positive report is false: an approach for molecular epidemiology studies. <http://jnci.oxfordjournals.org/>

cgi/content/full/96/6/434/DC1?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=1&author1=wacholder&andorexacttitle=and&andorexacttitleabs=and&andorexactfulltext=and&searchid=1&FIRSTINDEX=0&sortspec=relevance&resourcetype =HWCIT. Accessed October 25, 2008.

- ❖ Wang Y, Wang L, Ai X, Zhao J, Hao X, Lu Y, Qiao Z. Nicotine could augment adhesion molecule expression in human endothelial cells through macrophages secreting TNF-alpha, IL-1beta. *Int Immunopharmacol.* 2004;4(13):1675-86.
- ❖ Ward R. Familiar aggregation and genetic epidemiology of blood pressure. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management.* New York, NY: Raven Press. 1990: 81-100.
- ❖ Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension.* 2004;44(4):381-6.
- ❖ Wedgwood S, Black SM. Role of reactive oxygen species in vascular remodeling associated with pulmonary hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 2003;5(6):759-69.
- ❖ Welch WJ, Blau J, Xie H, Chabrashvili T, Wilcox CS: Angiotensin-induced defects in renal oxygenation: role of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288: H22–H28.
- ❖ Welch WJ, Chabrashvili T, Solis G, Chen Y, Gill PS, Aslam S, Wang X, Ji H, Sandberg K, Jose P, Wilcox CS. Role of extracellular superoxide dismutase in the mouse angiotensin slow pressor response. *Hypertension.* 2006; 48: 934–941.
- ❖ Wenzel UO, Wolf G, Thaiss F, Helmchen U, Stahl RA. Renovascular hypertension does not influence repair of glomerular lesions induced by anti-thymocyte glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2000; 58: 1135-1147.
- ❖ Wilcox CS. Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney: a critical link to hypertension? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;289:R913-35.
- ❖ Wild AC, Mulcahy RT. Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression: insights into transcriptional control of antioxidant defenses. *Free Radic Res.* 2000;32:281-301.
- ❖ Williams JD and Coles GA. Proteinuria. a direct cause of renal morbidity? *Kidney Int.* 1994; 45: 443-450.
- ❖ Wong, S.H.; Knight, J.A.; Hopfer S.M.; Zaharia, O.; Leach, Ch.N. Jr.; Sunderman, W. Jr. Lipoperoxides in Plasma as Measured by Liquid –Chromatographic Separation of Malondialdehyde – Thiobarbituric Acid Adduct. *Clin.Chem.*1987; 33: 214-220
- ❖ Wu L, Jourlink BH. Increased methylglyoxal and oxidative stress in hypertensive rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 2002; 39:809-814.
- ❖ Yamada Y, Ando F, Shimokata H. Association of gene polymorphisms with blood pressure and the prevalence of hypertension in community-dwelling Japanese individuals. *Int J Mol Med.* 2007;19(4):675-83.
- ❖ Yang H, Wang J, Huang ZZ, Ou X, Lu SC. Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the rat glutamate-cysteine ligase catalytic subunit. *Biochem J.* 2001;357:447-55.
- ❖ Yildirim A, Altinkaynak K, Aksoy H, Sahin YN, Akcay F. Plasma xanthine oxidase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities and uric acid levels in severe and mild pre-eclampsia. *Cell Biochem Funct.* 2004; 22:213-317.

