

**Departamento de Bioquímica, Biología Molecular,
Inmunología y Química Orgánica.**

LUIS MORCILLO HIDALGO

**ACTIVIDAD DEL SISTEMA
RENINA-ANGIOTENSINA EN RELACIÓN
CON SUS POLIMORFISMOS GENÉTICOS**

MÁLAGA

2000



Publicaciones y
Divulgación Científica

AUTOR: Luis Morcillo Hidalgo

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer
obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de
Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

DR. D. ARMANDO REYES ENGEL, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Inmunología y Química Orgánica de la Universidad de Málaga y,

DR. D. PEDRO ARANDA LARA, Jefe de la Unidad de Hipertensión y Valoración de Riesgo Vascular del Hospital Universitario Carlos Haya de Málaga

CERTIFICAN que la Tesis de Doctorado que presenta D. Luis Morcillo Hidalgo, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha sido realizada bajo nuestra dirección, con el título "Actividad del sistema renina-angiotensina en relación con sus polimorfismos genéticos", para su lectura y defensa ante el tribunal designado por la Comisión de Doctorado de la Universidad de Málaga. Una vez redactado el presente trabajo, ha sido revisado encontrándose conforme para ser defendido y aspirar al grado de Doctor en Medicina. Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, se expide el siguiente certificado.

Lo que se firma en Málaga a 11 de Octubre del 2000.

Fdo: Armando Reyes Engel.

Fdo: Pedro Aranda Lara.

Agradecimientos:

Al profesor Armando Reyes Engel, por haber aceptado la realización de la tesis bajo su dirección. Le agradezco su amabilidad, experiencia y continua dedicación, su disposición a ayudarme en todo momento y resolver las dudas que le planteé, así como su paciencia y dedicación a la hora de valorar los resultados.

Al doctor Pedro Aranda Lara por introducirme en el mundo de la investigación guiarme con su ejemplo, prestarme su apoyo, así como aconsejarme en todos los aspectos y codirigir mi tesis, poniendo su dilatada experiencia a mi disposición.

A ambos por enriquecerme humanamente con su esfuerzo y estímulo.

Agradezco al profesor Carlos Ferrario, y a su equipo investigador, como experto en la materia y “padre” del descubrimiento de los efectos de la angiotensina-(1-7), su inestimable contribución tanto en la clarificación de los objetivos a estudiar como en la determinación de los niveles de los péptidos de la angiotensina en su laboratorio.

A “Nani” por su ayuda en la realización del trabajo de campo y laboratorio, su buen hacer y constante ánimo.

A Pedro Muñoz por su inestimable ayuda en la realización técnica y estadística de este estudio, y por los buenos ratos pasados juntos.

A “Chechu” por su colaboración y por hacer el trabajo más agradable.

A Manuel Muñoz por su voluntad y buena disposición.

Al Profesor D. Miguel Morell por el interés mostrado en mi trabajo y formación.

A D. Javier Aranda Lara por su estimada colaboración y ayuda en el manejo estadístico de la tesis.

Al profesor Dr. José Luis Diéguez Lucena por iniciarme en el conocimiento del trabajo de laboratorio.

A todos y cada uno de los alumnos y amigos, que participaron en el estudio de una forma desinteresada y sin los cuales éste no existiría.

A Pedro Aranda Granados, amigo, que ha hecho más llevaderas las dudas y los largos años de estudio compartiendo mis ilusiones.

Al Dr Néstor Zurita, compañero de fatigas al que tanto me une humana y profesionalmente, por los buenos y malos ratos pasados juntos.

A Rocío que pone ilusión en mi vida.

A mis padres y hermanos por estar a mi lado en todo momento y a quienes debo lo que de bueno hay en mí.

A “Rosi” y otras tantas personas por crear un ambiente agradable en el que trabajar.

El trabajo presentado en esta memoria ha podido realizarse gracias a la experiencia y ayuda de otras muchas personas a las que estoy sinceramente agradecido.

*A mis Padres
y Hermanos*

ÍNDICE:

INTRODUCCIÓN	1
1.1. Sistema Renina-Angiotensina.	2
1.2. Angiotensinógeno.	2
1.2.1. Polimorfismos del angiotensinógeno e HTA.	5
1.2.1.1. Mutación M235T	6
1.3. Renina.	7
1.3.1. Bioquímica de la formación de renina.	8
1.3.2. Mecanismos de acción.	9
1.3.3. Control de secreción de renina.	10
1.3.3.1. Señales hemodinámicas.	10
1.3.3.2. Señales neurogénicas.	10
1.3.3.3. Señales humorales y hormonales.	11
1.4. Enzima convertidor de la angiotensina I.	13
1.4.1. Polimorfismos de la ECA y su relación con varias patologías.	15
1.5. Angiotensina II. Células diana y funciones fisiológicas.	18
1.6. Angiotensinasas y péptidos derivados de la angiotensina II	21
1.6.1. Angiotensinasas.	21
1.6.2. Péptidos derivados de la angiotensina II.	21
1.6.2.1. Angiotensina III.	22
1.6.2.2. Angiotensina-(1-7).	22
1.6.2.3. Angiotensina-(1-5).	25
1.6.2.4. Angiotensina IV.	25
1.7. Receptores de la angiotensina.	25
1.7.1. Mecanismos celulares de acción de la angiotensina II.	25
1.7.2. Heterogeneidad del receptor de angiotensina II.	28
1.7.3. Clasificación de los subtipos.	30

1.7.4. Receptor AT ₁ .	32
1.7.4.1. Clonaje del receptor AT ₁ .	33
1.7.4.2. Polimorfismos genéticos del gen del AT1 y su relación con la génesis de la HTA y otras enfermedades.	34
1.7.4.3. Subtipos del receptor AT ₁ .	35
1.7.4.4. Regulación de la expresión del ARNm del receptor AT ₁ .	37
1.7.4.5. Desensibilización del receptor AT ₁ .	39
1.7.5. Receptor AT ₂ .	40
1.7.5.1. Subtipos del receptor AT ₂ .	40
1.7.5.2. Regulación de la expresión del receptor AT ₂ .	40
1.7.6. Efectos fisiológicos mediados por los receptores AT ₁ y receptores AT ₂ .	41
1.8- Relación entre los polimorfismos de los genes del SRA con los niveles plasmáticos de los componentes del eje bioquímico.	43
1.8.1- <i>Polimorfismos del gen del angiotensinógeno.</i>	43
1.8.2- <i>Polimorfismos del gen de la ECA.</i>	44
1.8.3- <i>Polimorfismos del gen del receptor AT1.</i>	45
OBJETIVOS	46
MATERIAL Y MÉTODOS	49
3. 1. Reactivos.	50
3. 2. Materiales.	51
3. 3- Métodos.	51
3.3.1- Preparación y extracción de la muestra para la determinación de los péptidos de la angiotensina.	51
3.3.1.1- <i>Fabricación de la solución inhibidora de la proteasa.</i>	51
3.3.1.2- <i>Protocolo de extracción de sangre para la medición. de los péptidos de la angiotensina.</i>	52

3.3.2- Determinación de los niveles plasmáticos de los péptidos de la angiotensina.	53
3.3.3- Obtención y preparación de la sangre para la determinación de los polimorfismos.	54
3.3.3. a- Método corona de linfocitos.	54
3.3.3. b- Método de sangre total	54
3.3.4- Extracción de DNA.	55
3.3.5- Digestión de DNA.	55
3.3.6- Reacción en cadena de la polimerasa(PCR).	55
3.3.6.1- Protocolo de PCR para el polimorfismo I/D del gen de la ECA	55
3.3.6.2- Protocolo de PCR para el polimorfismo A1166C del gen del receptor AT1 de la angiotensina II.	57
3.3.6.3- Protocolo de PCR para el polimorfismo M235T del gen del angiotensinógeno.	58
3.3.7- Electroforesis en gel de agarosa.	59
3.3.8- Colocación de las muestras en el gel de agarosa.	59
3.3.9- Visualización de las bandas.	59
3.3.10- Composición y fabricación de los productos usados para la determinación última de los polimorfismos.	60
3.3.11- Tratamiento estadístico de los datos.	62
RESULTADOS	63
4.1- Datos descriptivos de la población del estudio.	64
4.2- Valores plasmáticos de los péptidos del SRA en la población a estudio.	66
4.3- Comparación entre los Valores plasmáticos de los péptidos del SRA en la muestra a estudio dependiendo de los polimorfismos del gen del Angiotensinógeno, de la ECA y del AT1R.	66
4.3.1- Valores plasmáticos de los péptidos del SRA en la muestra a estudio en relación a los distintos genotipos del polimorfismo M235T del gen del Angiotensinógeno	66

4.3.2-	<i>Valores plasmáticos de los péptidos del SRA en relación con el polimorfismo I/D del gen de la ECA</i>	69
4.3.3-	<i>Valores plasmáticos de los péptidos del SRA relacionados con los genotipos del polimorfismo A1166C del gen del AT1</i>	70
4.4-	Descripción de los valores plasmáticos de los péptidos del SRA en Hombres.	71
4.4.1-	Comparación de los valores plasmáticos de los péptidos del SRA entre genotipos en Hombres.	71
4.4.1.1-	Genotipos del polimorfismo M235T del angiotensinógeno en hombres	71
4.4.1.2.-	Genotipos del polimorfismo I/D de la ECA en hombres.	74
4.4.1.3-	Genotipos de polimorfismo A1166C del AT1 en hombres.	75
4.5-	Descripción de los valores plasmáticos de los péptidos del SRA en Mujeres.	77
4.5.1-	Comparación de los valores plasmáticos de los péptidos del SRA entre genotipos en Mujeres	77
4.5.1.1-	Genotipos del polimorfismo M235T del angiotensinógeno en mujeres.	77
4.5.1.2-	Genotipos del polimorfismo I/D de la ECA en mujeres.	79
4.5.1.3-	Genotipos del polimorfismo A1166C del AT1 en mujeres.	80
4.6-	Valores plasmáticos de los péptidos del SRA en la población a estudio considerados por Sexos	83
4.7-	Valores plasmáticos de los péptidos del SRA en la muestra a estudio por Sexos en los distintos genotipos de cada polimorfismo (Hombre vs. Mujer)	83
4.7.1-	Polimorfismo M235T del gen del angiotensinógeno.	83
4.7.2-	Polimorfismo I/D del gen de la ECA.	87
4.7.3-	Polimorfismo A1166C del gen del AT1.	89

TABLAS	92
DISCUSIÓN	118
5.1- Valores plasmáticos de los péptidos del SRA en la población a estudio.	119
5.2- Comparación entre los Valores plasmáticos de los péptidos del SRA en la muestra a estudio dependiendo de los polimorfismos del gen del Angiotensinógeno, de la ECA y del AT1R.	121
5.2.1- Valores plasmáticos de los péptidos del SRA en la muestra a estudio en relación a los distintos genotipos del polimorfismo M235T del gen del Angiotensinógeno	121
5.2.2- Valores plasmáticos de los péptidos del SRA en relación con el polimorfismo I/D del gen de la ECA	122
5.2.3- Valores plasmáticos de los péptidos del SRA relacionados con los genotipos del polimorfismo A1166C del gen del AT1	123
5.3- Descripción de los valores plasmáticos de los péptidos del SRA en Hombres.	124
5.3.1- Comparación de los valores plasmáticos de los péptidos del SRA entre genotipos en Hombres.	124
5.3.1.1- Genotipos del polimorfismo M235T del angiotensinógeno en hombres	124
5.3.1.2.- Genotipos del polimorfismo I/D de la ECA en hombres.	125
5.3.1.3- Genotipos de polimorfismo A1166C del AT1 en hombres.	126
5.4- Descripción de los valores plasmáticos de los péptidos del SRA en Mujeres.	127
5.4.1- Comparación de los valores plasmáticos de los péptidos del SRA entre genotipos en Mujeres	127
5.4.1.1- Genotipos del polimorfismo M235T del angiotensinógeno en mujeres.	127

5.4.1.2- Genotipos del polimorfismo I/D de la ECA en mujeres.	128
5.4.1.3- Genotipos del polimorfismo A1166C del AT1 en mujeres.	129
5.5- Valores plasmáticos de los péptidos del SRA en la población a estudio considerados por Sexos	130
5.6- Valores plasmáticos de los péptidos del SRA en la muestra a estudio por Sexos en los distintos genotipos de cada polimorfismo (Hombre vs. Mujer)	131
5.6.1- Polimorfismo M235T del gen del angiotensinógeno.	131
5.6.2- Polimorfismo I/D del gen de la ECA.	133
5.6.3- Polimorfismo A1166C del gen del AT1.	135
CONCLUSIONES.	139
BIBLIOGRAFÍA.	142

“La clase de estabilidad que muestra un organismo vivo es de una naturaleza algo diferente a la estabilidad de los átomos o de los cristales. Es una estabilidad del proceso o de la función, más que una estabilidad de la forma”.

W. Heisenberg

1-INTRODUCCIÓN:

1. INTRODUCCIÓN:

1.1. Sistema Renina-Angiotensina:

El sistema renina-angiotensina (SRA) es un sistema fisiológico primordial para la regulación y control de la presión arterial y homeostasis hidroelectrolítica del organismo, ejerciendo el papel efector principal la angiotensina II actuando sobre múltiples órganos diana, entre ellos el riñón, el músculo liso vascular, el miocardio, el cortex adrenal y el cerebro. Dentro de sus múltiples funciones destacan la modulación de la secreción de aldosterona, tono vascular, tasa y contractilidad cardíaca, filtración glomerular, reabsorción de sodio y secreción de hormona antidiurética por la neurohipófisis. Además de las funciones cardiovasculares descritas poseen una función de neurotransmisión y neuromodulación en el Sistema Nervioso.

El complejo enzimático-hormonal de la renina-angiotensina está compuesto de dos enzimas principales, la renina y el enzima convertidor de la angiotensina (ECA), cuya acción en serie desencadena la liberación final de Angiotensina II, su efector principal (Esquema 1).

Básicamente la actividad del SRA se incrementa por la disminución de volumen del fluido extracelular, como ocurre en la disminución de sodio, pérdida de volumen extracelular, hemorragia, etc. Y disminuye por la expansión de dicho volumen en las condiciones adecuadas de sodio. Así pues su función principal es retener sodio y mantener el volumen extracelular.

1.2. Angiotensinógeno:

El angiotensinógeno, también llamado sustrato de la renina (Esquema 1), es una glucoproteína de la fracción alfa-2-globulina del

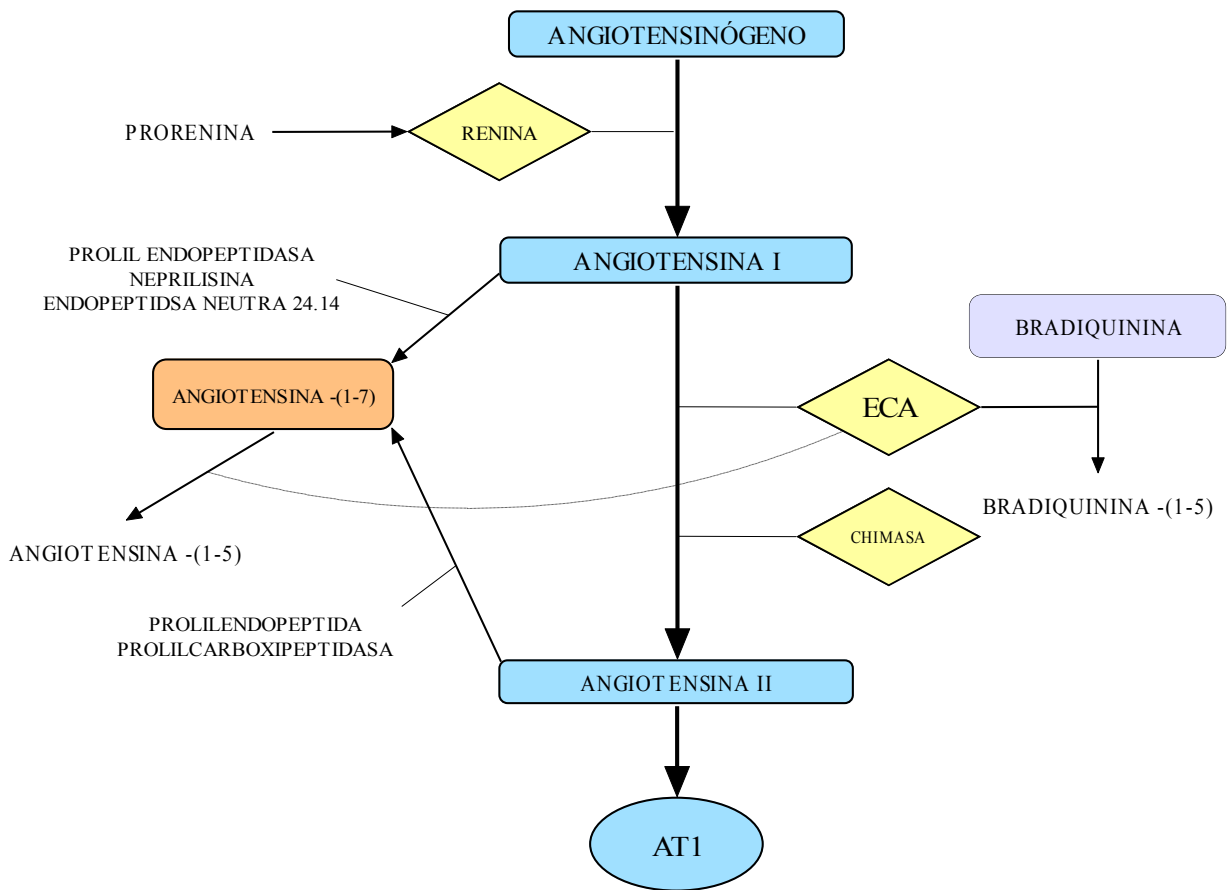
plasma. Presenta cierta heterogeneidad variando su peso molecular entre 60 y 65 kD, lo que podría corresponder con las formas precursoras, o con diferentes grados de glicosilación de dicha glicoproteína. Siendo el tamaño mínimo necesario para su reconocimiento y rotura por la renina el de un octapéptido. Actualmente se conoce la secuencia nucleotídica completa del ARNm del angiotensinógeno humano (Kageyama y cols, 1984), se han conseguido aislar clones de cDNA del mismo e incluso se ha llegado a poder sintetizar por *E. coli* in vitro (Kunapuli y cols, 1987).

La producción de angiotensinógeno ocurre fundamentalmente en el hígado, si bien existen síntesis locales de variantes del angiotensinógeno que apoyan la idea de la existencia de un SRA independiente, tanto en el sistema nervioso central (Murakami y cols, 1984; Lippoldt y cols, 1995), como en el riñón, el corazón y la vasculatura (Campbell y Habener, 1986), y en el tejido adiposo humano. Además varios estudios de Fried y Simpson (1986) y de Dzau y cols (1988) han demostrado la existencia de ARNm de angiotensinógeno en cortex y médula renal de rata y ratón, así como en células del túbulo proximal, lo que indicaría, que es sintetizado por estas células y secretado al intersticio cortical, donde la renina actúa sobre él para producir angiotensina I.

El control en la producción de angiotensinógeno, es realizado principalmente por hormonas que modulan la concentración de su ARNm en los tejidos a través de la regulación de su transcripción. La función principal de estas hormonas (Deschepper, 1994) es la de mantener la producción del angiotensinógeno en la fase de rápido consumo del mismo por altos niveles de renina en plasma; puesto que el angiotensinógeno es un factor limitante en la actividad enzimática de la renina.

La concentración de angiotensinógeno está aumentada por los estrógenos, los glucocorticoides, las hormonas tiroideas y tras nefrectomía. Así, en el mismo sentido, la AII estimula la síntesis de angiotensinógeno por el hígado en un mecanismo de retroalimentación positivo.

Esquema 1: Eje Renina-Angiotensina



1.2.1. Polimorfismos del angiotensinógeno e HTA:

El gen del angiotensinógeno humano contiene 5 exones (Gaillard y cols, 1989) y se encuentra en el cromosoma 1 (Abonia y cols, 1993) en la región 1q42-43 (Gaillard-Sánchez y cols, 1990; Isa y cols, 1989,1990). La secuencia de aminoácidos que produce es parecida a la de la alfa-1-antitripsina y a la de la antitrombina III.

La evidencia más sólida de una relación entre la HTA esencial y un gen en humanos la obtuvieron Jeunemaitre y cols en 1992 mediante un estudio con hermanos con dos poblaciones geográficamente diferentes, encontrando asociación genética entre HTA esencial y el gen del angiotensinógeno; asociación entre hipertensión y ciertas variantes moleculares del gen del angiotensinógeno; y unos niveles elevados de angiotensinógeno plasmático en sujetos hipertensos portadores de una variante del gen del angiotensinógeno fuertemente asociada a hipertensión. Evidencia que ha sido posteriormente refrendada por otros investigadores.

Sin embargo esta relación también ha sido negada por otros autores, como Niu y cols (1998) mediante un estudio en población china.

Se han identificado 15 variantes moleculares del angiotensinógeno encontrándose una asociación significativa de dos de ellas con la HTA esencial, la mutación M235T y la T174M la -1074t, la C532T y la G-6A (Jeunemaitre y cols, 1992) encontrándose ambas en una completa relación de desequilibrio. Siendo de ellas la M235T la determinada en nuestro estudio y la que merezca más nuestra atención.