-
- ❖ Yudkin JS, Andres C, Mohamed AV, Gould M, Panahloo A, Haines AP, Humphries S, Talmud P. The angiotensin-converting enzyme gene and the angiotensin II type I receptor gene as a candidate genes for microalbuminuria. A study in non-diabetic and non-insulin dependent diabetic subjects. *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2188-2191.
 - ❖ Yudkin JS, Forrest RD, Jackson CA. Microalbuminuria as a predictor of vascular disease in non-diabetic subjects. Islington diabetes survey. *Lancet* 1988;2:530-533.
 - ❖ Zalba G, Jose GS, Moreno MU, Fortuno MA, Fortuno A, Beaumont FJ, Díez J. Oxidative stress in arterial hypertension: Role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension.* 2001;38:1395-9.
 - ❖ Zalba G, San José G, Moreno MU, Fortuño A, Díez J. NADPH oxidase-mediated oxidative stress: genetic studies of the p22(phox) gene in hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7(9-10):1327-36.
 - ❖ Zanzinger J. Mechanisms of action of nitric oxide in the brain stem: role of oxidative stress. *Auton Neurosci.* 2002;98:24-7.
 - ❖ Zelko IN, Mariani ThJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: A comparison for the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution and expression. *Free Radic Biol Med.* 2002;33(3):337-49.
 - ❖ Zhang K, Calabrese P, Nordborg M, Sun F: Haplotype block structure and its applications to association studies: power and study designs. *Am J Hum Genet.* 2002; 71: 1386– 1394.
 - ❖ Zheng Z, Lee JE, Yenari MA. Stroke: molecular mechanisms and potential targets for treatment. *Curr Mol Med.* 2003;3(4):361-72.
 - ❖ Zhong L, Holmgren A. Mammalian thioredoxin reductases as hydroperoxide reductases. *Methods Enzymol.* 2002;347:236-43.
 - ❖ Zhou L, Xiang W, Potts J, Floyd M, Sharan C, Yang H, Ross J, Nyanda AM, Guo Z. Reduction in extracellular superoxide dismutase activity in African-American patients with hypertension. *Free Radic Biol Med.* 2006;41(9):1384-91.
 - ❖ Zhou XF, Cui J, DeStefano AL, Chazaro I, Farrer LA, Manolis AJ, Gavras H, Baldwin CT. Polymorphisms in the promoter region of catalase gene and essential hypertension. *Dis Markers.* 2005;21(1):3-7.

Anexo

I. Anexo 1. Características de los Polimorfismos Seleccionados en el Estudio.

Locus	HUGO	SNP_Name	Chr_position	Reference_sequence	HWpval	%Geno	MAF	Alleles
2p23.1	XDH	rs6752058	31410773	C.*1555G>T	0.601	98.3	0.268	[C/A]
		rs6710015	31410851	C.*1477A>G	0.794	97.5	0.358	[T/C]
		rs1042039	31411810	C.*518A>G	0.723	98	0.423	[T/C]
		rs45564939	31414078	c.3886C>T(p.R1296W)	0.509	99.4	0.014	[C/T]
		rs207454	31421136	C.3352-30A>C	0.513	97.9	0.097	[A/C]
		rs1366813	31423880	c.3276-12G>A	0.636	93.8	0.262	[G/A]
		rs13415401	31424745	c.3052-12G>C	0.678	93.5	0.26	[G/C]
		rs1884725	31425290	c.3030T>C (p.F1010F)	0.899	96.7	0.26	[C/T]
		rs1429374	31425902	C.2969+154C>T	0.571	97.7	0.353	[G/A]
		rs2365842	31441792	c.2544-35T>A	0.815	99.3	0.301	[A/T]
		rs17011353	31441941	c.2457-27G>A	0.287	97.9	0.036	[C/T]
		rs761926	31444289	C.2197+68G>A	0.488	97.3	0.264	[C/G]
		rs17011368	31444421	c.2107A>G (p.I703V)	0.431	99.1	0.058	[T/C]
		rs17323225	31446769	c.1936A>C (p.I646V)	0.005	94.6	0.058	[T/C]
		rs17395224	31450235	c.1686-8C>T	0.282	97.5	0.055	[C/T]
		rs10187719	31453650	c.1243-43 A>G	0.142	97	0.298	[G/A]
		rs2073316	31464533	c.564+64 C>T	0.994	96.5	0.444	[G/A]
		rs10175754	31475102	c.307-33 A>G	0.060	97.3	0.171	[T/C]
		rs1346644	31479549	C.100+68 C>G	0.159	95.5	0.174	[C/G]
		rs206801	31482250	C.100+27 C>G	0.919	97.3	0.055	[C/T]
rs206812	31491373	c.-337 A>G	0.442	98.8	0.5	[A/G]		
16q24	CYBA	rs7195830	87237223	c.*49G>A	0.103	97.2	0.342	[G/A]
		rs1049255	87237318	c.612A>T	0.431	99.2	0.210	[A/T]
		rs4673	87240779	c.214C>T (p.H72Y)	0.310	98.2	0.412	[C/T]
Xp21.1	CYBB	rs9932581	87245863	c.-930A>G	0.406	97.2	0.342	[A/G]
		rs5964125	37543395	c.804+118A>G	0.005	94.8	0.174	[A/G]
		rs5964151	37555673	c.*861T>G	0.004	97.5	0.182	[T/G]
7q11.23	NCF1	rs1637418	73837546	c.765A>G(p.V255V)	1	97.4	0	[A/A]
1q25	NCF2	rs2296164	181801558	c.925-21C>T	0.454	98.1	0.451	[C/T]
		rs2274064	181809010	c.542T>C (p.K181R)	0.848	99.1	0.449	[T/C]
22q13.1	NCF4	rs4820258	35585799	c.-1361T>C	0.406	97.1	0.198	[T/C]
		rs10854695	35590069	c.69G>A (p.S23S)	1	97.1	0.011	[G/A]
		rs2072712	35601748	c.735C>T (p.Y245Y)	0.662	99.5	0.094	[C/T]
		rs2075939	35601828	c.815C>T (p.L272P)	0.594	97.2	0.163	[C/T]
7p22	RAC1	rs35887529	6380436	c.-456T>C	0.126	96.7	0.119	[T/C]
		rs702483	6393466	c.107+27G>A	0.004	93.7	0.321	[G/A]
		rs3729796	6408195	c.448+12T>C	0.411	98.2	0.013	[T/C]
		rs9374	6408896	c.*294G>A	0.376	98.8	0.188	[G/A]
22q13.1	RAC2	rs4720672	6410364	c.*1762T>C	0.052	98.2	0.154	[T/C]
		rs9798725	35951215	c.*1444C>A	1	97.5	0.277	[C/A]
		rs6572	35951391	c.*1268C>G	0.333	95.1	0.467	[C/G]
		rs3179967	35952761	c.477T>C (p.A159A)	0.427	97.1	0.184	[T/C]
21q22.11	SOD1	rs9610684	35958939	c.108-35T>G	0.022	96.9	0.145	[T/G]
		rs2239774	35967599	c.84G>C(p.A27A)	0.342	97.1	0.165	[G/C]
		rs5995407	35971386	c.-1222T>C	0.000	99.3	0.122	[T/C]
		rs202445	31947538	c.-6416A>G	0.505	97.7	0.179	[A/G]
6q25.3	SOD2	rs17881274	31953051	c.-903C>T	0.436	99.2	0.041	[C/T]
		rs4998557	31956763	c.73-1211G>A	0.585	98.5	0.093	[G/A]
		rs2070424	31961191	c.240-251A>G	0.326	96.9	0.056	[A/G]
		rs2842980	160020106	c.*3409T>A	0.267	97.1	0.213	[A/T]
4p15.3	SOD3	rs2855116	160026115	c.344-60T>G	0.133	99.5	0.432	[T/G]
		rs4880	160033862	c.47T>C(p.A16V)	0.169	95.3	0.46	[T/C]
		rs2284659	24403895	c.-6347T>G	0.767	98.5	0.378	[G/T]
-p15.1		rs2536512	24410413	c.172G>A (p.A58T)	0.630	99.3	0.374	[A/G]
		rs8192290	24411510	c.*546T>C	0.006	96.7	0.055	[T/C]