Hegele y cols (1994) encontraron asociación entre variaciones en la presión arterial sistólica y la mutación T174M en varones de una población "cerrada" como los Hutterites de Norteamérica. Si bien Niu y cols (1999) no hallan tal relación en una población china.

Además existe una variante en el promotor proximal del gen del AGT (angiotensinógeno), consistente en una sustitución de Guanina por

Adenina 6 pares de bases por encima del punto de inicio de la transcripción, que está en estrecha relación de desequilibrio con el alelo T235, y afecta a su ritmo basal de transcripción, pudiendo predisponer al desarrollo de HTA esencial (Inoue y cols, 1997).

1.2.1.1. Mutación M235T:

Consiste en la substitución de aminoácidos, en la posición 235, de una Metionina (Met) por una Treonina (Thr).

En el estudio de Jeunemaitre y cols (1992), antes referido, es esta variante del gen la que guarda una mayor relación con la hipertensión (junto con la mutación T174M). En el mismo sentido apunta el estudio de Hata y cols (1994) que encuentra asociada la mutación M235T con la hipertensión en población japonesa, y el de Tired y cols (1998) que encuentra el alelo T235 más frecuente en varones y mujeres con HTA.

La frecuencia de esta mutación varía en los distintos grupos étnicos, así como lo hace la frecuencia de la HTA esencial. En la población caucásica las frecuencias del homocigoto T235, del heterocigoto M235T y del homocigoto M235 son respectivamente del 12% , del 46% y del 42% ; siendo en la población afroamericana del 70, 28 y 2% respectivamente según los datos aportados por Lifton y cols (1993) y en la población china de 70%, 25% y 5% respectivamente según los datos de Young y cols (1998). Teniendo presente que la incidencia de HTA esencial en negros es mayor que en blancos.

A su vez Bloem y cols (1995) comparando dos grupos de niños, negros y blancos, encontró que la frecuencia del alelo T235 era del 81% en los primeros, y del 42% en blancos, siendo a su vez los niveles de AGT el 19% mayores en el grupo de niños negros.

En la población japonesa esta mutación también ha sido encontrada más frecuente que en la caucásica (Hata y cols, 1994).

Es más, según Niu y cols (1998), la pertenencia a un grupo étnico puede marcar una diferencia en el papel que juegan varios genes en ciertos rasgos complejos.

Sin embargo otros investigadores no encontraron asociación significativa entre el M235T y el desarrollo de HTA esencial, como Fornage y cols (1995), Niu y cols (1998) y como Caulfield y cols (1994 y 1995).

En el mismo sentido Frossard y cols (1998) en una población étnica caracterizada por la abstinencia del tabaco y del alcohol, como es la de los Emiratos Árabes Unidos, tampoco encontró dicha relación con la HTA, ni con la hipertrofia ventricular izquierda, la enfermedad isquémica cardíaca o el infarto de miocardio; pero sí encontró el alelo T235 más frecuente en el grupo de hipertensos esenciales y menos frecuente en el de supervivientes de IAM, así como un descenso en su frecuencia con la edad.

Sin embargo Fernandez-Arcas y cols (1999) encuentran el genotipo MM (así como el homocigótico para el C1166 del receptor AT1 de la AII) como factor de riesgo para el desarrollo de IAM.

La mutación del gen del AGT, M235T ha sido asociada así mismo con otras patologías, como la preeclampsia y eclampsia a través de varios estudios (Ward y cols, 1993; Arngrimsson y cols, 1993) en mujeres caucásicas y japonesas. Y con la enfermedad coronaria cardíaca, como hicieron Katsuya y cols (1995), que concluyeron que el T235 es un factor de riesgo independiente que multiplica por dos el riesgo de enfermedad coronaria. Sin embargo, Jeunemaitre y cols (1997) no encuentran relación del polimorfismo M235T (ni del A1166C del AT1, ni del I/D del ECA) con la arteriosclerosis.

1.3. Renina:

En 1934 Goldblatt y cols constataron que la ligadura parcial de la arteria renal provocaba una hipertensión arterial mediante la liberación de una sustancia presora en sangre arterial. Pero no fue hasta 1940, cuando

Page y Helmer demostraron que se trataba de una enzima que actuaba sobre un sustrato (el angiotensinógeno) para dar lugar a un principio activo (la angiotensina) al cual ellos denominaron “angiotonina”. De esta forma la renina actúa sobre el angiotensinógeno liberando un decapeptido, la angiotensina I (Esquema 1).

La mayor parte de la renina circulante se produce en el riñón, como confirma el hecho de que tras la nefrectomía bilateral los niveles de renina caigan a valores indetectables. Además se ha demostrado que el riñón es el único tejido con la capacidad de convertir la prorenina (forma inactiva) en renina, y secretarla a la circulación, o bien, almacenarla en gránulos (von Lutterotti y cols,1994). Si bien se ha encontrado ARNm e isoenzimas de la renina en otros tejidos, como cerebro, glándula adrenal, grandes vasos, útero, placenta y glándula submandibular de ratón y de rata (Dzau y cols,1988 y 1994).

1.3.1. Bioquímica de la formación de renina:

La renina es una aspartil-proteinasa, sintetizada como una preproteína, que es un precursor inactivo y es convertida en prorenina, una forma también inactiva, pero más pequeña, que es finalmente procesada en renina, la forma activa.

En el plasma humano la renina circula en ambas formas, activa e inactiva (Sealey y cols, 1983) siendo los niveles de prorenina, la forma inactiva, considerablemente mayores que los de renina, la forma activa, en condiciones normales.

La renina se produce en células modificadas de la musculatura lisa de la arteriola aferente al glomérulo renal, las llamadas células yuxtaglomerulares. Allí es almacenada en gránulos intracelulares, desde donde es liberada al torrente sanguíneo mediante el proceso de degranulación, que consiste en la fusión de los gránulos a la membrana celular. Pero antes de esta liberación la renina sufre una serie de procesos moleculares.

La secuencia génica de nucleótidos es conocida y consiste en diez exones interrumpidos por nueve intrones, que se corresponden con un ARNm de 1500 bases, siendo en total 12000 bases (Hobart y cols, 1984).

El producto primario de la traducción del ARNm, la preprorenina, contiene un péptido señal, que es eliminado rápidamente por el retículo endoplásmico, dando lugar al zimógeno prorenina. La prorenina es empaquetada en los gránulos de almacenamiento donde se lleva a cabo la maduración postraduccional, que incluye la activación de la prorenina a renina mediante una rotura proteolítica y una glicosilación aún muy poco conocidos. La renina es posteriormente eliminada de los gránulos secretorios o transportada a través de la membrana hacia la sangre.

Hay muchos puntos de posible control de la síntesis de renina y de su secreción. Recientes investigaciones sugieren que muy probablemente la estimulación del SRA ocurre transcripcionalmente, con la rápida liberación de la renina recién sintetizada y, en todo caso, sólo limitado por la cantidad almacenada.

Existen también mecanismos postraduccionales (Nakamura y cols, 1985), que excluyen posibles efectos en la velocidad del transporte por la membrana o en la liberación del gránulo.

1.3.2. Mecanismos de acción:

Como otras aspartilproteinasas, la renina contiene dos grupos carboxilos en el sitio activo, provinientes de ácido aspártico, que son esenciales para su función catalítica, sin embargo difiere de otras aspartilproteinasas en muchos aspectos: es activa a pH neutro, contiene grupos sulfidrilos libres y es altamente selectiva por su sustrato, el agiotensinógeno. La renina renal tiene un peso molecular entre 37000 y 40000 , según la especie, su punto isoeléctrico se encuentra entre 5.2 y 5.8 y su pH óptimo de actuación es 6.0 (Dzau y cols, 1988). Mediante modelos estructurales diseñados por ordenador se observa que el sitio catalítico de la renina está formado por una hendidura entre dos lóbulos de la molécula

enzimática. Dicho hueco liga el sustrato acomodando 6-8 aminoácidos de la molécula de angiotensinógeno. El acoplamiento del sustrato y el enzima permite la hidrólisis entre los residuos Leu-Leu, rindiendo el decapeptido agiotensina I..

1.3.3. Control de secreción de renina :

La secreción de renina está controlada por tres principales clases de señales (Freeman y cols 1983): hemodinámicas, neurogénicas y humorales .

1.3.3.1. Señales hemodinámicas :

Las células yuxtglomerulares son sensibles a la elasticidad de la arteriola glomerular aferente de tal modo que, una disminución de la elasticidad conlleva un incremento de la liberación de la renina y viceversa.

Maniobras que favorezcan el estancamiento de la sangre en las extremidades inferiores (ortoestatismo) ó inducir la centralización del volumen sanguíneo (como la inmersión en agua) dan lugar a la estimulación y a la inhibición de la liberación de renina respectivamente. Condiciones caracterizadas por un descenso del volumen circulante efectivo (fallo cardíaco, cirrosis hepática, enfermedad de Addison, hemorragia o pérdida de gran volumen extracelular, etc.) se acompañan de una marcada estimulación del SRA. De hecho, la medida de la actividad plasmática de renina es considerada como el mejor medio de conocer el volumen circulante efectivo. Cuando existe un estrechamiento anatómico de la arteria renal se puede producir hipertensión arterial mediada por la exagerada liberación de renina, causada por la caída de la presión arterial renal, que puede ser tratada mediante intervención quirúrgica o por inhibición farmacológica del SRA.

1.3.3.2. Señales neurogénicas :

Los receptores adrenérgicos de las células yuxtglomerulares reaccionan frente a señales neurogénicas, ya sea directamente por los nervios renales o por las catecolaminas sistémicas circulantes. La secreción

de renina es estimulada por mecanismos beta-adrenérgicos, aunque persiste la controversia de si en este mecanismo participan los receptores beta-1 , beta-2, o un receptor beta no selectivo. Las catecolaminas circulantes liberadas a partir de la médula adrenal estimulan la secreción de renina a través de la activación de los receptores beta-adrenérgicos. Una mínima estimulación de los nervios renales con una intensidad que no altera la hemodinámica renal ni la excreción urinaria de sodio, aumenta la tasa de secreción de renina. Esta respuesta es mediada a través de la activación de los receptores beta-adrenérgicos sobre la células yuxta-glomerulares (Fray y cols , 1987).

Por el contrario una activación directa de los receptores alfa-adrenérgicos sobre estas células, produce la inhibición de la secreción de renina. El papel de la estimulación alfa-adrenérgica en la supresión de la liberación de renina es aún ambigua y puede ser más complicado que un papel dual de los receptores presinápticos alfa-2 inhibiendo la liberación de renina y los postsinápticos alfa1 estimulando su liberación. El éxito de los inhibidores beta-adrenérgicos disminuyendo la presión arterial elevada se explica en parte por la inhibición de la liberación de renina.

1.3.3.3. Señales humorales y hormonales :

Las células yuxtaglomerulares responden ante un gran número de señales hormonales e iónicas del ambiente , además de a las catecolaminas.

La somatostatina interfiere la liberación de renina mediante señales neurogénicas (Brosihan y Ferrario, 1983). El péptido intestinal vasoactivo (VIP) estimula la liberación de renina (Porter y cols, 1983). La hormona paratiroidea (PTH) y el glucagón estimulan la liberación de renina, mientras que la AII y el factor atrial natriurético (ANF) inhiben la secreción de renina (Laragh, 1985) .Aunque la significación de la PTH, el glucagón y el VIP es aún incierta y la del ANF puede reflejar bien una acción directa sobre la mácula densa y cels yuxtaglomerulares o bien una consecuencia directa de su respuesta natriurética (Cottier y cols, 1988), la de la AII es claramente importante. Esta última representa un típico

mecanismo de retroalimentación, que puede ser interrumpido por los bloqueantes del ECA: la inhibición de la formación de AII disminuye la presión arterial y se acompaña de un marcado aumento de la liberación de renina. Pero más importante aún es que las células yuxtaglomerulares responden también a influencias iónicas.

La mácula densa es un conjunto de células especializadas localizadas en la conjunción del final del asa de Henle y el comienzo del túbulo distal. Se propone que la mácula densa detecta disminuciones en la carga de sodio en la parte ascendente del asa de Henle y envía señales a las células yuxtaglomerulares para incrementar la liberación de renina (Skott y Briggs, 1987). Esto supone que la tasa de excreción de renina está inversamente relacionada con la carga de cloruro sódico en la mácula densa.

El mecanismo por el cual ocurre esta interacción permanece incierto, pero puede ser debido a influencias supresoras de señales provenientes de las células de la mácula densa. Las arteriolas aferentes aisladas con segmentos de mácula densa adheridos producen una menor cantidad de renina que las arteriolas sin mácula densa, según demostraron Itoh y cols en 1985.

También la estimulación-secreción de renina muestra una influencia iónica. En el caso del calcio, la secreción de renina es estimulada por la disminución de calcio intracelular, mientras que un aumento del calcio intracelular la inhibe (Fray y cols, 1987). El magnesio tiene el efecto inverso.

Al contrario que en la mayoría de las células endocrinas, las células yuxtaglomerulares parecen liberar renina cuando se hiperpolarizan, o bien cuando disminuye el calcio intracelular por acción de las catecolaminas o la PTH, efecto antagonizado por ouabaína, una concentración depolarizante de K, la ADH, la angiotensina y la noradrenalina.

La secreción de renina es estimulada por AMPc, inhibidores de la fosfodiesterasa y por varios factores como la PTH, glucagón y agonistas del receptor beta-adrenérgico, que activan la adenilato ciclasa y elevan los niveles intracelulares de AMPc. La prostaciclina y las prostaglandinas actúan como potentes estimuladores de la liberación de renina (PGI₂ parece ser más potente que PGE₂), y a la inversa, inhibidores de la ciclo-oxigenasa (AINEs) reducen la secreción de renina.

1.4. Enzima convertidor de la angiotensina I:

El enzima convertidor de la angiotensina I (ECA), también llamado Kininasa II, es una dipeptidil carboxipeptidasa. Se trata de una glucoproteína que en su mayor parte se encuentra unida a membrana y cuyo dominio extracelular, el extremo amino terminal, contiene los dos sitios activos enzimáticos (Johnston, 1992); si bien también circula libre en plasma en una forma soluble tras la ruptura proteolítica de su anclaje a la membrana celular.

El gen de la ECA codifica dos isoenzimas, el isoenzima somático y el isoenzima germinal o testicular.

El *isoenzima somático* se encuentra localizado principalmente en la superficie de las células del endotelio vascular del pulmón (Ryan y Ryan, 1980), pero también ha sido aislado en otros numerosos tejidos humanos, como el tracto urogenital, la vena safena, el bazo y el tracto intestinal. El hecho de que la principal ubicación de la ECA sea el endotelio vascular del pulmón, junto con la existencia de una importante conversión de AI a AII durante un único paso a través del pulmón (Igic y cols, 1972) indican que el pulmón es el lugar más importante de conversión de la AI circulante a la AII. Es más, en el resto de tejidos, no se ha comprobado que la ECA participe en dicha conversión (Van Sande y cols, 1985); excepto el riñón, el hígado y el lecho vascular sistémico que pueden servir como lugares accesorios de transformación de angiotensina.

El *isoenzima germinal o testicular* se expresa exclusivamente en células espermatozógenas postmeióticas y en el esperma, y tiene una función primordial en la fertilidad, proviniendo su conocimiento principalmente de la investigación con ratones (Ramaraj y cols, 1998).

La secuencia de su cDNA en humanos fue determinada por Ehlers y cols en 1989 y tiene su propio promotor en el intrón 12 (Howard y cols, 1990).

La ECA rompe el enlace peptídico entre la Phe-8 y la His-9, eliminando el dipéptido carboxiterminal His-9-Leu-10 y generando AII. La ECA es un enzima plurifuncional, capaz no sólo de convertir AI en AII, sino que también inactiva la angiotensina-(1-7) y la bradicinina, un potente transmisor que estimula la liberación de óxido nítrico y prostanoïdes vasodilatadores tales como la prostaciclina (Stock y cols, 1995). Interviniendo estas tres sustancias no sólo en la en el control del tono vascular sino también en la proliferación de las células del músculo liso.

Según estudios en animales (Esther y cols, 1997) es la ECA unida a tejidos la esencial para el control de la presión arterial y la estructura y función del riñón.

La ECA circulante en plasma es probablemente sintetizada en el endotelio vascular mediante rotura de su unión a membrana; y sus niveles, que poseen una escasa variabilidad dentro del mismo individuo, tienen una gran variabilidad interindividual (de hasta 5 veces), debida en el 50 % a polimorfismos en el gen de la ECA. Además dichos niveles de ECA en plasma, según el estudio de Cambien y cols (1988), no están correlacionados con la edad, altura, peso o presión arterial en adultos, pero sí en la población más joven, donde la relación es inversa y con la edad.

El ECA no parece ser un factor limitante en la generación de AII en condiciones fisiológicas. Sus principales sustratos son la AI y la bradicinina, y en menor medida la angiotensina-(1-7), teniendo muy baja especificidad de sustrato, requiriendo sólo un tripéptido con un carboxilo

terminal libre y un L-aminoácido intermediario (excepto la prolina que evita la hidrólisis).

La *actividad* del ECA puede ser alterada por cambios en la oxigenación, en el balance de sodio y en la hemodinámica pulmonar, pero también por los estrógenos, que producen una disminución de las concentraciones de ARNm de la ECA (Gallager y cols, 1999) y de la actividad de la ECA *in vivo*, reflejada por la razón AII/AI (Brosnihan y cols, 1999), hecho que ayuda a comprender el efecto protector cardiovascular de los estrógenos en la mujer y el beneficio de la terapia hormonal sustitutiva en el climaterio.

1.4.1. Polimorfismos de la ECA y su relación con varias patologías:

El gen de la ECA se encuentra localizado en la posición 17q23 según varios estudios (Mattei y cols, 1989; Jeunemaitre y cols, 1992).

El polimorfismo más importante de este gen consiste en la inserción o delección de un fragmento de 287 pares de bases en el intrón 16 de dicho gen, y es conocido como el polimorfismo I/D (I de Inserción y D de Delección). Dicho polimorfismo es el determinado en este estudio con respecto a la ECA.

La frecuencia del alelo D es del 60% (70% en afroamericanos) y la del alelo I del 40%. En cuanto al genotipo DD es del 27 %.

Como hemos reseñado más arriba, el polimorfismo ECA I/D explica el 50% de la variabilidad interindividual en los niveles de ECA plasmática (Cambien y cols, 1988; Tiret y cols, 1992), siendo los niveles mayores en el genotipo DD que en el ID, y a su vez en el ID mayores que en el II (Rigat y cols, 1990).

Pero a su vez influye también en los niveles de otras sustancias, determinando el polimorfismo DD una disminución de la bradicinina (con aumento de su metabolito inactivo, la bradicinina 1-5) y aumento del

inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1)(Murphey y cols, 2000; Kim y cols, 1997).

1.4.1.1. Relación con la HTA:

En estudios con ratas se demostró correlación del locus del ECA con la presión arterial elevada, por lo que se pensó en su participación en la HTA esencial en humanos, sin embargo dicha relación no ha sido demostrada (Berge y Berg, 1994; Arbustini y cols, 1995; Mondorf y cols, 1998).

Tan sólo un estudio (Julier et al, 1997) encontró evidencias de relación entre hipertensión familiar esencial y dos marcadores microsatélites localizados en el cromosoma 17, si bien éstos se encuentran ubicados proximalmente al gen de la ECA.

Sin embargo Olivieri y cols (1999) sí encuentran el genotipo DD más frecuente en la estenosis ateromatosa de la arteria renal, y Giner y cols (2000) el genotipo II en sujetos con HTA sal-sensible.

1.4.1.2. Relación con la HVI:

Schunkert y cols (1994) encontraron una asociación entre la hipertrofia ventricular izquierda (HVI) valorada electrocardiográficamente y el genotipo DD de la ECA, si bien es verdad que Lindpaintner y cols (1996) no encuentran relación entre la masa ventricular izquierda electrocardiográfica y la HVI). Dicha asociación era más fuerte en varones y en normotensos. En el mismo sentido Montgomery y cols (1997) encontraron en varones un aumento del crecimiento ventricular izquierdo inducido por el ejercicio en el genotipo DD de la ECA.

1.4.1.3. Relación con la patología coronaria. IAM:

Son muchos los estudios que correlacionan el polimorfismo I/D con la patología coronaria:

Así, dicho polimorfismo puede ser un importante marcador genético de riesgo de IAM precoz familiar según varios estudios (Bohn et al, 1993), siendo el genotipo DD el de riesgo y siendo la asociación más fuerte en individuos de bajo riesgo cardiovascular (Cambien et al, 1992) sobre todo cuando el sujeto es además homocigótico para el alelo C1166 del gen del receptor de la AII (Tiret y cols, 1994).

Esta mayor asociación con sujetos de bajo riesgo podría deberse a que el aumento de riesgo del genotipo DD se produzca en los pacientes con espasmo coronario como sugieren los hallazgos de Oike et al (1995).

En el mismo sentido el estudio de Cambien y cols (1994) considera los niveles de ECA como un factor de riesgo independiente para el IAM.

Además de para el IAM, el alelo D es un fuerte factor de riesgo para el desarrollo de *aterosclerosis* según los estudios de Arbustini y cols (1995) y de Rice y cols (1999), que lo relacionan con el genotipo CC-DD), pero no para el de Jeunemaitre y cols (1997), que no encuentra dicha relación. Sin embargo, otros estudios como el de Lindpaintner et al (1995) y el de Winkelmann et al (1996), no encontraron relación entre el polimorfismo I/D y la patología isquémica cardíaca o el IAM.

En sujetos con diabetes mellitus no insulín dependiente el alelo D es un fuerte factor de riesgo independiente para el desarrollo de patología coronaria de inicio precoz (Ruiz et al, 1994).

Además se ha evidenciado un aumento de reestenosis tras angioplastia percutánea y tras “stent” en el genotipo DD (Ohishi et al, 1993; Amant et al, 1997).

1.4.1.4. Relación con otras patologías:

El polimorfismo de la ECA ha sido estudiado en relación con una variada gama de enfermedades y circunstancias: habiéndose relacionado con el aumento de progresión a insuficiencia renal crónica, proteinuria o susceptibilidad, en el seno de la nefropatía IgA (Yoshida et al, 1995), la

púrpura de Schonlein-Henoch (Yoshioka et al, 1998) o la nefropatía diabética (Marre et al, 1997).

Habiéndose demostrado el efecto antiproteínúrico en nefrópatas del tratamiento con IECAs (Kitamura y cols, 1996).

En el sentido contrario al habitual, Kehoe et al (1999), han encontrado al genotipo DD como protector frente a la Enfermedad de Alzheimer.

1.5. Angiotensina II. Células diana y funciones fisiológicas:

La AII fue conocida primeramente como uno de los agentes vasoconstrictores más potentes que actúan sobre las células musculares lisas.

Entre otras muchas funciones fisiológicas la AII es responsable de la vasoconstricción sistémica, de la liberación adrenal de aldosterona, secreción de vasopresina por la hipófisis y de la reabsorción renal de sodio. Participa en la regulación de la presión sanguínea, facilitando el restablecimiento inmediato de ésta en situaciones de emergencia (caída brusca de volumen sanguíneo tras hemorragia o desplazamiento tras ortostatismo) o manteniendo la presión sanguínea en situaciones más crónicas, como la deplección de sodio.

Por el contrario, se sabe que la angiotensina juega un papel crucial en muchas formas de hipertensión, como se evidencia por la disminución de la presión sanguínea por los agentes que reducen la liberación de renina (e.g. antagonistas de los beta-adrenoreceptores) o más específicamente agentes que antagonizan su efecto en las células diana (saralasin) o bloquean su formación (inhibidores del ECA). El efecto vasoconstrictor inmediato de la angiotensina es seguido por su efecto sobre la regulación del volumen sanguíneo. Este último se debe al favorecimiento de la reabsorción de sodio en los túbulos distales, bien directamente o, de forma más importante, indirectamente por su acción estimuladora en la zona glomerulosa de glándula adrenal. La angiotensina es el regulador más

importante de la secreción de aldosterona. Una infusión prolongada de angiotensina induce en el humano una hipertensión con un balance positivo de sodio debido al hiperaldosteronismo secundario.

La conservación del volumen esta además asegurada por el papel intrarrenal del SRA. La angiotensina liberada localmente constriñe la arteriola aferente y el mesangio glomerular, además de su acción directa en los túbulos distales. Por ello, la angiotensina juega un papel en el balance tubulo-glomerular, desvía el flujo sanguíneo a la corteza interna y a la médula, reduce el flujo renal total y la filtración glomerular. Bajo las mismas circunstancias (e.g. shock), una formación prolongada de angiotensina llevaría a un fallo renal, aunque no sea un mecanismo de seguridad para preservar la función renal. Ésta se asegura por la estimulación vasodilatadora de las prostaglandinas (principalmente PGE₂), que restablecen el flujo sanguíneo y la filtración glomerular .

Cuando la presión de perfusión renal se reduce, la fracción residual de filtración glomerular puede ser principal o exclusivamente mantenida por la acción constrictiva de la angiotensina en la arteriola aferente. Un balance adecuado entre el SRA-Aldosterona y el sistema calicreína-quinina-prostaglandina es un pre-requisito para el mantenimiento de un tono vascular ideal y el balance de sodio en condiciones fisiopatológicas . El péptido atrial natriurético puede reperesentar un sistema adicional responsable para una regulación fina del equilibrio homeostático vasoconstrucción-volumen gracias a sus efectos natriurético y vasodilatador y su capacidad de inhibir la liberación de renina y la secreción de aldosterona (Cottier y cols, 1988).

Además de esta acción sobre las células del músculo liso de la arteriola, células yuxttaglomerulares y células de la zona glomerulosa de la glándula adrenal, la angiotensina actúa en células relacionadas: células del músculo liso del útero, induciendo la contracción, y en las células de zona fasciculada de la glándula adrenal, induciendo la biosíntesis de cortisol.

La angiotensina tiene otras acciones relacionadas con la homeostasis de la presión sanguínea. Induce la descarga simpática y la liberación de catecolaminas de la médula adrenal. También suprime el reflejo inhibitorio de la contracción cardíaca mediado por los baroreceptores durante la hipertensión sin afectar a la taquicardia producida en la hipotensión. Esto podría estar relacionado con el hecho de que la angiotensina excita a las neuronas simpáticas y suprime las neuronas motoras vagales cardíacas, y podría explicar por qué la disminución de la presión sanguínea producida por los inhibidores del ECA no se acompaña de una taquicardia refleja.

Secundariamente, se ha demostrado una actividad presora central, mediada por los receptores de la angiotensina localizados en el hipotálamo anterior y en la región AV3V, incluyendo el órgano vasculoso de la lámina terminalis y el órgano subfornical. Todas estas localizaciones carecen de barrera hemato-encefálica, por lo que la angiotensina circulante puede alcanzarlas, además de la angiotensina generada en el propio cerebro. Es por esto que el SRA juega un papel en la regulación central de la presión sanguínea (Ganong, 1984).

Se ha demostrado que la angiotensina aumenta el apetito de sodio y la sed, y promueve la liberación de vasopresina (ADH), actuando en el órgano subfornical y existiendo una relación neurofisiológica entre la regulación hormonal del agua, asegurada por la vasopresina, y la de sodio ejercida por el SRA- aldosterona. De nuevo, parece que la angiotensina circulante, así como el SRA, juegan un importante papel cerebral .

Otra acción central de la angiotensina, de importancia fisiológica incierta, reside en su capacidad de estimular directamente, *in vitro* ,la liberación de ACTH de las células corticotrofas de la glándula pituitaria anterior.

Finalmente, los receptores de angiotensina hepáticos actúan en la glucogenolisis y la gluconeogénesis.

1.6. Angiotensinas y péptidos derivados de la angiotensina II:

1.6.1. Angiotensinas

La angiotensina II es rápidamente metabolizada por varias enzimas proteolíticas no específicas llamadas angiotensinas (Ledingham y Leary, 1974). Habiéndose descrito tres tipos de actividad angiotensinasa:

1) *Aminopeptidasa o angiotensinasa A*. Actúa sobre el extremo NH₂-terminal de la molécula de AII.

2) *Endopeptidasa o angiotensinasa B*. Actúa sobre la unión Tyr⁴-Ile⁵ para formar dos tetrapéptidos.

3) *Carboxipeptidasa o angiotensinasa C*. Actúa sobre el extremo COOH-terminal de la molécula.

1.6.2. Péptidos derivados de la angiotensina II

La vida media de la AII es muy corta (menos de 1 minuto) debido a la degradación por las angiotensinas , y la mayoría de la AII desaparece en un único paso a través de los lechos vasculares en varias regiones y órganos de la circulación sistémica. También se ha comprobado que aproximadamente, el 90% de la AII liberada sistémicamente es degradada en un único paso a través del riñón (Rosivall y cols, 1987).

La vida media de la AII *in vivo* es considerablemente más corta que la vida media en sangre o plasma *in vitro*, esto implica que las

angiotensinasas del tejido juegan un papel predominante en la degradación de la AII *in vivo* (Ledinham y Leary , 1974).

Recientemente, se ha demostrado que algunos péptidos derivados de la AII como la angiotensina III, angiotensina-(1-7), angiotensina-(1-5) y angiotensina-(3-8) (Ang IV), pueden mediar acciones biológicas del SRA (Brosnihan y cols, 1988; Campagnole-Santos y cols, 1992).

1.6.2.1. Angiotensina III

La angiotensinasa A libera el residuo de ácido aspártico del extremo NH₂-terminal de la AII para formar angiotensina III (des-Asp¹-AII)

La angiotensina III se encuentra en muy bajas concentraciones en la circulación en humanos, pero en rata, los niveles son mucho más altos. La angiotensina III presenta una alta potencia para estimular la liberación de aldosterona a partir de la glándula adrenal por el contrario, su potencia presora es relativamente baja comparada con la de AII (25%).

1.6.2.2. Angiotensina-(1-7):

La formación de Angiotensina-(1-7) tiene dos posibles vías de origen, en una la *angiotensinasa C* libera el residuo de fenilalanina del extremo COOH-terminal de la molécula de AII, dando lugar a la angiotensina-(1-7); pero la vía más importante es la que procede directamente desde la AI, sin pasar por AII, mediante la participación de tres enzimas, la *endopeptidasa neutra 24.11 (Nepilisin)*, la *endopeptidasa neutra 24.15* y la *prolil-endopeptidasa 24.26*. Dos de ellas, la nepilisin y la endopeptidasa 24.15, también contribuyen a la degradación de la bradicinina y del péptido atrial natriurético (Welches y cols, 1993; Ferrario y cols, 1998).

Además la Angiotensina-(1-7) es un importante sustrato de la ECA, que la degrada a *Angiotensina I-5* (Chappell y cols, 1998), existiendo además otros péptidos relacionados con la angiotensina(A)-(1-7), como la A-(2-7), A-(3-7), A-(4-7), A-(1-6) y la A-(1-5).

Comparándola con la angiotensina II, la Angiotensina-(1-7) tiene efectos iguales (estimula la liberación de ADH y prostanoides) y contrarios (no produce sed, VSC, HTA, ni liberación de Aldosterona), favoreciendo en conjunto una *disminución de la presión sanguínea*, por lo que se considera juega un papel importante en el control de la presión y por tanto en la HTA esencial, siendo por ello uno de los parámetros determinados en este estudio (Ferrario y cols, 1991; Chappell y cols, 1998).

La Ang-(1-7) produce efectos biológicos importantes y muy selectivos, incluyendo la liberación de vasopresina *in vitro* (Schiavone y cols, 1988) y efectos cardiovasculares similares a los producidos por la AII cuando es microinyectada dentro de la médula dorsal-medial o de la médula ventrolateral (Campagnole-Santos y cols, 1989; Silva y cols, 1993).

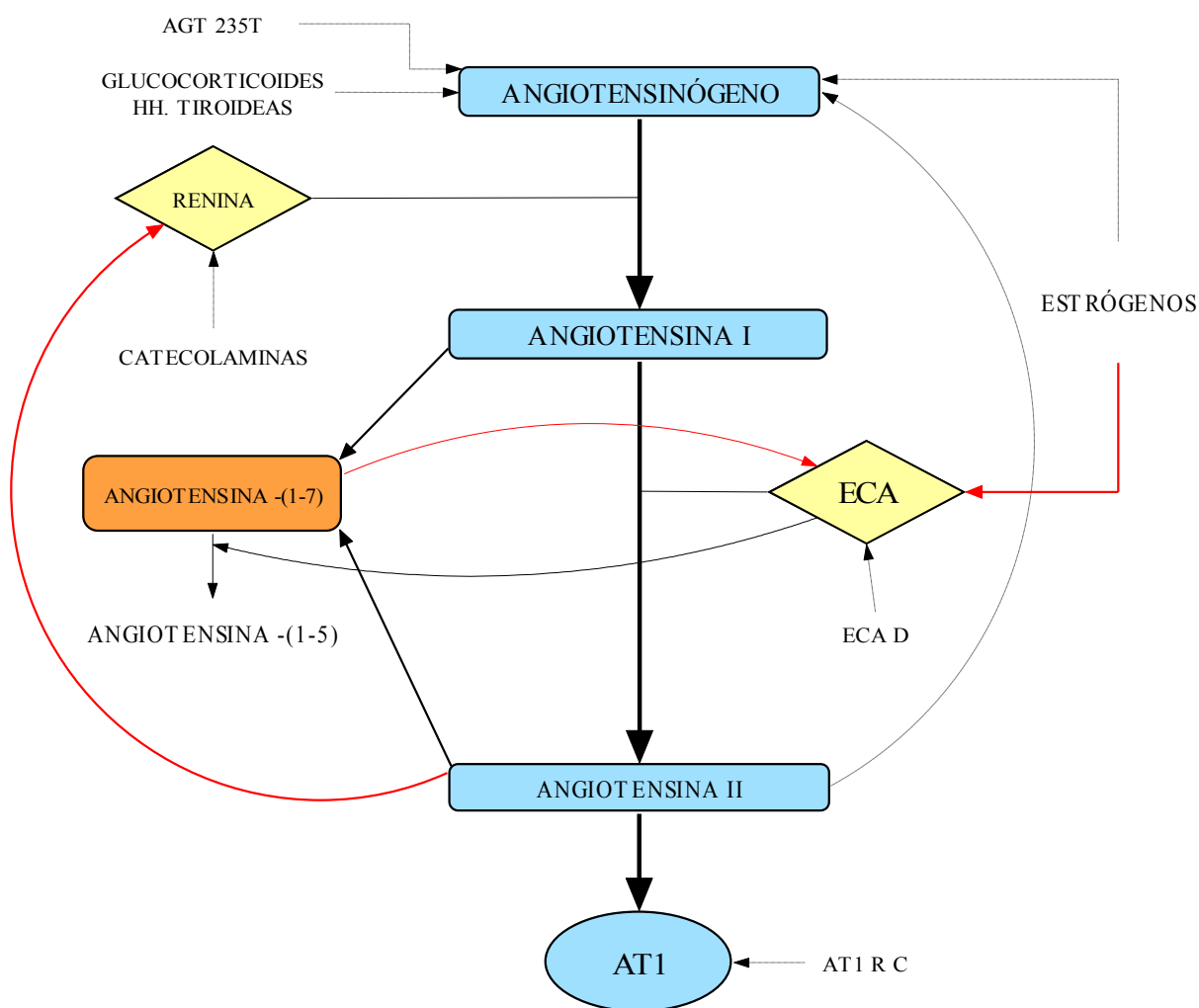
Sin embargo, la Ang-(1-7) carece de efecto presor tras administrarse periférica o intracerebro-ventricularmente (Campagnole-Santos y cols, 1992). Así es que su función, a un nivel bioquímico, es la estimulación de la síntesis y liberación de prostaglandinas vasodilatadoras y de óxido nítrico mientras que aumentan las acciones metabólicas de la bradicinina (Marcic y cols, 1999; Deddish y cols, 1998), además de alterar la reabsorción tubular de sodio y bicarbonato, mientras que a un nivel fisiológico, disminuye la actividad Na-K ATP-asa, induce la diuresis (Santos y Baracho, 1992), y ejercer un efecto *vasodilatador* (aparentemente nunca de forma aislada), bien bloqueando el efecto vasoconstrictor de la AII (Ueda y cols, 2000), bien aumentando el efecto vasodilatador de la bradicinina (Li y cols, 1997; Paula y cols, 1999) (efecto únicamente contradicho por los resultados de Davie y cols, 1999, en cardiópatas en tratamiento con IECAs), o bien inhibiendo la ECA (Roks y cols, 1999).

Además de estos efectos, experimentos recientes demuestran que la angiotensina-(1-7) tiene una acción antiproliferativa sobre las células musculares lisas vasculares, inhibiendo las acciones tróficas de la AII y disminuyendo la expresión de los efectos mitogénicos del suero normal y del factor de crecimiento derivado plaquetario (Tallant y cols, 1999).

La ejecución de todos estos efectos parece estar mediada, según indican los datos disponibles, por un subtipo especial de receptor no-AT1-AT2, específico de la Angiotensina-(1-7) (Regitz-Zagrosek y cols, 1996; Nickenig y cols, 1997), que no activa a la fosfolipasa C ni aumenta los niveles intracelulares de calcio (Tallant y cols, 1991).

Los niveles de la A-(1-7) se ha demostrado aumentan en la terapia con inhibidores de la ECA (Luque y cols, 1996; Santos y cols, 1992; Kohara y cols, 1993), pudiendo deberse, bien a un aumento en su producción (por un aumento de AI), o bien, a una disminución en su degradación, como apuntan Chappell y cols, (1998 y 2000).

ESQUEMA 2.: Eje Renina-Angiotensina Modulación y retroalimentación



Finalmente en estudios con sujetos normotensos e hipertensos esenciales, se ha demostrado la relación inversa de la concentración urinaria de A-(1-7) con la presión arterial sistólica, diastólica y media (Ferrario y cols, 1998).

1.6.2.3. Angiotensina-(1-5):

Procede de la degradación de la A-(1-7) por la acción de la ECA (Chappell y cols, 1998), y a su vez también inhibe la actividad plasmática de la ECA, pero no tiene efecto en la contractilidad arterial (Roks y cols, 1999).

1.6.2.4. Angiotensina IV:

Cuando la AII pierde los dos primeros residuos de aminoácidos del extremo NH₂-terminal (Asp¹ y Arg²) da lugar a la angiotensina IV o angiotensina-(3-8). Entre las respuestas fisiológicas mediadas por la angiotensina-(3-8) están las de mediar alteraciones del flujo sanguíneo cerebral y renal, procesos cognitivos (Wright y cols, 1993) y regulación del crecimiento de componentes dentro del sistema cardiovascular (Baker y Aceto, 1990).

La infusión de angiotensina IV dentro de la arteria renal produce un aumento del fluido sanguíneo cortical (Coleman y cols, 1992).

1.7. Receptores de la angiotensina

Para comprender los mecanismos moleculares responsables de la gran diversidad de efectos de la angiotensina II es necesario un estudio detallado de sus receptores, moléculas que unen angiotensina II y traducen sus efectos fisiológicos.

1.7.1. Mecanismos celulares de acción de la angiotensina II

Los receptores de AII presentan un patrón común con la estructura de receptores proteicos, con 7 dominios transmembrana y acoplados a proteína G. Este patrón es común al de la superfamilia de receptores que incluye los receptores de aminas biógenas, fotopigmentos visuales, receptores de

hormonas glicoproteicas, receptores de autacoides derivados de lípidos y receptores de péptidos neurales. Esta convergencia de tantos tipos diferentes de receptores para mediadores químicos tan distintos se debe a que todos comparten un mecanismo común, la transducción de la estimulación del ligando mediante la activación de proteínas triméricas, que unen GTP y que actúan como intermediarios de los efectores intracelulares.

Se ha demostrado la existencia de receptores específicos de alta afinidad para angiotensina II en músculo liso vascular, cortex y médula adrenal, corazón, cerebro, hígado, útero y riñón (Catt y Aguilera, 1980; Smith, 1986; Douglas, 1987).

Tanto el número como la afinidad de los receptores están modulados por cationes divalentes y monovalentes (Douglas, 1987). Cationes divalentes, como el magnesio y el calcio, aumentan la concentración de los receptores de AII, mientras que los cationes monovalentes, como el sodio y el potasio, aumentan la afinidad del receptor por el péptido.

El número de receptores es también modulado por la concentración de angiotensina II. El aumento de la concentración de AII disminuye (regulación a la baja) el número de receptores en el músculo liso vascular y en las células mesangiales, mientras que la disminución de los niveles de AII aumenta (regulación a la alta) el número de receptores en estos tejidos. Por el contrario, el aumento de los niveles de AII aumenta (regulación a la alta) el número de receptores de AII en la glomerulosa adrenal y en el túbulo proximal, y a la inversa (Douglas, 1987).

La alteración del número de receptores de AII modula la sensibilidad o correspondencia de los tejidos diana a la AII.

La interacción de la angiotensina II con su receptor acoplado a proteína G da como resultado la activación de la fosfodiesterasa fosfolipasa C. La fosfolipasa C degrada el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) unido a la membrana para dar lugar a inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol. El inositoltrifosfato se une a receptores específicos en los calciosomas (almacenes intracelulares de calcio), liberando calcio y, por lo tanto, aumentando el nivel

de calcio libre citosólico. En presencia de estos elevados niveles de calcio intracelular, el diacilglicerol activa a distintas proteínas quinasas, entre ellas a la proteína quinasa C (Griendling y cols, 1989; Tsuda y cols, 1993).

La AII induce la despolarización celular por inhibición del transporte de potasio (Brauneis y cols, 1991), lo cual parece estar mediado por la proteína quinasa C y conduce a la entrada de calcio a través de los canales T.

El aumento en la entrada de calcio extracelular y la movilización del calcio almacenado intracelularmente (mediado por el IP_3) da como resultado el aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, lo cual induce la contracción del músculo liso vascular y de las células mesangiales glomerulares (Smith, 1986; Douglas, 1987; Kremer y cols, 1989; Kocsis y cols, 1995) y también estimula la biosíntesis y secreción de aldosterona a través del diacilglicerol que activa la translocación de la proteína quinasa C en las células de la zona glomerulosa (Lang y cols, 1991).