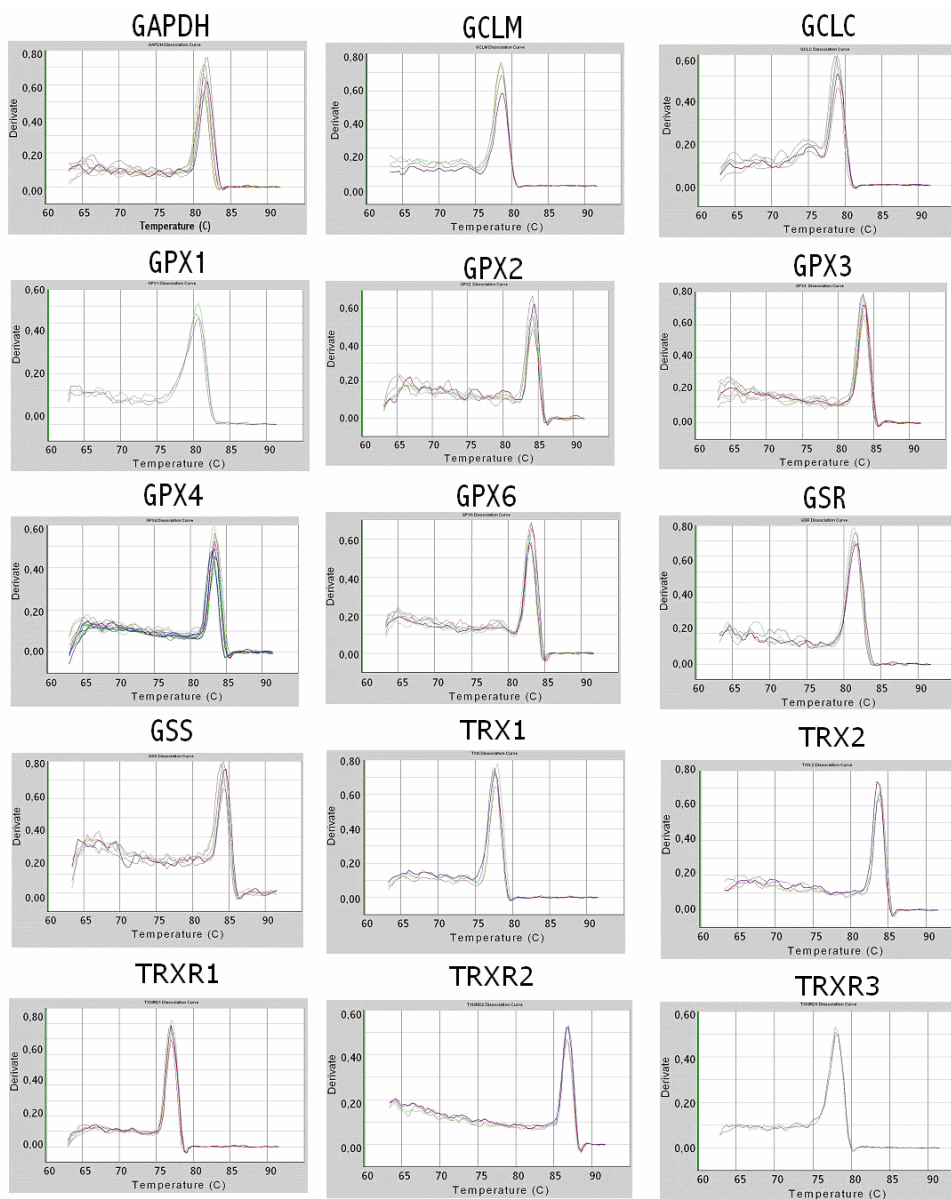
Continúa

Locus	HUGO	SNP_Name	Chr_position	Reference_sequence	HWpval	%Geno	MAF	Alleles
11p13	CAT	rs1049982	34417117	c.-20C>T	0.285	98.8	0.36	[C/T]
		rs769218	34427255	c.67-60G>A	0.011	99.1	0.255	[G/A]
		rs769217	34439484	c.1167C>T (p.D389D)	0.076	98.3	0.256	[C/T]
		rs11032709	34442287	c.1255C>T(p.L419L)	1	94.8	0.006	[C/T]
		rs511895	34444305	c.1326+1947G>A	0.938	96.7	0.359	[G/A]
3p26.2	OGG1	rs7104301	34450214	c.*658A>G	0.481	96	0.305	[A/G]
		rs159153	9764875	c.-2096T>C	0.837	98.5	0.312	[T/C]
		rs2072668	9773140	c.748-15C>G	0.965	93.6	0.224	[C/G]
6p12	GCLC	rs1052133	9773773	c.994 C>G (P332A)/(C326S)	0.858	98.5	0.216	[C/G]
		rs11415624	53470407	c.*1106insT	0.474	99.6	0.337	[-/A]
		rs2066511	53473333	c.1396-63G>A	0.625	97.3	0.279	[G/A]
1p22.1	GCLM	rs1014852	53478711	c.1198-59T>A	0.572	99.3	0.063	[A/T]
		rs3736729	53487364	c.561-110T>G	0.166	98	0.479	[T/G]
		rs2100375	53493434	c.446+101G>A	0.060	96.9	0.284	[G/A]
		rs17883901	53517996	c.-594C>T	0.561	95.5	0.105	[C/T]
		rs7513671	94126161	c.*973G>A	0.053	24.9	0.401	[C/T]
8p21.1	GSR	rs769211	94132695	c.655+63G>T	0.365	99.5	0.262	[G/T]
		rs7515191	94139685	c.287+44C>T	0.808	97.3	0.375	[G/A]