La AII activa a la fosfolipasa D en células del músculo liso vascular (Lassègue y cols, 1991) y esta activación da como resultado una prolongada liberación de ácido fosfatídico y colina a partir de la fosfatidilcolina. El ácido fosfatídico es convertido a diacilglicerol por una fosfolipasa, resultando una sustancial acumulación de diacilglicerol (Lassègue y cols, 1993) y por lo tanto, se prolonga la activación de la proteína quinasa C.

Varios estudios han indicado que la AII puede también activar un canal de cloro en las células mesangiales e inducir despolarización. La despolarización producida en las células mesangiales por la AII a través de la activación de los canales de cloro puede ocurrir por mecanismos Ca^{2+} -dependientes e independientes (Kremer y cols, 1989).

En células del túbulo proximal, la AII estimula la liberación del ácido araquidónico a través de la activación de la fosfolipasa A_2 (Douglas y cols, 1987; Morduchowicz y cols, 1991) y por lo tanto, se observa un incremento de la producción de prostaglandinas (Douglas, 1987). Este aumento en la producción de prostaglandinas, por ejemplo PGE_2 y PGI_2 , puede modular la

acción constrictora de la angiotensina II sobre el músculo liso vascular y las células mesangiales glomerulares (Schlondorff y cols, 1987).

Y también, el aumento en la producción de PGE₂ mediado por AII puede modular la función de transporte en las células tubulares.

Otro mecanismo de acción es el encontrado en el hígado, riñón, musculatura lisa aórtica y zona glomerulosa de la adrenal, donde la estimulación por la AII inactiva la adenilato ciclasa, presumiblemente mediante la interacción con una proteína G inhibidora (G_i), y por lo tanto, disminuye la generación del segundo mensajero AMPc (Pobiner y cols, 1985), mientras que los guanilnucleótidos modulan la unión de la AII (Capponi y cols, 1985).

Ya que la ACTH induce la esteroidogénesis en la zona glomerulosa gracias a la activación de la adenilato ciclasa y la subsiguiente formación de AMPc, está claro que estos dos principales sistemas de mensajeros intracelulares están implicados en la estimulación de la biosíntesis de aldosterona y que ambos interactúan.

La AII inhibe la producción de AMPc también en las células glomerulares y células del túbulo proximal (Douglas, 1987). Como el AMPc induce la relajación de las células mesangiales e inhibe el volumen de absorción por el túbulo proximal, los efectos de la AII sobre la contracción de la célula mesangial glomerular y la reabsorción tubular proximal pueden ser mediados, al menos en parte, por la inhibición de la adenilato ciclasa y consiguiente reducción de los niveles de AMPc (Douglas y cols, 1990).

Los distintos mecanismos de acción de la AII sobre sus células diana están representados en la fig. 4.

1.7.2. Heterogeneidad del receptor de angiotensina II

Evidencias tanto fisiológicas como farmacológicas apoyaban en un principio la teoría de la diversidad en la población de receptores.

Posteriormente, mediante estudios *in vitro* usando técnicas de unión de radioligandos con [¹²⁵I] Angiotensina II, también se demostraba la existencia de más de un tipo de receptor de AII. La heterogeneidad en la población del receptor de la AII fue finalmente demostrada con el desarrollo de antagonistas subtipo-específicos no peptídicos del receptor.

Los primeros antagonistas selectivos (DuP 89 y WL 19), desarrollados por DuPont y Warner-Lambert, presentaban desplazamiento bifásico en la unión de [¹²⁵I]angiotensina II en adrenales de ratas, tejido en el cual las curvas de desplazamiento con agonistas revelan un sólo sitio de unión (Bouscarel y cols, 1988).

Cada sitio identificado por estos antagonistas era responsable de, aproximadamente, el 50% de la capacidad total de unión: uno liga preferente-

mente DuP 89 (o losartan, la sal potásica de DuP 89, también llamado DuP 753) (Chiu y cols, 1989; Chang y cols, 1992; Viswanathan y cols, 1991; Tsutsumi y Saavedra, 1991; Barnes y cols, 1993) mientras que el otro une WL 19 (Chang y cols, 1991).

Estos resultados fueron rápidamente confirmados en otros tejidos, como médula y cortex adrenal, glomerulosa adrenal de rata y humano y en útero de rata. Por el contrario, en la glándula adrenal de conejo, hígado y músculo liso vascular aparece un sólo sitio de unión, éste es sensible a DuP 89, pero no a WL 19. Unos pocos tejidos (útero y células PC12W) expresan exclusivamente sitios de unión sensibles a WL 19.

Desde la aparición del DuP 89 y del WL 19 se han desarrollado una variedad de inhibidores del receptor de AII, tanto inhibidores no peptídicos como péptidos modificados. Los antagonistas más ampliamente utilizados son el losartan (DuP 753) y PD123177 (Chiu y cols, 1989; Viswanathan y cols, 1991; Barnes y cols, 1993). Otro compuesto utilizado es el CGP-42112A (derivado peptídico modificado del losartan) (Tsutsumi y Saavedra, 1991), este compuesto se une preferentemente a los sitios de unión sensibles a WL 19.

1.7.3. Clasificación de los subtipos

Los estudios realizados con los anteriores antagonistas han permitido realizar la clasificación de los subtipos de receptores de la AII (Bumpus y cols, 1991).

Los dos tipos más importantes de receptores de la AII son llamados AT_1 y AT_2 . Ambos sitios de unión tienen alta afinidad de unión para AI y AII y tienen una afinidad similar para $\text{sar}^1\text{-ile}^8\text{-angII}$ y $\text{sar}^1\text{-ala}^8\text{-angII}$. Los receptores AT_1 unen selectivamente bifenilimidazoles (por ejemplo, losartan), mientras que los receptores AT_2 unen preferentemente tetrahidroimidazopiridinas, tales como PD123177 (Bumpus y cols, 1991).

Los receptores AT_1 unen AII con mayor afinidad que angiotensina III, están acoplados positivamente a las fosfolipasas C, D y A_2 , y están negativamente acoplados a la adenilato ciclasa. Los receptores AT_2 unen angiotensina II y angiotensina III con igual afinidad, pero el efector o efectores a los que están acoplados aún no están bien definidos.

Estos dos sitios de unión pueden ser diferenciados también por su sensibilidad a los agentes reductores de grupos sulfidrilos como el ditioneitol. Estudios realizados utilizando antagonistas no peptídicos para identificar los subtipos de receptor han mostrado que la afinidad y la capacidad de unión de los receptores AT_1 son reducidas por el ditioneitol, mientras que la afinidad agonista de los sitios de unión AT_2 es incrementada por este agente reductor (Chiu y cols, 1989; Speth y Kim, 1990).

La sensibilidad a GTP y a sus análogos no hidrolizables ha sido también utilizada para diferenciar los receptores AT_1 de los receptores AT_2 . Como ocurre con otros receptores acoplados a proteína G, la unión agonista a los receptores AT_1 es susceptible a GTP (Dudley y cols, 1990; Viswanathan y cols, 1991).

Así, en tejidos que sólo contienen receptores AT_1 , como hígado de rata y células de músculo liso vascular aórtico de rata, la afinidad de unión para

AII es disminuida en presencia de Gpp(NH)p o GTPγS. Por el contrario, en muchos tejidos que contienen receptores AT₂, como las células PC12W, la afinidad para la angiotensina II no está afectada por GTP o sus análogos (Viswanathan y cols, 1991; Dudley y Summerfelt, 1993).

Los anteriores criterios de clasificación de los dos subtipos del receptor de la AII se encuentran detallados en la tabla I.

En cuanto a sus funciones estudios recientes sugieren que los efectos del AT₂ contrarrestan a los del AT₁ (Chung y cols, 1998).

Además de estos dos tipos de receptores principales, representados por AT₁ y AT₂, otros pueden ser distinguidos sobre bases farmacológicas (De Gasparo y cols, 1995) e incluso han sido identificados receptores para los cuales son aún desconocidas sus funciones fisiológicas. Un ejemplo de receptor atípico es el encontrado en células Neuro-2A de neuroblastoma de ratón diferenciadas con PGE₁ (Chaki e Inagami, 1993), este receptor tiene alta afinidad por AII, baja afinidad por AIII, y es insensible a los antagonistas de AT₁ y AT₂. Otros receptores atípicos se han encontrado en el ovocito de *Xenopus* (Hong y cols, 1990), en membrana corioalantoidea de embrión de pollo (Le Noble y cols, 1993), y en ciertas especies de *Mycoplasmas* (Bergwitz y cols, 1991).

En células adrenocorticales de pavo se ha demostrado que las elevaciones intracitoplasmáticas de calcio y la producción de aldosterona son eventos regulados por un receptor atípico de AII (Kocsis y cols, 1995).

Finalmente, el receptor codificado por el protooncogen mas posee propiedades farmacológicas no usuales, por ejemplo, responde a angiotensinas de mamíferos en un amplio rango AIII >> AII >AI y no es bloqueado por losartan ni por PD123177 (Jackson y cols, 1988). Sin embargo, trabajos posteriores sugieren que la proteína codificada por el oncogen mas no es un verdadero receptor de angiotensina, sino que sirve para modular la actividad de la angiotensina II (Monnot y cols, 1991).

Existen evidencias de la existencia de un receptor específico de Ang-(1-7) que media algunas de sus acciones (Campagnole-Santos y cols, 1992).

Esta es particularmente interesante debido a su selectividad, probablemente resultante de la ausencia de la Phe del extremo C-terminal (Ferrario y cols, 1990).

Se ha demostrado que la Ang-(1-7) carece de efecto presor, dipsogénico y de efectos miotrópicos directos (Ferrario y cols, 1990). Estas observaciones indican que la presencia de Phe en el extremo C-terminal es crítica para la activación del receptor AT₁. Las acciones de la Ang-(1-7) podrían estar mediadas por una subclase del receptor AT₂ u otro subtipo de receptor específico de Ang-(1-7) (Campagnole-Santos y cols, 1992) esto se demuestra mediante la observación de que ni el DuP 753 ni el CGP 42112A bloquean los efectos de la Ang-(1-7) y estos efectos si son bloqueados por un inhibidor peptídico específico, el A-779 (Bottari y cols, 1993).

También existe un receptor específico para angiotensina IV (AIV), llamado AT₄ (Jarvis y cols, 1992; Sardinia y cols, 1993), que presenta una alta afinidad de unión para dicho sustrato (AIV). El receptor AT₄ no se une a los análogos no peptídicos DuP 753 y PD 123177 y no presenta afinidad por AII ni por AIII, esto demuestra que es un receptor distinto a los receptores AT₁ y AT₂ (Timmermans y cols, 1991) y recíprocamente, estos receptores muestran muy baja afinidad de unión a la angiotensina IV. El receptor AT₄ está presente en muchos tejidos de varias especies de mamíferos, incluyendo el hombre (Harding y cols, 1994).

Diversos estudios han demostrado que el extremo N-terminal del péptido AIV juega un papel determinante en la especificidad y afinidad de unión al receptor (Sardinia y cols, 1994).

1.7.4. Receptor AT₁

Es el subtipo de receptor de la AII con mayor importancia hemodinámica, habiendo sido relacionadas sus variantes genéticas con la HTA.

Por ello es el tipo de receptor que va a ser objeto de nuestro estudio y cuyos polimorfismos vamos a analizar. Siendo además un objetivo muy importante de los tratamientos antihipertensivos, tanto farmacológico como genético (Iyer et al, 1996; Martens et al,1998).

1.7.4.1. Clonaje del receptor AT₁

El uso de diferentes técnicas de biología molecular, incluyendo el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de fragmentos de otros receptores acoplados a proteína G, consiguió amplificar secuencias desconocidas del receptor y la expresión del clonaje. Fueron clonados los cDNAs que codifican los receptores de angiotensina II a partir de músculo liso vascular de rata (Murphy y cols, 1991) y de glándula adrenal bovina (Sasaki y cols, 1991).

Ambos cDNAs estaban estrechamente relacionados, constan de 1077 pares de bases (bp) que codifica una proteína de 309 aminoácidos, con un peso molecular de aproximadamente 41 KDa. Experimentos de unión en células COS transfectadas con estos cDNAs demostraron que la potencia de unión agonista/antagonista es idéntica a la definida anteriormente por los receptores AT₁. Además, al estimular las células transfectadas con angiotensina II, se produce una acumulación de inositol fosfato y movilización de calcio, esto indica que los cDNAs codifican receptores funcionales acoplados a la activación de fosfolipasa C, característico de los receptores AT₁ (Murphy y cols, 1991; Sasaki y cols, 1991).

Pero no fue hasta 1992 cuando Takayanagi et al (b) clonaron y secuenciaron el cDNA del receptor AT₁ en humanos demostrando su presencia mediante Northern blot en hígado, pulmón, glándula adrenal y adenomas adrenocorticales.

El gen del receptor AT₁ se compone de al menos 5 exones, cuyo tamaño oscila entre 59 y 2014 bp, y abarca un espacio de más de 55 kb de

DNA (Guo et al, 1994), encontrándose en él múltiples sitios de inicio de la transcripción.

1.7.4.2. Polimorfismos genéticos del gen del AT1 y su relación con la génesis de la HTA y otras enfermedades

Los polimorfismos del gen del AT1 ha sido relacionados mediante varios estudios con la HTA esencial. Bonnardeux et al (1994) identificaron 5 polimorfismos de los cuales ninguno altera la secuencia de aminoácidos, encontrando uno de ellos más frecuente en el grupo con HTA esencial. Dicha variante se encuentra en el nucleótido 1166 de la región 3' no traducida, consistiendo en una sustitución de A por C. Siendo esta mutación la determinada en nuestro estudio con respecto al receptor de la AII.

La misma relación encuentran, Wang et al (1997) en individuos caucásicos hipertensos de inicio precoz con fuertes antecedentes familiares de HTA; y Tired y cols (1998) en mujeres hipertensas.

Sin embargo, otros estudios no encontraron dicha asociación significativa (Schmidt y cols, 1997; Berge y cols, 1998), aunque sí tendencias.

Tampoco Zhang y cols (2000) han conseguido relacionar 9 polimorfismos de un sólo nucleótido en el promotor del gen del receptor del AT1 con la HTA.

Si bien, sí ha sido demostrada una mayor respuesta vascular a la AII en sujetos homocigóticos para el alelo C de dicha mutación (van Geel y cols, 1998 y 2000).

El polimorfismo A1166C del gen del AT1R también han sido estudiado en relación con el IAM: Tired y cols (1994) encontraron un aumento de la frecuencia del genotipo CC-DD (homocigótico para el alelo C1166 del AT1 y para el alelo D de la ECA) en los individuos con IAM (sobre todo en aquellos con menos factores de riesgo clásicos cardiovasculares); Fernandez-Arcas y cols (1999) encontraron el genotipo CC como factor de riesgo para el IAM; Rice y cols (1999) no consiguieron relacionar el genotipo CC-DD con el

IAM pero sí de forma débil con la aterosclerosis coronaria; en sentido contrario, Gardemann y cols (1998) no encuentran relación con la patología isquémica cardíaca, ni Stangl y cols con las complicaciones tras intervenciones coronarias.

En relación con otras patologías, se ha demostrado el desarrollo de autoanticuerpos estimuladores contra el AT₁ en mujeres *preeclámpticas* (Wallukat et al, 1999), la disminución de *arritmias ventriculares* por reperfusión cuando se administran antagonistas del AT₁ en ratones (Harada et al, 1998) y el aumento de la actividad del promotor del AT₁ en células miocárdicas de *corazones hipertróficos* de rata (Herzig et al, 1997).

1.7.4.3. Subtipos del receptor AT₁

A partir del clonaje inicial de los receptores AT₁ vasculares y adrenales se realizaron una gran cantidad de estudios que resultaron en el aislamiento de variantes de los receptores AT₁ (Elton y cols, 1992; Iwai e Inagami, 1992) y de los cDNAs que codifican para los receptores AT₁ humanos (Bergsma y cols, 1992; Furuta y cols, 1992).

Estudios del genoma y estudios comparativos de los cDNAs han demostrado que existen, al menos, tres subtipos del receptor AT₁, dos de los cuales están coexpresados en rata y ratón. Utilizando librerías genómicas cribadas con fragmentos de cDNA del AT₁ o amplificando por PCR con primers basados en la secuencia del AT₁, se observa la existencia de dos clones distintos (Elton y cols, 1992; Shanmugan y cols, 1994), llamados AT_{1A} y AT_{1B}.

Los receptores AT_{1A} y AT_{1B} son los dos subtipos principales del receptor AT₁ identificados actualmente en mamíferos, estando presentes en rata, ratón y humanos.

La principal diferencia en la secuencia proteica entre los subtipos AT_{1A} y AT_{1B} se localiza en el extremo carboxi-terminal de la molécula; este extremo parece ser que es el que con más probabilidad se encuentra envuelto en la interacción receptor-efector. Los ARNs mensajeros de AT_{1A} y AT_{1B}

codifican proteínas con idénticas propiedades (Iwai e Inagami, 1992; Kakar y cols, 1992).

Las afinidades de ambos receptores por los antagonistas sar¹-ile⁸-AngII, sar¹-ala⁸-AngII, losartan y PD123177 son idénticas. La angiotensina II tiene una alta afinidad por ambos subtipos, y su unión es sensible a GTPγS (Chiu y cols, 1993).

Las únicas diferencias observadas son una menor afinidad del AT_{1B} por AI (Kakar y cols, 1992) y una menor respuesta a altas concentraciones de AII. Funcionalmente, ambos subtipos están acoplados a fosfolipasa C (Kakar y cols, 1992).

Mediante Southern análisis se demuestra la existencia en el ADN genómico de rata y ratón de dos genes para el receptor AT₁, los receptores AT_{1A} y AT_{1B} descritos anteriormente, (Elton y cols, 1992). Estos dos genes han sido localizados en distintos cromosomas en ratas: AT_{1A} se encontró en el cromosoma 17, mientras que el gen que codifica para AT_{1B} se encontró en el cromosoma 2 (Lewis y cols, 1993; Szpirer et al, 1993; Tissir y cols, 1995).

En el genoma humano, por el contrario, aparece un sólo gen para el receptor AT₁ (Bergsma y cols, 1992; Tissir y cols, 1995), que ha sido localizado mediante varios estudios en el cromosoma 3, en la región 3q21-q25 (Gemmill and Drabkin, 1991; Curnow et al, 1992; Szpirer et al, 1993), encontrándose en dicho gen variaciones que podrían explicar el desarrollo de HTA.

La **distribución** en los distintos tejidos de los dos subtipos del receptor AT₁ ha sido estudiada a nivel del ARNm. Ambos subtipos son expresados por igual en bazo y glomérulo renal (Kakar y cols, 1992). Sin embargo, AT_{1A} predomina en el hígado, túbulos proximales, músculo liso vascular, corazón, pulmón, hipotálamo y ovario (Sandberg y cols, 1992; Llorens-Cortes y cols, 1994; Clauser y cols, 1996).

El subtipo AT_{1B} es el más importante en la pituitaria anterior, glándula adrenal y útero (Iwai e Inagami, 1992). Dentro del cerebro, el receptor

AT_{1A} es predominante, pero el AT_{1B} es preferentemente expresado en el órgano subfornical y órgano vasculoso de la lámina terminal (Kakar y cols, 1992).

Además en corazón y glándula adrenal la expresión de los dos receptores está regulada de manera diferente. La función del subtipo AT_{1A} es requerida para la respuesta vascular y hemodinámica a AII (Ito y cols, 1995). Estudios recientes en tejidos fetales de ratas han demostrado que la expresión de estos subtipos en los tejidos fetales es distinta de la de los tejidos adultos.

Esta distinta distribución tanto tisular como temporal sugiere que la angiotensina II podría actuar como un factor de diferenciación durante la ontogénesis (Shanmugam y cols, 1994).

1.7.4.4. Regulación de la expresión del ARNm del receptor AT₁

Con la disponibilidad de sondas de ARNm y anticuerpos contra el receptor, es posible determinar las bases moleculares que explican las modificaciones de la expresión proteica del receptor de la AII provocadas por distintos factores (Kakar y cols, 1992; Sato y cols, 1994).

Existen distintos factores que regulan la transcripción del receptor AT₁, por ejemplo, la existencia de un sitio de unión a factor de transcripción, AP-1, en la región 5' del gen del receptor AT₁ sugiere que los activadores de la proteína quinasa C (enzima que regula la actividad AP-1) pueden regular la transcripción de este receptor. De forma similar, la presencia de un elemento de respuesta a AMPc indica que los activadores de la proteína quinasa A deben estar envueltos en la regulación transcripcional. Conforme a estos datos, tanto el forskolin, activador exógeno de la adenilato ciclasa, como el dibutilil AMPc, disminuyen la expresión del ARNm del receptor AT₁ en músculo liso vascular (Lassègue y cols, 1992) y en células mesangiales (Makita y cols, 1992).

Uno de los factores más potentes que afectan la expresión proteica del receptor AT₁ es la propia angiotensina II (Kitamura y cols, 1986; Bouscarel y cols, 1988).

Para determinar si esta regulación ocurre a nivel de transcripción o de traducción se utilizaron sondas de ARNm del receptor AT₁. A las 6 horas de tratamiento con AII, se observa una disminución del 50% del ARNm en células de músculo liso vascular (Lassègue y cols, 1992) y del 70% en células mesangiales (Makita y cols, 1992), mientras que un largo tiempo de exposición a AII en la zona fasciculada reticular adrenal produce una disminución del 20-50% (Naville y cols, 1993).

Mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales están envueltos en la regulación de los niveles de ARNm por la AII.

Se realizaron distintos estudios para observar el efecto de la AII sobre la expresión del receptor AT₁ en modelos animales a los que se les modificó el sistema renina-angiotensina. La estimulación del SRA con una dieta baja en sodio durante 4 semanas (Iwai y cols, 1991) o la infusión de AII durante 2 semanas (Iwai e Inagami, 1992) estimulaba la expresión del ARNm del AT₁ de dos a tres veces mayor en la glándula adrenal (Iwai y cols, 1991). Inversamente, la supresión del SRA mediante nefrectomía bilateral o mediante administración de un antagonista del AT₁, disminuye el nivel de ARNm adrenal cerca del 85% (Iwai e Inagami, 1992). Estas observaciones demuestran que los receptores AT₁ adrenales presentan una regulación a la alta por angiotensina II, mientras que en músculo esquelético presentan una regulación a la baja.

Se ha observado que los estrógenos también regulan la expresión del receptor en la pituitaria anterior. Cuatro semanas después de la ovariectomía, se observa un gran incremento de los niveles de ARNm del AT_{1B}, pero no de los del AT_{1A} en la glándula pituitaria de rata. Este efecto puede ser invertido por la administración de estrógenos, pero no por progesterona (Kakar y cols, 1992), confirmando la función reguladora de los estrógenos sobre los receptores AT₁ en la pituitaria. Esta mayor sensibilidad en la expresión de los receptores AT_{1B} a los estrógenos coincide con la observación de que el gen del AT_{1B} contiene más elementos de respuesta a estrógenos que el gen del AT_{1A}.

También se han observado alteraciones en la expresión del receptor AT₁ durante el desarrollo fetal con respecto a la expresión en el adulto, por

ejemplo, los niveles de ARNm del receptor AT₁ en hígado y riñón son mayores en el feto y en el recién nacido que en el adulto (Iwai y cols, 1991; Tuffro-McReddie y cols, 1993 ; Shanmugan y Sandberg, 1996).

1.7.4.5. Desensibilización del receptor AT₁

Muchos tejidos muestran taquifilaxia a la angiotensina II; esto es, la respuesta fisiológica a la AII es momentánea y el tejido se hace refractario a mayor estimulación por el agonista. Este comportamiento puede ser explicado por el proceso de secuestro e internalización del receptor.

Por analogía con la familia del receptor β -adrenérgico, se podría predecir la existencia de una quinasa del receptor β -adrenérgico la cual, por fosforilación del receptor, regula la interacción receptor-proteína G (Lefkowitz, 1993).

Aunque se ha demostrado que la AII es capaz de fosforilar el receptor AT₁ en músculo liso vascular, la quinasa responsable de esta fosforilación no ha sido identificada.

El secuestro y la internalización del receptor han sido demostrados utilizando técnicas de unión a radioligandos (Ullian y Linas, 1990) y por microscopía electrónica (Anderson y cols, 1993).

Inicialmente, se une el agonista al receptor AT₁ en la superficie celular. Se produce la migración en el plano de la membrana concentrando el complejo receptor-agonista en vesículas revestidas. Los complejos son internalizados en pequeñas vesículas y, después de 60 min se encuentran asociados con lisosomas (Anderson y cols, 1993). Aproximadamente, el 25% de los receptores internalizados son reciclados hacia la membrana plasmática y, el resto, son degradados (Ullian y Linas, 1990; Reagan y cols, 1993).

La internalización del complejo receptor-agonista desensibiliza la célula ante una nueva exposición al agonista.

La internalización del AT₁ es necesaria para la activación de la proteína quinasa C, pero no para la liberación del inositol trifosfato en las células de la zona glomerulosa adrenal estimuladas por AII (Kapas y cols, 1994).

1.7.5. Receptor AT₂

Dos grupos de investigadores han llevado a cabo el aislamiento del cDNA que codifica al receptor tipo 2 de la angiotensina II (AT₂) (Mukoyama y cols, 1993; Kambayashi y cols, 1994).

Este receptor clonado se caracteriza por la unión específica a los antagonistas no peptídicos descritos anteriormente como específicos del subtipo AT₂, la afinidad de unión está aumentada por el ditiotreitol y presentan una expresión tisular específica.

1.7.5.1. Subtipos del receptor AT₂

Está generalmente aceptado que los receptores AT₁, pero no los AT₂, son sensibles a los nucleótidos de guanina. Sin embargo, existen datos que indican que los receptores AT₂ del núcleo cerebral de rata son sensibles a estos nucleótidos (Tsutsumi y Saavedra, 1992).

Estos resultados sugieren que hay, al menos, dos subtipos de receptores AT₂ y que la sensibilidad a las proteínas G no es un buen criterio de diferenciación entre receptores AT₁ y AT₂.

Los receptores AT₂ fueron identificados por su alta afinidad a los antagonistas selectivos CGP42112. La unión de este antagonista, al igual que la de ¹²⁵I-Sar¹-ile⁸-AII al cerebro, pero no a los homogenizados de glándula adrenal, era aumentada por el b-mercaptoetanol, ésto sugiere la existencia de

dos diferentes subtipos de receptores AT₂ en cerebro y glándula adrenal de rata (Speth, 1993).

1.7.5.2. Regulación de la expresión del receptor AT₂

En cultivos de células granulosas de ovario de rata, las cuales sólo expresan receptores AT₂, la unión de angiotensina II era regulada a la baja por ella misma. Sin embargo, en estas células, el efecto de regulación a la baja por angiotensina II era imitado por un ionóforo del calcio, pero no por ésteres de forbol (Pucell y cols, 1988), este resultado es contrario al observado en el receptor AT₁ vascular.

Otros trabajos han señalado los factores que controlan la alta expresión de receptores AT₂ en el tejido fetal (Johnson y Aguilera, 1991).

Habiéndose observado que los receptores AT₂ están altamente expresados en el desarrollo fetal y, existe una disminución después del nacimiento (Viswanathan y cols, 1991; Tsutsumi y Saavedra, 1991; Feuillan y cols, 1993).

El número de receptores AT₂ parece estar regulado por factores de crecimiento (Dudley y Summerfelt, 1993).

Aún no hay acuerdo sobre los mecanismos de señales intracelulares que median las acciones producidas por la unión de la angiotensina II al receptor AT₂. Existen evidencias del acoplamiento al GMPc (Bottari y cols, 1992), a canales de potasio (Kang y cols, 1993) y a tirosín fosfatasas (Bottari y cols, 1992) en tipos celulares específicos.

1.7.6. Efectos fisiológicos mediados por los receptores AT₁ y receptores AT₂

La presencia y proporción de los receptores AT₁ y AT₂ varía en los diferentes tejidos/órganos de la misma especie y en el mismo tejido/órgano de diferentes especies. El subtipo AT₁ se encuentra en la mayoría de los tejidos vasculares. El AT₂ se encuentra en la médula adrenal de rata, el útero, las

células de la granulosa del ovario y otras líneas celulares. En la mayoría de los tejidos, como la corteza adrenal, riñón y corazón, ambos receptores están presentes. La distribución tisular de los subtipos del receptor se muestran en la tabla II (Timmermans y cols, 1992).

La existencia de estos subtipos del receptor puede representar la explicación molecular de la diversidad de efectos producidos por la AII. Casi todas las funciones conocidas de la angiotensina II son mediadas por el receptor AT₁, la contracción inducida por AII en células mesangiales de rata y aorta de conejo, la movilización de calcio en cardiomiocitos de rata, la síntesis proteica en células de músculo liso vascular, liberación de aldosterona e inhibición de la adenilato ciclasa en hígado de rata (Dudley y cols, 1990; Sachinidis y cols, 1993).

Incluso en tejidos ricos en receptores AT₂ como útero humano, la contracción inducida por AII era reducida por losartan y no era afectada por el antagonista PD123319, específico del receptor AT₂ (Dudley y cols. 1990). De manera similar, los antagonistas AT₁, pero no los antagonistas AT₂, reducen la presión sanguínea en ratas con hipertensión renal.

En ratas inyectadas intracerebroventricularmente con renina, el losartan inhibe los cambios en el comportamiento respecto a la bebida (Barbella y cols, 1993). Encontrándose la respuesta presora a la estimulación eléctrica del órgano subfornical también inhibida por el losartan (Li y cols, 1993).

De acuerdo con estas observaciones, estudios histológicos y de unión demuestran que los receptores AT₁ predominan en el núcleo circum- y paraventricular, hipotálamo, centros de control autonómico de la médula oblongata, áreas envueltas en la regulación de la presión sanguínea, balance de fluido y electrolitos y secreción de hormonas pituitarias (Tsutsumi y Saavedra, 1991; Barnes y cols, 1993). Los receptores renales AT₂ no tienen efecto sobre el flujo renal total, pero ajustan la relación presión-natriuresis demostrando su

importancia en la regulación del fluido corporal y de la presión sanguínea (Lo y cols, 1995).

Varios estudios en roedores (Oliverio et al, 1998) sugieren el papel promotor del crecimiento somático y mantenimiento de la estructura renal normal del receptor AT₁ (AT_{1A} y AT_{1B}).

Otras observaciones indican que los receptores AT₂, junto con los AT₁, participan en el control de la función cardiovascular. La rápida inhibición de los efectos intracerebroventriculares producidos por la angiotensina II por los antagonistas del AT₁, también se observó con los antagonistas de AT₂ (Toney y Porter, 1993).

Los antagonistas AT₂ producen una lenta, pero mantenida inhibición de los efectos de la AII. Se ha definido una función de los receptores AT₂ como mediadores de la corriente de potasio en células neuronales (Kang y cols, 1993), aunque las consecuencias fisiológicas son aún desconocidas.

Los receptores AT₂ se encuentran en gran proporción en los recién nacidos e individuos jóvenes, decreciendo ésta de forma importante en las fases adultas, lo que sugiere un papel en el crecimiento y diferenciación celular. También se ha relacionado la estimulación de los receptores AT₂ con la liberación de prostaglandinas.

1.8- Relación entre los polimorfismos de los genes del SRA con los niveles plasmáticos de los componentes del eje bioquímico:

Pese a la gran cantidad de bibliografía existente sobre el SRA y sus polimorfismos son pocos los estudios que investiguen la relación de dichos polimorfismos con los niveles plasmáticos de las sustancias del eje.

1.8.1- Polimorfismos del gen del angiotensinógeno:

El *polimorfismo T235* ha sido relacionado varias veces con un incremento en los niveles plasmáticos del angiotensinógeno (AGT), bien solo o

bien en combinación con otros polimorfismos con los que se encuentra en completa relación de desequilibrio. Bloem y cols (1994 y 1996) encontraron una relación clara, en niños y adolescentes blancos y negros, entre el alelo –1074;T235 (ambos en completa relación de desequilibrio) y los niveles de AGT plasmático ($p < 0.0092$ en negros y $p < 0.0001$ en blancos), pero no con la presión arterial sistólica (aunque la relación fue casi significativa con la presión diastólica).

Danser y cols (1998) en un estudio sobre hombres y mujeres encontró relación significativa entre el alelo T235 y un incremento en los niveles plasmáticos de angiotensinógeno, a la vez que una disminución en los de prorenina y renina, no afectando sin embargo a los niveles de ECA ni aldosterona circulantes.

Y Paillard y cols (1999) estudiaron la relación entre el ya conocido polimorfismo M235T, junto a otros dos nuevos también del angiotensinógeno, el C532T y el G6A, con los niveles plasmáticos de AGT, ECA, AII, aldosterona y renina; encontrando en los T235 solo una tendencia no significativa al incremento del AGT, en los T532 un incremento muy significativo del AGT y una disminución poco significativa de ECA, y en los G6A ninguna relación con ninguno de los parámetros estudiados.

Hasta la fecha no hay ningún estudio que intente relacionar los polimorfismos del angiotensinógeno con los niveles plasmáticos de A-(1-7).

1.8.2- Polimorfismos del gen de la ECA:

El polimorfismo I/D de la ECA ha sido relacionado claramente con los niveles plasmáticos de la ECA, demostrando un incremento en sus niveles con el alelo D.

Danser y cols mediante dos estudios (1998 y 1999) demostraron un incremento de la ECA circulante en el alelo D, si bien no encontraron ninguna relación con la transformación de AI a AII (razón AII/AI, que es un índice de actividad *in vivo* de la actividad de la ECA), ni con los niveles de renina, prorenina, AGT ni aldosterona.

Del mismo equipo van Dijk y cols (2000) encontraron en los DD un aumento de los niveles de ECA y de la respuesta vasoconstrictora a la AI, y ninguna relación con la conversión de AI a AII, la vasodilatación por la bradicinina ni con la vasoconstricción por la AII. Además encontraron una disminución de la vasoconstricción por la AI con la administración de enalapril (Inhibidor de la ECA), y una disminución de la vasoconstricción por la AII con la administración de losartan (inhibidor del receptor de la II).

Murphey y cols (2000) demostraron en los DD un aumento de la actividad ECA, una disminución en los niveles de bradicinina y del activador tisular del plasminógeno, y un aumento de la bradicinina 1-5 (metabolito inactivo de la bradicinina).

Kim y cols (1997) encontraron el polimorfismo DD relacionado con un incremento en los niveles del inhibidor del activador tisular del plasminógeno-1 en varones con bajo riesgo cardiovascular y en mujeres posmenopáusicas.

Paillard y cols (1999) estudiaron otro polimorfismo de la ECA el 4656(CT)_{2/3} encontrando un incremento claramente significativo de los niveles de ECA circulante en los sujetos homocigóticos para 4656(CT)_{3/3}, no encontrando relación con los niveles de AII ni de aldosterona.

Hasta la fecha no hay ningún estudio que intente relacionar los polimorfismos de la ECA con los niveles de A-(1-7).

1.8.3- Polimorfismos del gen del receptor AT1:

Paillard y cols en su estudio de 1999, no consiguieron relacionar el polimorfismo A1166C del AT1 con los niveles plasmáticos de AGT, ECA, AII, aldosterona y renina, ni tampoco con el número de sitios de unión para la AII presentes en las plaquetas.

Como en los dos anteriores polimorfismos hasta la fecha no hay ningún estudio que intente relacionar los polimorfismos del AT1 con los niveles de A-(1-7).

2-OBJETIVOS:

2. OBJETIVOS

Los polimorfismos genéticos del eje renina-angiotensina han sido relacionados en múltiples estudios con determinadas patologías de la especie humana, sobre todo con enfermedades cardiovasculares, debido al papel regulador sobre la presión arterial que desempeña dicho eje. Destacando entre ellas la Hipertensión Arterial Esencial, Idiopática o Primaria, cuya etiología permanece aún incierta y se supone multifactorial.

El mecanismo por el cual los distintos polimorfismos de los genes con repercusión funcional del sistema renina-angiotensina determinan cambios en la presión arterial se supone debe ser a través de variaciones cuantitativas (niveles) y cualitativas en la síntesis de sus *productos* de transcripción y traducción, así como en sus distintas interacciones dentro de dicho sistema regulador, que dan lugar a la formación de *diferentes equilibrios del eje*.

Los principales polimorfismos de los genes con repercusión funcional del sistema renina-angiotensina según el conocimiento médico actual son el M235T del gen del angiotensinógeno, el Inserción/Delección del gen de la ECA (enzima de conversión de la angiotensina) y el A1166C del gen del receptor AT1 para la angiotensina II. Siendo, en consecuencia, dichos polimorfismos genéticos los determinados en este estudio.

Dentro del eje renina-angiotensina angiotensina II es considerada la sustancia efectora funcional más importante, con un efecto final presor sobre el sistema cardiovascular demostrado. Por otra parte, la angiotensina-(1-7), de reciente descubrimiento dentro del eje, con una función contrarreguladora de la angiotensina II y un efecto final que disminuye la presión arterial. Y finalmente, la angiotensina I que es el precursor inmediato de la angiotensina II, y a su vez de la angiotensina-(1-7), en la cascada del sistema, teniendo también efectos funcionales mesurables. Siendo, por tanto, dichas sustancias

del eje renina angiotensina las medidas en el plasma de los individuos de esta investigación.

Por todo ello, y en resumen, la realización del presente estudio tiene dos objetivos primordiales:

- El primero es analizar la relación de los *polimorfismos* de los genes con repercusión funcional del Sistema Renina-Angiotensina, el M235T del gen del angiotensinógeno, el Inserción/Delección del gen de la ECA y el A1166C del gen del receptor AT1 para la angiotensina II, con los *niveles en plasma* de angiotensina I (AI), angiotensina II (AII) y angiotensina-(1-7), todas sustancias peptídicas activas del sistema, en sujetos sanos no hipertensos.
- El segundo es relacionar dichos *polimorfismos* mediante las distintas *razones de conversión y correlaciones*, de angiotensina I a angiotensina II (AII/AI, que es un índice de la actividad de la ECA *in vivo*), de angiotensina I a angiotensina-(1-7) (A-(1-7)/AI), y de angiotensina II a angiotensina-(1-7) (A-(1-7)/AII), con variaciones en la *regulación del eje* renina-angiotensina, en sujetos sanos no hipertensos.

Siendo realizado el estudio sobre una población sana y joven.

3-MATERIAL Y MÉTODOS:

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. 1. Reactivos

- Aceite mineral. Sigma, M-5904.
- Ácido acético glacial. Merck, 58.
- Ácido bórico. Merck, 765.
- Agarosa de bajo punto de fusión. Bio-Rad, 16200.
- Agua libre de DNasa-RNasas. Fluka, 95284.
- Agua libre de DNasa-RNasas. Sigma, W4502.
- Azul de bromofenol. Merck, 8122/Xileno-cianol. Bio-Rad, 161-0423.
- Bromuro de etidio. Sigma, E7637.
- Buffer PCR. Promega, M190A.
- Cl₂Mg PCR. Promega, A351B.
- EDTA. Sigma, E-5134.
- Enzima de restricción SfaNI Biolabs Inc. 172L.
- Enzima de restricción HINF-1. Promega, R620A.
- BfrI (Afl II) Boehringer Mannheim.
- Etanol absoluto purísimo Panreac. Cod 141086
- Etanol 96% v/v purísimo 141085.
- GTG agarosa. FMC, 50072.
- NaHMB (Na p-hidroximercurobenzoato). Sigma, H 0642.
- 1,10-orto-fenantrolina (o-PT). Sigma Chemical Corporation, P 1294.
- Pepstatina A. Península Labs, 4039.
- Proteinasa K. Merck, 24568.
- Taq polimerasa. Promega, M186A.
- Tris hidroximetil aminometano. Merck, 8386.
- Tris hidroximetil aminometano. Sigma, T-1503.

3. 2. Materiales

3. 2. 1. Selección de sujetos. Muestra del estudio.

Los sujetos de este estudio fueron seleccionados de entre alumnos voluntarios de la Facultad de Medicina de Málaga. El grupo a estudio está formado por un total de 93 sujetos sanos, de los cuales 43 son *varones* y 50 son *mujeres* (46.24% y 53.76% respectivamente), con una media de *edad* de 20.67 años, una desviación típica de 2.75, un mínimo de 17 y un máximo de 30 y un intervalo de confianza ($p < 0.05$)= 20.11-21.22 años. La *talla* media en metros (precisión en centímetros) es de 1.71 metros con una desviación típica de 0.09 y un intervalo de confianza ($p < 0.05$) de 1.69-1.73 metros; y un *peso* medio en kilogramos (Kgrs) de 65.01 Kgrs, desviación típica de 12.83 y un intervalo de confianza ($p < 0.05$)= 62.41-67.62 Kgrs.

3. 3- Métodos

3.3.1- Preparación y extracción de la muestra para la determinación de los péptidos de la angiotensina:

3.3.1.1- Fabricación de la solución inhibidora de la proteasa:

Su función es evitar la degradación de los péptidos de la angiotensina por las proteasas presentes en la sangre, evitando de esta manera errores en la determinación. Los pasos para su obtención se enumeran a continuación:

A).-Mezclar 0.018 gr de o-PT (1,10-fenantrolina) con 5.75 mL de agua ultrapura en un agitador magnético durante 4 o 5 horas.

B).-Mezclar 0.0151 gr de pepstatina A con 3mL de etanol en un matraz cerrado durante 4 o 5 horas en un agitador magnético.

C).-Verter la solución de o-PT en la suspensión de pepstatina A y continuar mezclando, el resultado será una suspensión espesa blanca.

D).-Añadir 0.066 gr de NaHMB (almacenado a temperatura ambiente) al matraz y mezclar con el agitador magnético durante 5 minutos más.

E).-Mientras se mezcla alicuotear en tubos de cristal y almacenar en el refrigerador hasta que sea necesario.

F).-Añadir 0.35 mL de la mezcla resuspendida a cada tubo EDTA de extracción de 7 mL (o 50uL por mL de sangre). Nosotros usamos una jeringa de 1 cc para medir la cantidad de inhibidor e insertamos la aguja a través del tapón de goma del vacutainer. Los vacutainers retienen el vacío durante varios días.

3.3.1.2- *Protocolo de extracción de sangre para la medición de los péptidos de la angiotensina:*

A).-Previo a la extracción de sangre, lavar la jeringa y la aguja que se van a utilizar con una solución de EDTA al 15%.