		rs2234729	94142804	c.127-72T>C	0.937	99.5	0.041	[T/C]
		rs2911678	30659513	c.1154-393T>A	0.525	97.5	0.178	[A/T]
		rs4628224	30676351	c.695+789T>A	0.578	94.8	0.269	[A/T]
20q11.2	GSS	rs2978663	30685487	c.422-287G>A	0.577	97.1	0.43	[A/G]
		rs1002149	30705280	c.-386C>A	0.898	99.3	0.138	[G/T]
		rs2273684	32993427	c.492-134A>C	0.118	95.4	0.458	[T/G]
Xq28	G6PD	rs3761144	33007736	c.-4420G>C	0.322	96.9	0.463	[C/G]
3p21.3	GPX1	rs2071429	153413702	c.1345-13T>C	0.007	97.4	0.165	[T/C]
19p13.3	GPX4	rs3448	49371755	c.*891C>T	0.130	99.3	0.25	[C/T]
		rs757228	1052992	c.-2051A>G	0.895	96.7	0.491	[G/A]
		rs4807542	1055078	c.36G>A (p.P12P)	0.672	99.1	0.165	[G/A]
6p22.1	GPX6	rs9468385	28579591	c.*457G>A	0.001	99.2	0.091	[C/T]
		rs974334	28582197	c.242-12 G>C	0.402	98.4	0.163	[C/G]
		rs406113	28591461	c.39T>G(p.F13L)	0.486	99.1	0.327	[A/C]
9q31	TXN	rs2776	112046109	c.*146A>G	0.783	97.4	0.5	[A/G]
		rs4135225	112046512	c.196-192C>T	0.073	97.5	0.372	[T/C]
		rs4135211	112048395	c.130-1451T>G	0.889	98.7	0.052	[T/G]
		rs2418076	112053172	c.129-287G>A	0.227	98.5	0.253	[C/T]
		rs4135179	112055821	c.25-2259T>C	0.463	98.1	0.169	[A/G]
		rs4135168	112056706	c.24+1807A>G	0.549	97	0.243	[A/G]
		rs1410051	112057173	c.24+1340T>C	0.007	96	0.24	[T/C]
		rs4135165	112057383	c.24+1130C>T	0.087	97.8	0.116	[C/T]
		rs2301241	112059329	c.-793C>T	0.975	96.1	0.48	[T/C]
		rs749384	112060499	c.-1963C>T	0.738	96.2	0.225	[G/A]
22q13.1	TXN2	rs139998	35192447	c.*1350A>G	0.004	93.6	0.164	[T/C]
		rs8139906	35198206	c.388-4296C>G	0.531	97.3	0.172	[G/C]
		rs2281082	35202696	c.387+30A>C	0.407	99.3	0.199	[G/T]
12q23-q24.1	TXNRD1	rs4077561	103204498	c.-24738T>C	1	95.6	0.387	[C/T]
		rs4964778	103210194	c.-19054C>G	1	97.4	0.187	[C/G]
		rs4964779	103218991	c.-10266T>C	1	97.5	0.069	[T/C]
		rs4564401	103227358	c.-1899A>G	0.984	96.7	0.073	[A/G]
		rs5018287	103231281	c.160+56G>A	0.804	99.5	0.43	[G/A]
		rs4964287	103233689	c.165C>T(p.L55L)	0.127	96.8	0.325	[C/T]
		rs10861201	103243089	c.766-156C>A	0.175	97.9	0.245	[C/A]
22q11.21	TXNRD2	rs16984299	18243593	c.*1041T>C	0.041	95.9	0.215	[T/C]
		l360R-art	18248292	c.1108 T>C(p.l370T)	0.733	98.3	0.233	[G/A]
		rs2073750	18253357	c.950-2373G>A	0.394	99.9	0.242	[G/A]
		rs1548357	18258362	c.949+4568T>C	0.901	97.9	0.302	[T/C]
		rs5992495	18262984	c.895T>G(p.S299R)	0.238	94.7	0.167	[T/G]
		rs732262	18264657	c.774+905G>A	1	99.5	0.082	[G/A]
		rs756661	18285802	c.375-62T>C	0.727	97.9	0.455	[T/C]
		rs2020917	18308884	c.103+339C>T	0.583	95.4	0.336	[C/T]