B).-Añadir la cantidad adecuada del “inhibidor de la angiotensina” (su composición y fabricación se detallan en el apartado anterior), bien mezclado, a un tubo violeta de extracción sanguínea de acuerdo con los siguientes volúmenes:

<u>mL de sangre</u>	<u>mL de inhibidor</u>
1.0	0.05
2.0	0.10
3.0	0.15
4.0	0.20
5.0	0.25
6.0	0.30
7.0	0.35

C).-Enfriar el tubo de extracción, antes de recoger la muestra, en un baño de agua con hielo.

D).-Recoger la muestra y mezclar bien por inversión. Poner el tubo inmediatamente en el baño de hielo.

E).-Centrifugar la muestra durante 10 minutos en una centrifugadora refrigerada a 2000 rpm.

F).-Transferir el plasma a un tubo cónico de centrifugadora previamente enfriado y centrifugar otros 10 minutos en frío a 2000 rpm de nuevo.

G).-Recoger el plasma en tubos de polipropileno, identificar al paciente, y conservar a -80°C hasta que esté listo para ser mandado al laboratorio de referencia para la determinación de los péptidos de la angiotensina.

H).-El envío de las muestras se realiza con hielo seco para su conservación.

3.3.2- Determinación de los niveles plasmáticos de los péptidos de la angiotensina:

La determinación de los péptidos de la angiotensina se realizó en el **“Hypertension Core Laboratory” de la Wake Forest University School of Medicine en el Medical Center Blvd. Box 1056 de Winston-Salem, Carolina del Norte (EEUU), gracias a la colaboración del Dr Ferrario y su equipo de investigación.** Y se realizó mediante la separación de las muestras con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) seguida de radioinmunoensayo (RIA).

3.3.2.a- Separación de las muestras mediante la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC):

Los péptidos fueron fraccionados en un sistema HPLC LKB (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ) con un columna Nova-Pak C18 (3.9 x 150 mm, Water Associates, Milford, MA). La fase móvil estaba compuesta por ácido heptafluorobutírico (HFBA)(Sequanol Grade, Pierce, Rockford, IL) v/v en agua (buffer A) y 80% de acetonitrilo (Burdick and Jackson, Muskegon, MI) en 0.13% HFBA (buffer B). La columna fue diluida con un gradiente de convexidad 30-50% de buffer B (curva # 13 del Controlador Programable del Gradiente LKB) durante 30 minutos a un flujo de 1 mL/min.

3.3.2.b- *Cuantificación de los péptidos de la angiotensina mediante radioinmunoensayo (RIA):*

Las fracciones obtenidas por HPLC fueron sometidas a RIAs para la A-(1-7), la AII y la AI, respectivamente. Tres antisueros distintos que reconocen un epítoto diferente de la molécula de angiotensina fueron usados. El anticuerpo contra la angiotensina I (New England Nuclear, Boston, MA) tiene un 100% de reactividad cruzada con la AI, la angiotensina-(2-10) y la angiotensina-(3-10), pero presenta menos de un 0.1% de unión con los fragmentos de AII y de A-(1-7). El anticuerpo contra la angiotensina II obtenido en el laboratorio tiene un 100% de reactividad cruzada con la AII y su fragmento C-terminal, pero presenta menos de un 0.01% de reactividad cruzada con los fragmentos de AI y de A-(1-7). El anticuerpo contra la A-(1-7) obtenido en el laboratorio muestra un 100% de reactividad cruzada con la A-(1-7) y la angiotensina-(2-7), mientras que reacciona cruzadamente menos de un 0.01% con la AI y la AII.

3. 3. 3- Obtención y preparación de la sangre para la determinación de los polimorfismos:

3.3.3. a- *Método corona de linfocitos:*

Se les extrae 3 ml de sangre venosa que se deposita en un vacutainer con EDTA como anticoagulante. Se centrifuga 15 minutos a 3.500 rpm y a una temperatura de 4°C, posteriormente y mediante una pipeta estéril, se recoge el plasma (se conserva a -20°C) y el anillo de células blancas, formado fundamentalmente por células mononucleares de sangre periférica (CMSP) que se congela a -20°C, excepto 25 microlitros, que se transfieren a un eppendorf con 450 microlitros de TE. Todo el proceso debe ser realizado entre 0-4°C para evitar la degradación de la muestra. El sedimento restante se desprecia por su alto contenido en hematíes.

3. 3.3. b- *Método de sangre total:*

Se realiza mediante punción en dedo índice, depositándose una gota -equivale aproximadamente a 50 microlitros de sangre total- en un eppendorf

conteniendo 450 microlitros de TE.

3. 3. 4- Extracción de DNA:

A los 450 microlitros de TE con CMSP o gota de sangre, se despega la base más densa, agitándola manualmente, posteriormente se pasa por el vórtex durante 5 segundos y se centrifuga a 12.000 revoluciones por minuto, durante 10 segundos. El sobrenadante resultante se elimina(decanta) sobre papel secante y el precipitado se resuspende en 450 microlitros de TE. Todo el proceso se repite, hasta observar que el sobrenadante en el papel sea transparente(4 veces, suele ser suficiente), pasando a secar el tubo con papel secante sin llegar a tocar el pellet (precipitado).

3. 3. 5- Digestión de DNA:

Poner 100 microlitros de la solución de digestión enzimática, en cada eppendorf (contiene el pellet). La digestión enzimática, rompe las cadenas proteicas, fundamentalmente las histonas que son las que empaquetan el DNA, formando los nucleosomas y por tanto liberando la doble hélice. La temperatura de acción de la proteinasa es a 56°C durante 45 minutos y un pH de 8,3, precisando en el medio para su acción MgCl₂. Posteriormente se eleva la temperatura a 95°C, durante 10 minutos, para inactivar la proteinasa, evitando que interfiera en procesos posteriores. El DNA digerido puede conservarse a -20°C.

3. 3. 6- Reacción en cadena de la polimerasa(PCR):

Se realiza con las condiciones previamente optimizadas, para tiempos y volúmenes, descritas para cada gen. El producto de PCR puede conservarse a -20°C.

3. 3. 6.1- Protocolo de PCR para el polimorfismo I/D del gen de la ECA :

3. 3. 6.1. a- Oligonucleótidos específicos:

sentido: 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3'

antisentido: 5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3'

3. 3. 6.1. b- Optimización de volúmenes:

Se necesita para cada 5 microlitros(50 nanogramos) de DNA digerido (muestra a determinar): 5 microlitros de Buffer PCR 10x, 6 microlitros de MgCl₂, 1 microlitro de dNTPs, 0,5 microlitros de oligonucleótido sentido, 0,5 microlitros de oligonucleótido antisentido y 0,25 microlitros de Taq polimerasa, se le añade 31,75 microlitros de agua libre de DNasa-RNasas. Una vez preparada y mezclada la disolución se le añaden los 5 microlitros del DNA, obteniendo un volumen final aproximado de 50 microlitros. Antes de ponerla en el termociclador se le echa una gota de aceite mineral.

3. 3. 6.1. c- Protocolo del termociclador:

- 2 minutos 94° C
- 1 minuto 94° C
- 1 minuto 58° C 35 ciclos
- 2 minutos 72° C

El producto tiene 287 bp.

3. 3. 6.1.d- Posteriormente y debido a la existencia de falsos negativos para la inserción, el producto se reamplifica con primers específicos para la secuencia inserción y con 1 microlitro del producto del primer PCR

sentido: 5'-TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC-3'

antisentido: 5'-TCGCCAGCCCTCCCATGCCCATAA-3'

3. 3. 6.1. e- Protocolo de termociclador para reamplificación

- 2 minutos 94° C
- 1 minuto 94° C
- 1 minuto 67° C 35 ciclos
- 2 minutos 72° C

El producto tiene 335 bp en caso de inserción y negativo si no existe

3. 3. 7- Electroforesis en gel de agarosa:

Para realizar la electroforesis en geles de agarosa son útiles las cubetas horizontales. En éstas el gel queda sumergido justo debajo de la superficie del tampón de electroforesis

Se utiliza agarosa Bio-Rad, generalmente a una concentración del 3%. Es necesario calentar hasta la ebullición, para conseguir la disolución completa de la agarosa. Se deja enfriar de forma homogénea, manteniendo el recipiente en movimiento, para evitar que se formen grumos de agarosa. Añadir a 50°C bromuro de etidio. Verter en el portageles, en el cual se ha colocado un peine para formar los pocillos, donde se depositarán las muestras.

Una vez solidificado el gel, se extrae el peine y se introduce el gel en la cubeta de electroforesis y se cubre con el tampón de electroforesis.

3. 3. 8- Colocación de las muestras en el gel de agarosa:

Poner en una gradilla los eppendorf necesarios según el número de muestras, añadir 4 microlitros de colorante azul de bromofenol, al que se le añaden 20 microlitros de la muestra de PCR. Mezclar y coger 20 microlitros, que se depositan en cada uno de los pocillos del gel. Dejar correr la muestra aproximadamente 20 minutos a 100 mV. El colorante sirve de control del recorrido del DNA.

3. 3. 9- Visualización de las bandas:

Cuando las bandas del colorante, se situen en la parte media del gel, extraer el gel del aparato de electroforesis y colocarlo en el transiluminador. Observar las bandas a luz ultravioleta.

3. 3. 10- Composición y fabricación de los productos usados para la determinación última de los polimorfismos:

-TE:

-10 mM Tris Cl a pH 7,4

-1mM EDTA a pH 8

Llevar a pH 7,4

-SOLUCIÓN DE DIGESTIÓN ENZIMÁTICA:

Buffer PCR(10x) 10 microlitros

Cl₂Mg PCR 6 microlitros

Proteinasa K(20mg/microlitro) 0,5 microlitros

Agua libre de DNasa-RNasas 83,5 microlitros.

Obteniendo un volumen total de DNA digerido por pellet de 100 microlitros

-GEL DE AGAROSA:

- PEQUEÑO (60 mililitros aproximadamente):

Agarosa 1,8 gramos

Agua milli Q 58,2 mililitros

TAE 50x 1,8 mililitros

Este gel es útil para un número de muestras menor de 12.

Cuando esté a 50°C, durante el enfriamiento, se le añaden 10 microlitros de bromuro de etidio.

- GRANDE (120 mililitros aproximadamente)

Agarosa 3,6 gramos

Agua milli Q 116,4 mililitros

TAE 50x 3,6 mililitros

Este gel es útil para un número de muestras menor de 24, aunque es posible poner dos peines a distinto nivel, duplicando el número de pocillos y por tanto el número de muestras.

El TAE 50x puede sustituirse por TBE 5x en la misma cantidad.

A los 50° C se le añaden 20 microlitros de bromuro de etidio.

-TAE 50x:

Tris base	242 gramos
Acido acético glacial	57,1 mililitros
EDTA 0,5 M(pH 8.0)	100 mililitros

-TBE 5x:

Tris base	54 gramos
Acido bórico	27,5 gramos
EDTA 0,5 M(pH 8.0)	20 mililitros

-BUFFER TAE:

Agua milli Q	294 mililitros
TAE 50x	6 mililitros

De forma opcional pueden añadirse 30 microlitros(5mg/ml) de bromuro de etidio

3.3.11- Tratamiento estadístico de los datos:

Los resultados obtenidos en los distintos grupos de muestras se han expresado con la media \pm desviación estándar. Se aceptó *significativa* una diferencia estadística cuando la “p”(probabilidad) calculada fue menor de 0.05, y se usó la terminología de *muy significativa* y *casi significativa* cuando la $p < 0.01$ y $p < 0.06$ respectivamente. Los cálculos de las diferencias fueron realizados mediante comparación T de Student mediante la corrección de Bonferroni.

Además se realizó una Regresión Lineal entre los distintos parámetros bioquímicos, expresándose en el estudio la correlación lineal (R) y la significación correspondiente (p).

Para el desarrollo de los cálculos estadísticos se utilizó el programa estadístico *S.P.S.S.10 for Windows*.

4-RESULTADOS:

4.-RESULTADOS:

4.1- Datos descriptivos de la población del estudio:

El grupo a estudio está formado por un total de 93 sujetos sanos, de los cuales 43 son *varones* y 50 son *mujeres* (46.24% y 53.76% respectivamente), con una media de *edad* de 20.67 años, una desviación típica de 2.75, un mínimo de 17 y un máximo de 30 con un intervalo de confianza de 20.11-21.22 años ($p < 0.05$). La *talla* media en metros (precisión en centímetros) es de 1.71 metros con una desviación típica de 0.09 y un intervalo de confianza de 1.69-1.73 metros ($p < 0.05$); y un *peso* medio en kilogramos (Kg) de 65.01 Kg, desviación típica de 12.83 y un intervalo de confianza 62.41-67.62 Kg ($p < 0.05$).

La distribución de frecuencias genotípicas es la siguiente:

-Para el polimorfismo del angiotensinógeno (Figura 1.1):

- MM el 29%(n = 27)
- MT el 54%(n = 50)
- TT el 17%(n = 16)

-Para el polimorfismo de la ECA (Figura 1.2):

- II el 28%(n = 26)
- ID el 40%(n = 37)
- DD el 32%(n = 30)

-Para el polimorfismo del AT1R (Figura 1.3):

- AA el 52%(n = 48)
- AC el 43%(n = 40)
- CC el 5%(n = 5)

Figura 1: Porcentajes de los distintos genotipos de los polimorfismos del angiotensinógeno M235T, de la ECA I/D y del AT1 A1166C.

Fig 1.1

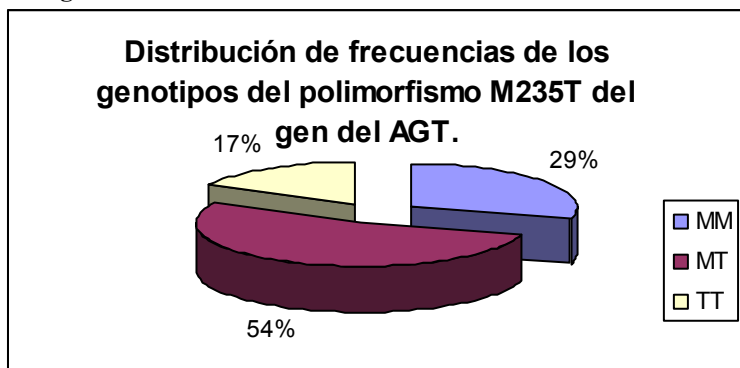


Fig 1.2

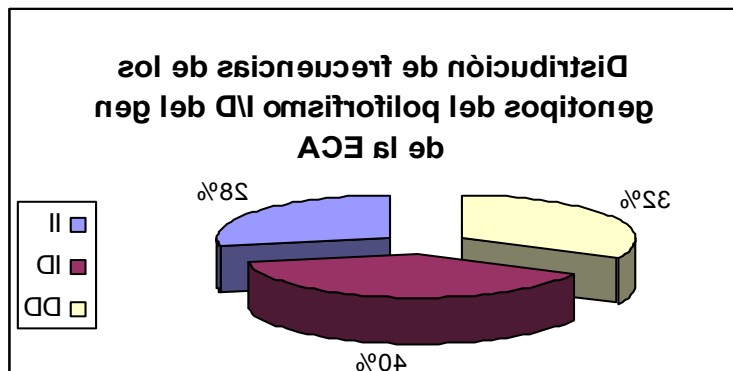
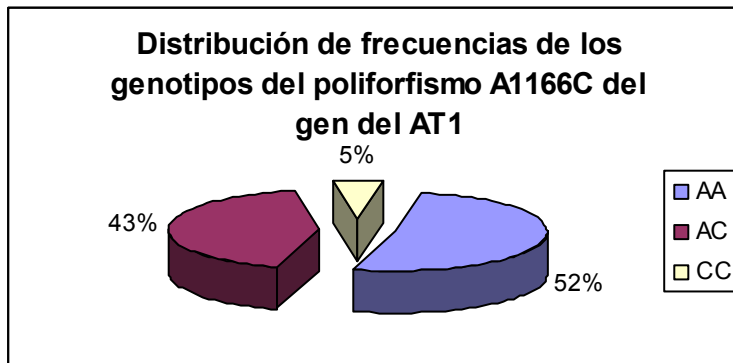


Fig 1.3



4.2-Valores plasmáticos de los péptidos del SRA en la población a estudio (Tabla 1 y Figs 2.1 y 2.2)

Los valores obtenidos considerando toda la población a estudio ($n = 93$) de los distintos péptidos del SRA son de 92.48 ± 102.12 pgr/mL (media \pm desviación típica) para la AI, 22.35 ± 10.00 pgr/mL para la AII, 31.65 ± 27.46 pgr/mL para la A-(1-7), 0.41 ± 0.29 para la razón AII/AI, 0.66 ± 0.72 para la razón A-(1-7)/AI, y de 1.50 ± 1.03 para la razón A-(1-7)/AII.

-Correlación entre los péptidos de la angiotensina en la población general a estudio ($n = 93$):

Entre AI y AII el coeficiente de correlación (R) es de 0.554 ($p < 0.01$), entre AI y A-(1-7) $R = 0.013$ ($p = 0.9$), y entre AII y A-(1-7) $R = 0.292$ ($p < 0.01$).

4.3- Comparación entre los Valores plasmáticos de los péptidos del SRA en la muestra a estudio dependiendo de los polimorfismos del gen del Angiotensinógeno, de la ECA y del AT1R.

4.3.1- Valores plasmáticos de los péptidos del SRA en la muestra a estudio en relación a los distintos genotipos del polimorfismo M235T del gen del Angiotensinógeno (Tablas 2.1, 2.4,2.5 y 2.6; y Figs 3.1 y 3.2):

Los valores obtenidos de AI según los polimorfismos del gen del angiotensinógeno son de 76.28 ± 65.41 pgr/mL en los MM ($n = 27$), de 107.52 ± 125.92 pgr/mL en los MT ($n = 50$) y de 72.82 ± 55.74 pgr/mL en los TT ($n = 16$), observándose un incremento importante de los valores de AI en los MT respecto a los MM, y de éstos con respecto a los TT aunque en menor magnitud, no siendo, sin embargo, significativa ninguna de las diferencias. Los valores obtenidos de AII son de 20.26 ± 7.71 pgr/mL en los MM, de 24.67 ± 11.44 pgr/mL en los MT y de 18.65 ± 6.55 pgr/mL en los TT, observándose un incremento de los valores de AII en los MT respecto a los MM, y de éstos con respecto a los TT, siendo no significativa la diferencia entre MT y MM, y entre MM y TT; y *significativa* entre MT y TT (24.67 vs 18.65 , $p < 0.05$).

Fig 2.1

Valores Medios Generales

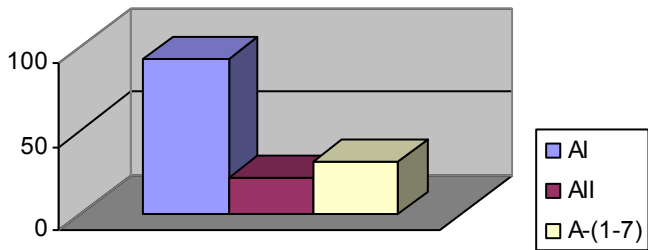


Fig 2.2

Valores Medios Generales de los Ratios

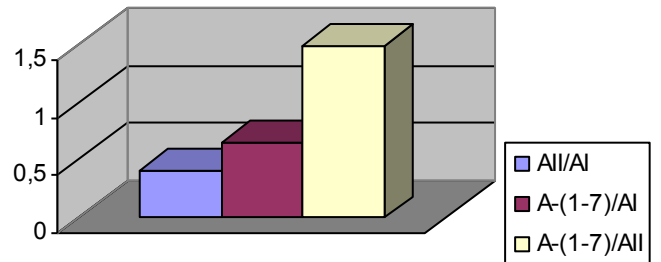


Fig 3.1

Valores Medios por genotipos

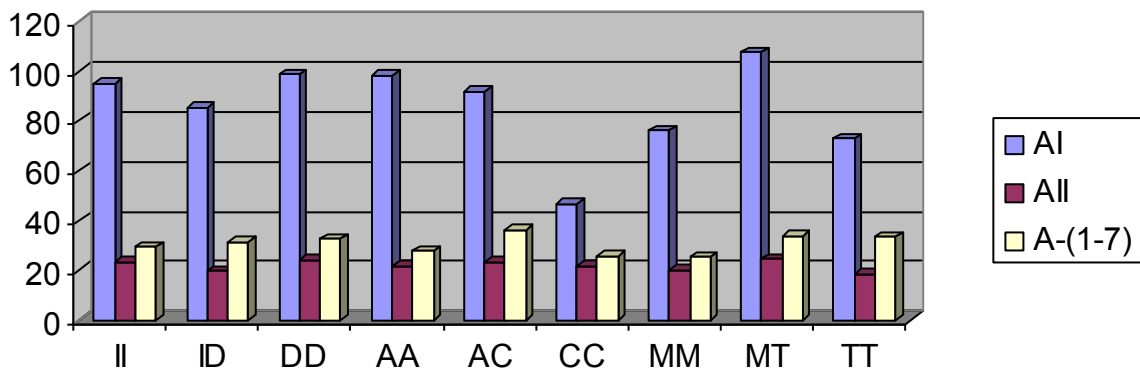
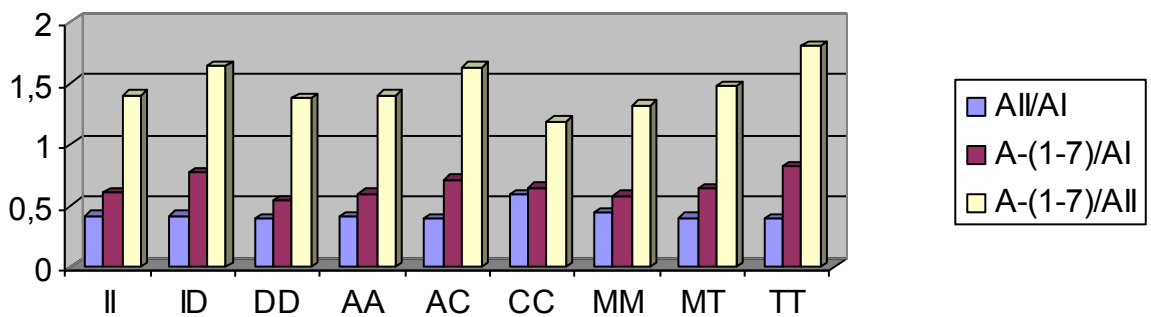


Fig 3.2

Valores Medios de los Ratios por genotipos



Los valores obtenidos de A-(1-7) son de 25.47 ± 10.51 pgr/mL en los MM, de 33.99 ± 31.69 pgr/mL en los MT y de 33.67 ± 31.79 pgr/mL en los TT, observándose un incremento de los valores de A-(1-7) en los MT y TT respecto a los MM, no siendo significativa ninguna de las diferencias.

Los valores obtenidos de la razón AII/AI según los polimorfismos del gen del angiotensinógeno son de 0.45 ± 0.34 en los MM, de 0.40 ± 0.27 en los MT y de 0.40 ± 0.29 en los TT, observándose un incremento de los valores en MM con respecto a MT y TT (0.45 vs 0.40), entre los que no se observan diferencias, no encontrándose significativa ninguna de las diferencias.

Los valores obtenidos de la razón A-(1-7)/AI son de 0.58 ± 0.47 en los MM, de 0.64 ± 0.75 en los MT y de 0.82 ± 0.94 en los TT, observándose un incremento de los valores en TT con respecto a MT, y de éste con respecto a los MM (0.82 vs 0.65 vs 0.58 respectivamente), no encontrándose significativa ninguna de las diferencias.

Los valores obtenidos de la razón A-(1-7)/AII son de 1.33 ± 0.44 en los MM, de 1.50 ± 1.16 en los MT y de 1.81 ± 1.30 en los TT, observándose un incremento de los valores en TT con respecto a MT, y de éste con respecto a los MM (1.81 vs 1.50 vs 1.33 respectivamente), no encontrándose significativa ninguna de las diferencias.

-Correlación entre los péptidos de la angiotensina según el polimorfismo del angiotensinógeno:

En los MM (n = 27): entre AI y AII el coeficiente de correlación (R) es de 0.301 (p = 0.128), entre AI y A-(1-7) R= 0.022 (p = 0.915), y entre AII y A-(1-7) R= 0.561 (p < 0.01).

En los MT (n = 50): entre AI y AII R= 0.618 (p < 0.01), entre AI y A-(1-7) R= 0.044 (p = 0.761), y entre AII y A-(1-7) R= 0.260 (p = 0.068).

En los TT (n = 16): entre AI y AII R= 0.123 (p < 0.651), entre AI y A-(1-7) R= 0.327 (p = 0.217), y entre AII y A-(1-7) R= 0.333 (p < 0.208).

4.3.2- Valores plasmáticos de los péptidos del SRA en relación con el polimorfismo I/D del gen de la ECA (Tabla 2.2, 2.7,2.8 y 2.9; y Figs 3.1 y 3.2):

Los valores obtenidos de AI según los genotipos I/D de la ECA son de 95.23 ± 106.83 pgr/mL en los II (n = 26), de 85.52 ± 110.00 pgr/mL en los ID (n = 37) y de 98.67 ± 90.07 pgr/mL en los DD (n = 30), observándose un incremento de los valores de AI en los DD respecto a los II, y de éstos con respecto a los ID, no siendo significativa ninguna de las diferencias.

Los valores obtenidos de AII son de 23.67 ± 10.94 pgr/mL en los II, de 19.70 ± 7.61 pgr/mL en los ID y de 24.48 ± 11.27 pgr/mL en los DD, no observándose diferencias en los valores de AII de los DD con respecto a los II, pero sí de los DD con respecto a los ID, siendo *significativa* esta diferencia (24.48 vs 19.70).

Los valores obtenidos de A-(1-7) son de 29.46 ± 19.16 pgr/mL en los II, de 31.72 ± 22.78 pgr/mL en los ID y de 32.87 ± 37.41 pgr/mL en los DD, no observándose diferencias apreciables entre los tres genotipos.

Los valores obtenidos de la razón AII/AI según los polimorfismos de la ECA son de 0.42 ± 0.31 en los II, de 0.43 ± 0.31 en los ID y de 0.40 ± 0.26 en los DD, no observándose diferencias reseñables en sus valores.

Los valores obtenidos de A-(1-7)/AI según los polimorfismos de la ECA son de 0.62 ± 0.71 en los II, de 0.78 ± 0.78 en los ID y de 0.55 ± 0.65 en los DD, observándose un incremento de los valores de A-(1-7)/AI en los ID respecto a los II, y de éstos con respecto a los DD (0.78 vs 0.62 vs 0.55 respectivamente), no siendo significativa ninguna de las diferencias.

Los valores obtenidos de la razón A-(1-7)/AII son de 1.40 ± 1.00 en los II, de 1.65 ± 0.90 en los ID y de 1.39 ± 1.21 en los DD, observándose un incremento de los valores de A-(1-7)/AII en los ID respecto a los II, y de éstos con respecto a los DD (1.65 vs 1.43 vs 1.39 respectivamente), no siendo significativa ninguna de las diferencias.

-Correlación entre los péptidos de la angiotensina según el polimorfismo de la ECA:

En los II (n = 26): entre AI y AII $R = 0.597$ ($p < 0.01$), entre AI y A-(1-7) $R = 0.027$ ($p = 0.897$), y entre AII y A-(1-7) $R = 0.250$ ($p = 0.218$).

En los ID (n = 37): entre AI y AII R= 0.350 (p = 0.034), entre AI y A-(1-7) R= 0.106 (p = 0.533), y entre AII y A-(1-7) R= 0.450 (p < 0.01).

En los DD (n = 30): entre AI y AII R= 0.777 (p < 0.01), entre AI y A-(1-7) R= 0.118 (p = 0.535), y entre AII y A-(1-7) R= 0.264 (p < 0.159).

4.3.3- Valores plasmáticos de los péptidos del SRA relacionados con los genotipos del polimorfismo A1166C del gen del AT1 (Tabla 2.3, 2.10, 2.11 y 2.12; y Figs 3.1 y 3.2):

Los valores obtenidos de AI según polimorfismo del AT1 son de 98.01 ± 123.30 pgr/mL en los AA (n = 48), de 91.56 ± 76.57 pgr/mL en los AC (n = 40) y de 46.76 ± 32.30 pgr/mL en los CC (n = 5), observándose un incremento de los valores de AI en los AA respecto a los AC, y en mayor magnitud, de éstos con respecto a los CC, siendo únicamente *significativa* la diferencia entre AC y CC (91.56 vs 46.76, p < 0.05).

Los valores obtenidos de AII son de 21.62 ± 10.56 pgr/mL en los AA, de 23.32 ± 9.93 pgr/mL en los AC y de 21.62 ± 3.40 pgr/mL en los CC, no observándose diferencias entre los genotipos.

Los valores obtenidos de A-(1-7) son de 27.86 ± 15.76 pgr/mL en los AA, de 36.48 ± 37.37 pgr/mL en los AC y de 25.82 ± 12.99 pgr/mL en los CC, observándose un incremento claro de los valores de A-(1-7) en los AC respecto a los AA, y de éstos, en una menor magnitud, con respecto a los CC, no siendo significativa ninguna de las diferencias.

Los valores obtenidos de la razón AII/AI según los polimorfismos del AT1 son de 0.41 ± 0.31 en los AA, de 0.40 ± 0.27 en los AC y de 0.60 ± 0.27 en los CC, observándose un incremento de la razón en los CC con respecto a los AA y AC (0.60 vs 0.41 vs 0.40), no siendo significativa ninguna de las diferencias.

Los valores obtenidos de A-(1-7)/AI según los polimorfismos del AT1 son de 0.61 ± 0.60 en los AA, de 0.72 ± 0.86 en los AC y de 0.65 ± 0.42 en los CC, observándose un incremento de los valores de A-(1-7)/AI en los AC respecto a los CC, y de éstos con respecto a los AA, no siendo significativa ninguna de las diferencias.

Los valores obtenidos de la razón A-(1-7)/AII son de 1.40 ± 0.64 en los AA, de 1.64 ± 1.39 en los AC y de 1.20 ± 0.57 en los CC, observándose un incremento de los valores de A-(1-7)/AII en los AC respecto a los AA, y de éstos con respecto a los CC (1.64 vs 1.42 vs 1.20 respectivamente), no siendo significativa ninguna de las diferencias.

-Correlación entre los péptidos de la angiotensina según el polimorfismo del AT1:

En los AA (n = 48): entre AI y AII R= 0.554 (p < 0.01), entre AI y A-(1-7) R= 0.059 (p = 0.690), y entre AII y A-(1-7) R= 0.394 (p < 0.01).

En los AC (n = 40): entre AI y AII R= 0.620 (p < 0.01), entre AI y A-(1-7) R= 0.026 (p = 0.872), y entre AII y A-(1-7) R= 0.267 (p = 0.096).

En los CC (n = 5): entre AI y AII R= 0.521 (p = 0.368), entre AI y A-(1-7) R= 0.458 (p = 0.438), y entre AII y A-(1-7) R= 0.349 (p = 0.565).

4.4- Descripción de los valores plasmáticos de los péptidos del SRA en Hombres (Tabla 4.1):

Los valores obtenidos de los distintos péptidos del SRA en hombres (n = 43) son de 82.29 ± 101.03 pgr/mL (media \pm desviación típica) para la AI, 21.40 ± 8.71 pgr/mL para la AII, 37.76 ± 36.47 pgr/mL para la A-(1-7), 0.42 ± 0.26 para la razón AII/AI, 0.79 ± 0.85 para la razón A-(1-7)/AI, y de 1.80 ± 1.32 para la razón A-(1-7)/AII.

-Correlación entre los péptidos de la angiotensina en Hombres (n = 43):

Entre AI y AII R= 0.412 (p < 0.01), entre AI y A-(1-7) R= 0.026 (p = 0.871), y entre AII y A-(1-7) R= 0.337 (p = 0.027).

4.4.1- Comparación de los valores plasmáticos de los péptidos del SRA entre genotipos en Hombres:

4.1.1- Genotipos del polimorfismo M235T del angiotensinógeno en hombres (Tabla general 4.2, y pormenorizadas 4.3.1, 4.3.2 y 4.3.3, Figs 4.1 y 4.2):

Los valores obtenidos de AI según los polimorfismos del gen del angiotensinógeno en varones son de 63.51 ± 46.63 pgr/mL en los MM (n = 12), de 91.52 ± 129.54 pgr/mL en los MT (n = 24) y de 82.87 ± 45.74 pgr/mL en los TT (n = 7), observándose un incremento de los valores de AI en los MT respecto a los TT, y

en mayor magnitud de éstos con respecto a los MM, no siendo, sin embargo, significativa ninguna de las diferencias.

Los valores obtenidos de AII son de 17.88 ± 5.23 pgr/mL en los MM, de 23.99 ± 9.85 pgr/mL en los MT y de 18.54 ± 6.97 pgr/mL en los TT, observándose un incremento de los valores de AII en los MT respecto a los TT, y de éstos, aunque en pequeña magnitud con respecto a los MM, siendo únicamente *significativa* la diferencia entre MT y MM (23.99 vs 17.88 , $p < 0.05$).

Los valores obtenidos de A-(1-7) son de 24.83 ± 10.48 pgr/mL en los MM, de 43.87 ± 41.78 pgr/mL en los MT y de 38.98 ± 43.97 pgr/mL en los TT, observándose un incremento de los valores de A-(1-7) en los MT respecto a los TT, y de éstos muy importante con respecto a los MM, siendo *significativa* la diferencia entre MT y MM (43.87 vs 24.83 , $p < 0.05$), no siendo, sin embargo, significativa ninguna de las demás diferencias.

Los valores obtenidos de la razón AII/AI según los polimorfismos del gen del angiotensinógeno son de 0.39 ± 0.23 en los MM, de 0.48 ± 0.28 en los MT y de 0.27 ± 0.16 en los TT, observándose un incremento claro de los valores en MT con respecto a MM, y de estos con respecto a TT, siendo no significativas ninguna de las diferencias.

Fig 4.1

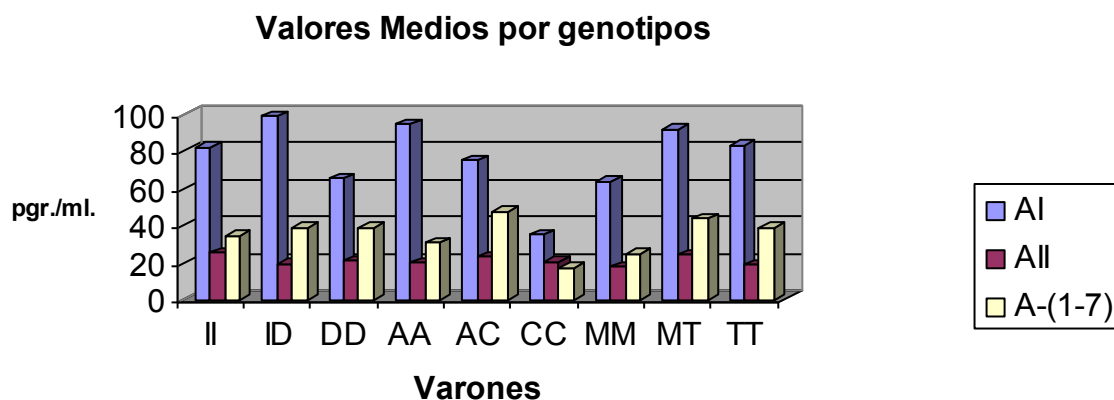
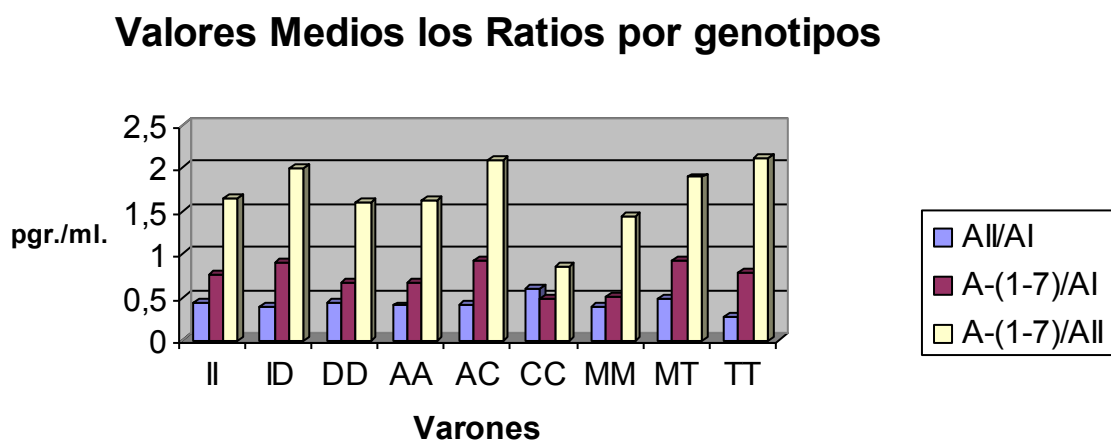


Fig 4.2

Fig 4.2



Los valores obtenidos de la razón A-(1-7)/AI son de 0.51 ± 0.35 en los MM, de 0.92 ± 0.91 en los MT y de 0.80 ± 1.17 en los TT, observándose un incremento de los valores en MT con respecto a MM, siendo *casi significativa* la diferencia entre los MT y los MM (0.92 vs 0.51 , $0.05 < p < 0.1$), y no significativas el resto de las diferencias.

Los valores obtenidos de la razón A-(1-7)/AII son de 1.43 ± 0.49 en los MM, de 1.90 ± 1.47 en los MT y de 2.12 ± 1.76 en los TT, observándose un incremento de los valores en TT con respecto a MT, y de éste con respecto a MM (2.12 vs 1.90 vs 1.43 respectivamente), no encontrándose significativa ninguna de las diferencias.

-Correlación entre los péptidos de la angiotensina según los genotipos del polimorfismo M235T del angiotensinógeno en hombres:

En los MM (n = 12): entre AI y AII R= 0.189 (p = 0.556), entre AI y A-(1-7) R= 0.454 (p = 0.138), y entre AII y A-(1-7) R= 0.378 (p < 0.226).

En los MT (n = 24): entre AI y AII R= 0.422 (p = 0.040), entre AI y A-(1-7) R= 0.021 (p = 0.923), y entre AII y A-(1-7) R= 0.304 (p = 0.148).

En los TT (n = 7): entre AI y AII R= 0.516 (p = 0.236), entre AI y A-(1-7) R= 0.442 (p = 0.321), y entre AII y A-(1-7) R= 0.267 (p = 0.563).

4.4.1.2.- Genotipos delo polimorfismo I/D de la ECA en hombres (Tabla general 4.2, y pormenorizadas en 4.3.4, 4.3.5 y 4.3.6; Figs 4.1 y 4.2):

Los valores obtenidos de AI según polimorfismo de la ECA en varones son de 81.63 ± 65.82 pgr/mL en los II (n = 10), de 98.61 ± 147.41 pgr/mL en los ID (n = 17) y de 65.37 ± 46.84 pgr/mL en los DD (n = 16), observándose un incremento claro de los valores de AI en los ID respecto a los II, y de éstos con respecto a los DD, no siendo significativa ninguna de las diferencias.

Los valores obtenidos de AII son de 25.17 ± 12.86 pgr/mL en los II, de 19.41 ± 7.20 pgr/mL en los ID y de 21.16 ± 6.64 pgr/mL en los DD, observándose un incremento en los II con respecto a los DD, y de estos con respecto a los ID, no siendo significativa ninguna de las diferencias.

Los valores obtenidos de A-(1-7) son de 34.57 ± 24.12 pgr/mL en los II, de 38.52 ± 28.29 pgr/mL en los ID y de 38.95 ± 50.13 pgr/mL en los DD, observándose

un pequeño incremento de los valores de A-(1-7) en los DD e ID con respecto a los II, no siendo significativa ninguna de las diferencias.

Los valores obtenidos de la razón AII/AI según los polimorfismos de la ECA son de 0.44 ± 0.33 en los II, de 0.40 ± 0.25 en los ID y de 0.44 ± 0.22 en los DD, observándose un leve incremento de los II y DD con respecto a los ID, no siendo significativa ninguna de las diferencias.

Los valores obtenidos de A-(1-7)/AI según los polimorfismos de la ECA son de 0.75 ± 0.85 en los II, de 0.92 ± 0.94 en los ID y de 0.67 ± 0.77 en los DD, observándose un incremento de los valores de A-(1-7)/AI en los ID respecto a los II, y de éstos con respecto a los DD (0.92 vs 0.75 vs 0.67 respectivamente), no siendo significativa ninguna de las diferencias.

Los valores obtenidos de la razón A-(1-7)/AII son de 1.65 ± 1.38 en los II, de 2.00 ± 1.11 en los ID y de 1.69 ± 1.54 en los DD, observándose un incremento importante de los valores de A-(1-7)/AII en los ID respecto a los DD, y en menor magnitud, de éstos con respecto a los II (2.00 vs 1.69 vs 1.65 respectivamente), no siendo significativa ninguna de las diferencias.

-Correlación entre los péptidos de la angiotensina según los genotipos del polimorfismo I/D de la ECA en hombres:

En los II (n = 10): entre AI y AII $R= 0.681$ ($p = 0.030$), entre AI y A-(1-7) $R= 0.224$ ($p = 0.534$), y entre AII y A-(1-7) $R= 0.067$ ($p = 0.855$).

En los ID (n = 17): entre AI y AII $R= 0.513$ ($p = 0.035$), entre AI y A-(1-7) $R= 0.104$ ($p = 0.691$), y entre AII y A-(1-7) $R= 0.417$ ($p = 0.096$).

En los DD (n = 16): entre AI y AII $R= 0.395$ ($p = 0.130$), entre AI y A-(1-7) $R= 0.403$ ($p = 0.122$), y entre AII y A-(1-7) $R= 0.622$ ($p < 0.01$).

4.4.1.3- Genotipos del polimorfismo A1166C del AT1R en hombres (Tabla general 4.2, y pormenorizadas en 4.3.7, 4.3.8 y 4.3.9; Figs 4.1 y 4.2):

Dado el pequeño tamaño de la muestra para varones con el genotipo CC (n = 2), no se pueden realizar las comparaciones para hallar la significación con respecto a los otros dos polimorfismos, AA y AC (n = 21 y n = 20, respectivamente), que sí pueden ser comparados entre sí.