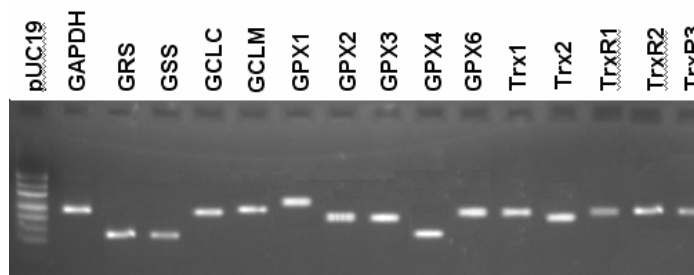
II. Anexo 2. Verificación de la Reacción de PCR en Tiempo Real.

a) Curvas de Disociación Generadas en la Reacción de PCR en Tiempo Real y b) Verificación de los Fragmentos en Gel de Agarosa 2%.

a)



b)



III. Anexo 3. Correlaciones Spearman entre los Marcadores de Estrés Oxidativo y los Niveles de ARNm de los Genes Analizados.

Gen	R _{6SH}	p-valor	R _{6SS6}	p-valor	R _{6MD4}	p-valor	R _{6MD6}	p-valor	R _{6MD10}	p-valor	R _{6MD12}	p-valor	R _{6MD14}	p-valor
CYBA	-0.255	0.060	0.179	0.192	0.223	0.102	0.159	0.246	-0.197	0.150	0.235	0.150	0.235	0.084
CYBB	0.136	0.324	0.229	0.092	0.111	0.420	-0.039	0.779	0.145	0.292	0.102	0.292	0.102	0.457
NCF1	-0.231	0.090	0.044	0.748	0.041	0.764	-0.044	0.752	-0.241	0.077	0.126	0.077	0.126	0.360
NCF2	-0.206	0.131	0.431	0.001	0.319	0.016	0.064	0.642	-0.139	0.313	0.377	0.313	0.377	0.005
NCF4	0.314	0.020	-0.330	0.014	-0.010	0.944	0.011	0.939	0.308	0.022	-0.348	0.022	-0.348	0.009
RAC1	-0.204	0.135	0.256	0.060	0.324	0.016	0.076	0.581	-0.156	0.256	0.256	0.256	0.256	0.059
RAC2	-0.196	0.151	0.301	0.025	0.236	0.082	0.053	0.700	-0.133	0.332	0.295	0.332	0.295	0.029
SOD1	-0.021	0.892	-0.143	0.360	-0.285	0.064	0.028	0.861	-0.053	0.737	-0.085	0.737	-0.085	0.589
SOD2	-0.391	0.009	0.281	0.068	0.156	0.319	-0.019	0.902	-0.364	0.016	0.375	0.016	0.375	0.013
CAT	-0.005	0.974	-0.210	0.177	-0.011	0.942	0.006	0.967	-0.034	0.827	-0.162	0.827	-0.162	0.300
OGG1	-0.065	0.692	0.304	0.056	0.234	0.147	-0.110	0.409	0.004	0.981	0.255	0.981	0.255	0.112
GCLC	0.123	0.370	-0.191	0.162	-0.244	0.072	0.043	0.754	0.043	0.758	-0.217	0.758	-0.217	0.111
GCLM	0.153	0.264	-0.040	0.769	-0.057	0.678	0.066	0.633	0.119	0.367	-0.094	0.367	-0.094	0.494
GRS	0.020	0.883	0.258	0.057	0.041	0.764	0.064	0.540	0.055	0.688	0.199	0.688	0.199	0.146
GSS	-0.007	0.961	-0.013	0.925	-0.137	0.320	-0.144	0.296	0.002	0.988	0.003	0.988	0.003	0.983
G6PDH	0.061	0.695	-0.017	0.913	0.183	0.241	-0.019	0.906	0.095	0.543	-0.049	0.543	-0.049	0.757
GPX1	-0.005	0.973	0.112	0.414	0.207	0.129	0.042	0.760	0.001	0.994	0.037	0.994	0.037	0.787
GPX2	0.131	0.342	-0.180	0.188	-0.095	0.492	-0.010	0.940	0.164	0.232	-0.142	0.232	-0.142	0.300
GPX3	-0.209	0.141	-0.061	0.668	-0.005	0.971	0.079	0.580	-0.220	0.120	0.055	0.120	0.055	0.704
GPX4	0.353	0.008	-0.255	0.060	-0.086	0.532	0.037	0.789	0.405	0.002	-0.320	0.002	-0.320	0.017
GPX6	-0.164	0.231	0.149	0.279	0.076	0.580	-0.141	0.304	-0.179	0.192	0.160	0.192	0.160	0.244
TXN	0.317	0.019	-0.101	0.470	0.078	0.575	0.428	0.001	0.288	0.034	-0.202	0.034	-0.202	0.143
TXN2	-0.073	0.594	-0.063	0.646	-0.107	0.438	-0.004	0.974	-0.138	0.315	-0.015	0.315	-0.015	0.912
TXNRD1	-0.096	0.487	-0.249	0.067	0.006	0.968	0.008	0.956	-0.166	0.225	-0.127	0.225	-0.127	0.355
TXNRD2	-0.241	0.077	0.236	0.082	0.102	0.457	0.003	0.983	-0.147	0.285	0.290	0.285	0.290	0.032
TXNRD3	-0.065	0.635	-0.300	0.026	-0.111	0.421	0.211	0.121	-0.123	0.372	-0.231	0.372	-0.231	0.089