Los valores obtenidos de AI según polimorfismo del gen del AT1 en varones son de 93.92 ± 133.50 pgr/mL en los AA, de 74.83 ± 57.93 pgr/mL en los AC y de 34.85 pgr/mL en los DD, observándose un incremento claro de los valores de AI en los AA respecto a los AC, no siendo significativa la diferencia.

Los valores obtenidos de AII son de 19.74 ± 7.43 pgr/mL en los AA, de 23.22 ± 10.13 pgr/mL en los AC y de 20.6 pgr/mL en los CC, observándose un incremento en los AC con respecto a los AA, no siendo significativa ninguna de las diferencias.

Los valores obtenidos de A-(1-7) son de 30.60 ± 17.64 pgr/mL en los AA, de 47.31 ± 49.15 pgr/mL en los AC y de 17.4 pgr/mL en los CC, observándose un incremento de los valores de A-(1-7) en los AC con respecto a los AA, y de estos con respecto a los CC, no siendo significativa ninguna de las diferencias.

Los valores obtenidos de la razón AII/AI según los polimorfismos del AT1 son de 0.40 ± 0.30 en los AA, de 0.42 ± 0.23 en los AC y de 0.60 en los CC, observándose un incremento de los CC con respecto a los AA y AC, no siendo significativa ninguna de las diferencias.

Los valores obtenidos de A-(1-7)/AI son de 0.67 ± 0.66 en los AA, de 0.94 ± 1.04 en los AC y de 0.50 en los CC, observándose un incremento de los valores de A-(1-7)/AI en los AC respecto a los AA, y de éstos con respecto a los CC, no siendo significativa ninguna de las diferencias.

Los valores obtenidos de la razón A-(1-7)/AII son de 1.63 ± 0.72 en los AA, de 2.08 ± 1.76 en los AC y de 0.86 en los CC, observándose un incremento importante de los valores de A-(1-7)/AII en los AC respecto a los AA, y de éstos con respecto a los CC (2.08 vs 1.63 vs 0.86 respectivamente), no siendo significativa ninguna de las diferencias.

-Correlación entre los péptidos de la angiotensina según los genotipos del polimorfismo del AT1R en hombres:

En los AA (n = 21): entre AI y AII $R = 0.408$ ($p = 0.066$), entre AI y A-(1-7) $R = 0.047$ ($p = 0.840$), y entre AII y A-(1-7) $R = 0.391$ ($p = 0.080$).

En los AC (n = 20): entre AI y AII $R = 0.695$ ($p < 0.001$), entre AI y A-(1-7) $R = 0.055$ ($p = 0.817$), y entre AII y A-(1-7) $R = 0.302$ ($p = 0.196$).

En los CC: No se puede realizar ninguna correlación puesto que $n = 2$ ($R = 1.00$ pero $p = \infty$).

4.5- Descripción de los valores plasmáticos de los péptidos del SRA en Mujeres (Tabla 5.1):

Los valores obtenidos de los distintos péptidos del SRA en mujeres (n = 50) son de 101.23 ± 103.25 pgr/mL (media \pm desviación típica) para la AI, 23.17 ± 11.01 pgr/mL para la AII, 26.04 ± 13.98 pgr/mL para la A-(1-7), 0.41 ± 0.32 para la razón AII/AI, 0.54 ± 0.57 para la razón A-(1-7)/AI, y de 1.23 ± 0.58 para la razón A-(1-7)/AII.

-Correlación entre los péptidos de la angiotensina en Mujeres (n = 50):

Entre AI y AII $R = 0.647$ ($p < 0.01$), entre AI y A-(1-7) $R = 0.064$ ($p = 0.658$), y entre AII y A-(1-7) $R = 0.441$ ($p < 0.01$).

4.5.1- Comparación de los valores plasmáticos de los péptidos del SRA entre genotipos en Mujeres (Tabla 5.2):

4.5.1.1- Genotipos del polimorfismo M235T del angiotensinógeno en mujeres (Tabla general 5.2, y pormenorizadas en 5.3.1, 5.3.2 y 5.3.3; Figs 5.1 y 5.2):

Los valores obtenidos de AI según los polimorfismos del gen del angiotensinógeno en mujeres son de 86.50 ± 77.36 pgr/mL en los MM (n = 15), de 122.28 ± 123.15 pgr/mL en los MT (n = 26) y de 65.00 ± 64.03 pgr/mL en los TT (n = 9), observándose un incremento importante de los valores de AI en los MT respecto a los MM, y de éstos con respecto a los TT, no siendo significativa ninguna de las diferencias.

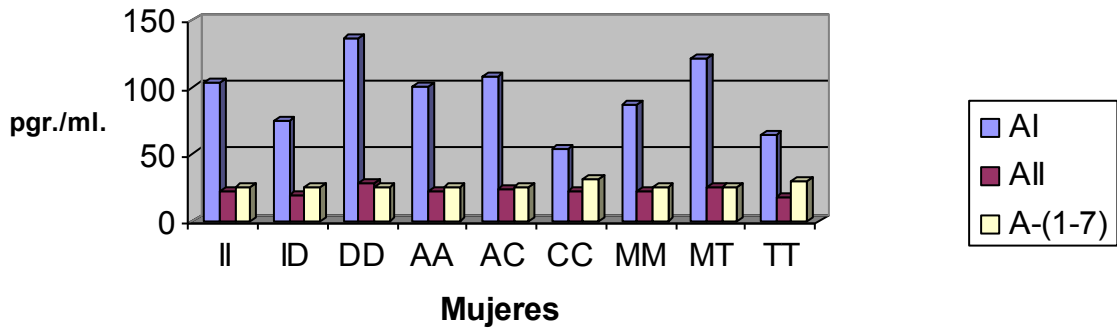
Los valores obtenidos de AII son de 22.17 ± 8.95 pgr/mL en los MM, de 25.29 ± 12.90 pgr/mL en los MT y de 18.73 ± 6.63 pgr/mL en los TT, observándose un incremento de los valores de AII en los MT respecto a los MM, y de éstos con respecto a los TT, no siendo significativa ninguna de las diferencias.

Los valores obtenidos de A-(1-7) son de 25.98 ± 10.87 pgr/mL en los MM, de 24.86 ± 13.52 pgr/mL en los MT y de 29.54 ± 20.03 pgr/mL en los TT, observándose un incremento de los valores de A-(1-7) en los TT respecto a los MT y MM, no siendo significativa ninguna de las diferencias.

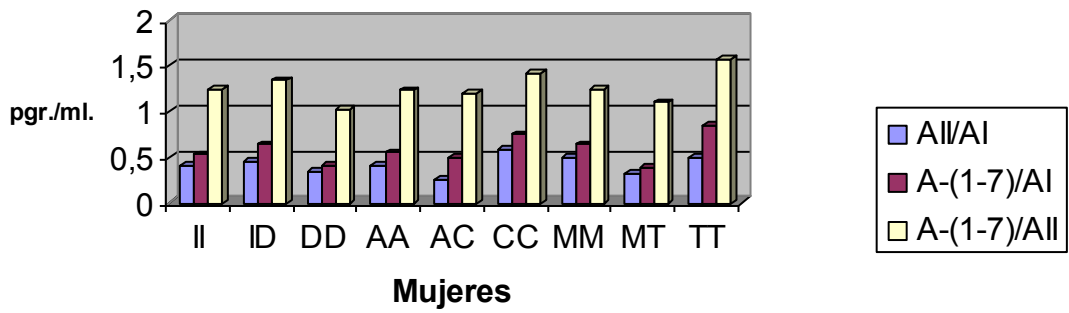
ig 5.1

ig 5.2

Valores Medios por genotipos



Valores Medios de los Ratios por genotipos



Los valores obtenidos de la razón AII/AI según los polimorfismos del gen del angiotensinógeno son de 0.49 ± 0.41 en los MM, de 0.33 ± 0.25 en los MT y de 0.49 ± 0.34 en los TT, observándose un incremento claro de la razón en los MM y TT con respecto a los MT, no siendo significativa ninguna de las diferencias.

Los valores obtenidos de la razón A-(1-7)/AI son de 0.64 ± 0.55 en los MM, de 0.38 ± 0.44 en los MT y de 0.85 ± 0.80 en los TT, observándose un incremento de los valores en TT con respecto a MM, y de éste con respecto a MT, no siendo significativa ninguna de las diferencias.

Los valores obtenidos de la razón A-(1-7)/AII son de 1.24 ± 0.40 en los MM, de 1.10 ± 0.55 en los MT y de 1.56 ± 0.84 en los TT, observándose un incremento de los valores en TT con respecto a MM, y de éste con respecto a MT, siendo *casi significativa* la diferencia entre TT y MT (1.56 vs 1.10), no encontrándose significativas el resto de las diferencias.

-Correlación entre los péptidos de la angiotensina según los genotipos del polimorfismo M235T del angiotensinógeno en mujeres:

En los MM (n = 15): entre AI y AII R= 0.286 (p = 0.301), entre AI y A-(1-7) R= 0.255 (p = 0.359), y entre AII y A-(1-7) R= 0.676 (p = 0.006).

En los MT (n = 26): entre AI y AII R= 0.774 (p < 0.001), entre AI y A-(1-7) R= 0.320 (p = 0.111), y entre AII y A-(1-7) R= 0.471 (p = 0.015).

En los TT (n = 9): entre AI y AII R= 0.089 (p = 0.820), entre AI y A-(1-7) R= 0.391 (p = 0.298), y entre AII y A-(1-7) R= 0.522 (p = 0.149).

4.5.1.2- Genotipos del polimorfismo I/D de la ECA en mujeres (Tabla general 5.2, y pormenorizadas en 5.3.4, 5.3.5 y 5.3.6; Figs 5.1 y 5.2):

Los valores obtenidos de AI según polimorfismo de la ECA en mujeres son de 103.72 ± 127.36 pgr/mL en los II (n = 16), de 74.39 ± 65.92 pgr/mL en los ID (n = 20) y de 136.73 ± 112.44 pgr/mL en los DD (n = 14), observándose un incremento claro de los valores de AI en los DD respecto a los II, y de éstos con respecto a los ID, siendo *significativa* la diferencia entre DD e ID (136.73 vs 74.39).

Los valores obtenidos de AII son de 22.73 ± 9.89 pgr/mL en los II, de 19.95 ± 8.12 pgr/mL en los ID y de 28.28 ± 14.26 pgr/mL en los DD, observándose un

incremento de los valores de AI en los DD respecto a los II, y de éstos con respecto a los ID, siendo *significativa* la diferencia entre DD e ID (28.28 vs 19.95).

Los valores obtenidos de A-(1-7) son de 26.27 ± 15.33 pgr/mL en los II, de 25.94 ± 15.26 pgr/mL en los ID y de 25.92 ± 11.21 pgr/mL en los DD, no apreciándose diferencias significativas entre ellos.

Los valores obtenidos de la razón AII/AI según los polimorfismos de la ECA son de 0.41 ± 0.31 en los II, de 0.45 ± 0.36 en los ID y de 0.35 ± 0.29 en los DD, observándose un incremento de los ID con respecto a los II, y de estos con respecto a los DD, no siendo significativa ninguna de las diferencias.

Los valores obtenidos de A-(1-7)/AI según los polimorfismos de la ECA son de 0.53 ± 0.63 en los II, de 0.65 ± 0.60 en los ID y de 0.41 ± 0.45 en los DD, observándose un incremento de los valores de A-(1-7)/AI en los ID respecto a los II, y de éstos con respecto a los DD, no siendo significativa ninguna de las diferencias.

Los valores obtenidos de la razón A-(1-7)/AII son de 1.25 ± 0.68 en los II, de 1.34 ± 0.54 en los ID y de 1.04 ± 0.52 en los DD, observándose un incremento en ID con respecto a II, y de estos con respecto a DD, no siendo significativa ninguna de las diferencias.

-Correlación entre los péptidos de la angiotensina según los genotipos del polimorfismo I/D de la ECA en mujeres:

En los II (n = 16): entre AI y AII R= 0.667 (p = 0.005), entre AI y A-(1-7) R= 0.195 (p = 0.470), y entre AII y A-(1-7) R= 0.441 (p = 0.088).

En los ID (n = 20): entre AI y AII R= 0.194 (p = 0.413), entre AI y A-(1-7) R= 0.284 (p = 0.226), y entre AII y A-(1-7) R= 0.643 (p = 0.002).

En los DD (n = 14): entre AI y AII R= 0.827 (p < 0.001), entre AI y A-(1-7) R= 0.260 (p = 0.369), y entre AII y A-(1-7) R= 0.391 (p = 0.167).

4.5.1.3- Genotipos del polimorfismo A1166C del AT1 en mujeres (Tabla general 5.2, y pormenorizadas en 5.3.7, 5.3.8 y 5.3.9; Figs 5.1 y 5.2):

Los valores obtenidos de AI según polimorfismo del AT1 en mujeres son de 101.19 ± 117.25 pgr/mL en los AA (n = 27), de 108.27 ± 89.95 pgr/mL en los AC (n = 20) y de 54.70 ± 42.96 pgr/mL en los CC (n = 3), observándose un incremento de los valores de AI en los AC respecto a los AA, y de éstos muy importante con

respecto a los CC (108.27 vs 101.19 vs 54.70), no siendo significativa ninguna de las diferencias.

Los valores obtenidos de AII son de 23.09 ± 12.41 pgr/mL en los AA, de 23.41 ± 10.00 pgr/mL en los AC y de 22.30 ± 3.90 pgr/mL en los CC, no observándose diferencias entre ellos significativas.

Los valores obtenidos de A-(1-7) son de 25.73 ± 14.12 pgr/mL en los AA, de 25.65 ± 14.27 pgr/mL en los AC y de 31.43 ± 14.76 pgr/mL en los CC, observándose un incremento en los CC con respecto a los AA y AC, no siendo significativa ninguna de las diferencias.

Los valores obtenidos de la razón AII/AI según los polimorfismos del AT1 son de 0.42 ± 0.33 en los AA, de 0.37 ± 0.32 en los AC y de 0.59 ± 0.37 en los CC, observándose un incremento de los CC con respecto a los AA, y de estos con respecto a los AC, no siendo significativa ninguna de las diferencias.

Los valores obtenidos de A-(1-7)/AI son de 0.56 ± 0.56 en los AA, de 0.50 ± 0.60 en los AC y de 0.75 ± 0.57 en los CC, observándose un incremento de los valores de A-(1-7)/AI en los CC respecto a los AA, y de éstos con respecto a los AC (0.75 vs 0.56 vs 0.50), no siendo significativa ninguna de las diferencias.

Los valores obtenidos de la razón A-(1-7)/AII son de 1.23 ± 0.52 en los AA, de 1.19 ± 0.68 en los AC y de 1.42 ± 0.66 en los CC, observándose un incremento en CC con respecto a AA, y de estos con respecto a AC, no siendo significativa ninguna de las diferencias.

-Correlación entre los péptidos de la angiotensina según los genotipos del polimorfismo A1166C del AT1 en mujeres:

En los AA (n = 27): entre AI y AII $R= 0.675$ ($p < 0.001$), entre AI y A-(1-7) $R= 0.084$ ($p = 0.678$), y entre AII y A-(1-7) $R= 0.493$ ($p = 0.009$).

En los AC (n = 20): entre AI y AII $R= 0.620$ ($p = 0.004$), entre AI y A-(1-7) $R= 0.054$ ($p = 0.821$), y entre AII y A-(1-7) $R= 0.388$ ($p = 0.091$).

En los CC (n = 3): entre AI y AII $R= 0.770$ ($p = 0.440$), entre AI y A-(1-7) $R= 0.338$ ($p = 0.781$), y entre AII y A-(1-7) $R= 0.340$ ($p = 0.779$).

4.6- Valores plasmáticos de los péptidos del SRA en la población a estudio considerados por Sexos (Tabla 6.1):

Los valores obtenidos de AI son de 82.29 ± 101.03 pgr/mL (media \pm desviación típica) en los varones ($n = 43$) y de 101.23 ± 103.25 pgr/mL en las mujeres ($n = 50$), observándose un incremento no significativo de AI en mujeres respecto a los hombres (101.23 vs 92.48) siendo la significación entre sexos nula.

Los valores obtenidos de AII son de 21.40 ± 8.71 pgr/mL en los varones y de 23.17 ± 11.01 pgr/mL en las mujeres, no apreciándose diferencias importantes en los valores de AII, siendo así la significación entre sexos nula ($p > 0.1$).

Los valores obtenidos de A-(1-7) son de 37.76 ± 36.47 pgr/mL en los varones y de 26.04 ± 13.98 pgr/mL en las mujeres, observándose un incremento en los valores de A-(1-7) en hombres respecto a mujeres (37.76 vs 26.04) *significativo*, (significativo cuando $p < 0.5$).

Los valores obtenidos para la razón AII/AI son de 0.42 ± 0.26 en los varones y de 0.41 ± 0.32 en las mujeres, no apreciándose diferencias importantes en los valores de AII/AI, siendo, por tanto, la significación entre sexos nula.

Los valores obtenidos para la razón A-(1-7)/AI son de 0.79 ± 0.85 en los varones y de 0.54 ± 0.57 en las mujeres, observándose un incremento importante en los valores de la razón AII/AI en hombres con respecto a mujeres, siendo, sin embargo, la significación entre sexos nula .

Los valores obtenidos para la razón A-(1-7)/AII son de 1.80 ± 1.32 en los varones y de 1.23 ± 0.58 en las mujeres, observándose un incremento en los valores de la razón A-(1-7)/AII en los varones respecto a las mujeres, siendo la p entre sexos *muy significativa* ($p < 0.01$).

4.7- Valores plasmáticos de los péptidos del SRA en la muestra a estudio por Sexos en los distintos genotipos de cada polimorfismo (Hombre vs. Mujer) (Figs 6.1 a 6.6):

4.7.1- Polimorfismo M235T del gen del angiotensinógeno (Tabla 6.2):

4.7.1.a- Genotipo MM (Tabla 6.3.1 y Figs 6.1-6.6):

Los valores obtenidos de AI en el grupo de sujetos con el genotipo MM son de 63.51 ± 46.63 pgr/mL en varones ($n = 12$) y 86.50 ± 77.36 en mujeres ($n = 15$), observándose un incremento claro de AI en mujeres respecto a los varones no significativo.

Los valores obtenidos de AII en el grupo de sujetos con el genotipo MM son de 17.88 ± 5.23 pgr/mL en varones y 22.17 ± 8.95 en mujeres, observándose un incremento claro de AII en mujeres respecto a los varones no significativo.

Los valores obtenidos de A-(1-7) en el grupo de sujetos con el polimorfismo MM son de 24.83 ± 10.48 pgr/mL en varones y 25.98 ± 10.87 en mujeres, no observándose diferencias significativas por sexos.

Los valores obtenidos de la razón AII/AI en los MM por sexos son de 0.39 ± 0.23 en varones y de 0.49 ± 0.41 en mujeres, observándose un incremento no significativo de los valores de la razón en mujeres respecto a varones.

Los valores obtenidos de la razón A-(1-7)/AI en los MM por sexos son de 0.51 ± 0.35 en varones y de 0.64 ± 0.55 en mujeres, observándose un incremento no significativo de los valores de la razón en mujeres respecto a varones.

Los valores obtenidos de la razón A-(1-7)/AII en los MM por sexos son de 1.43 ± 0.49 en varones y de 1.24 ± 0.40 en mujeres, observándose un incremento no significativo de los valores de la razón en varones respecto a mujeres.

4.4.1.b- Genotipo MT (Tabla 6.3.2 y Figs 6.1-6.6):

Los valores obtenidos de AI en el grupo de sujetos con el genotipo MT son de 91.52 ± 129.54 pgr/mL en varones ($n = 24$) y 122.28 ± 123.15 en mujeres ($n = 26$), observándose un incremento claro de AI en mujeres respecto a los varones no significativo.

Los valores obtenidos de AII en el grupo de sujetos con el genotipo MT son de 23.99 ± 9.85 pgr/mL en varones y 25.29 ± 12.90 en mujeres, observándose un incremento leve de AII en mujeres respecto a los varones no significativo.

Los valores obtenidos de A-(1-7) en el grupo de sujetos con el genotipo MT son de 43.87 ± 41.78 pgr/mL en varones y 24.86 ± 13.52 en mujeres, observándose un incremento importante de A-(1-7) en varones respecto a mujeres *significativo* (43.87 vs 24.86).

Los valores obtenidos de la razón AII/AI en los MT por sexos son de 0.48 ± 0.28 en varones y de 0.33 ± 0.25 en mujeres, observándose un incremento no significativo de los valores de la razón en varones respecto a mujeres.

Los valores obtenidos de la razón A-(1-7)/AI en los MT por sexos son de 0.92 ± 0.91 en varones y de 0.38 ± 0.44 en mujeres, observándose un incremento *muy significativo* de los valores de la razón en varones respecto a mujeres (0.92 vs 0.38 , $p < 0.01$).

Los valores obtenidos de la razón A-(1-7)/AII en los MT por sexos son de 1.90 ± 1.47 en varones y de 1.10 ± 0.55 en mujeres, observándose un incremento significativo de los valores de la razón en varones respecto a mujeres (1.90 vs 1.10 , $p < 0.05$).

4.7.1.c- Genotipo TT (Tabla 6.3.3 y Figs 6.1-6.6):

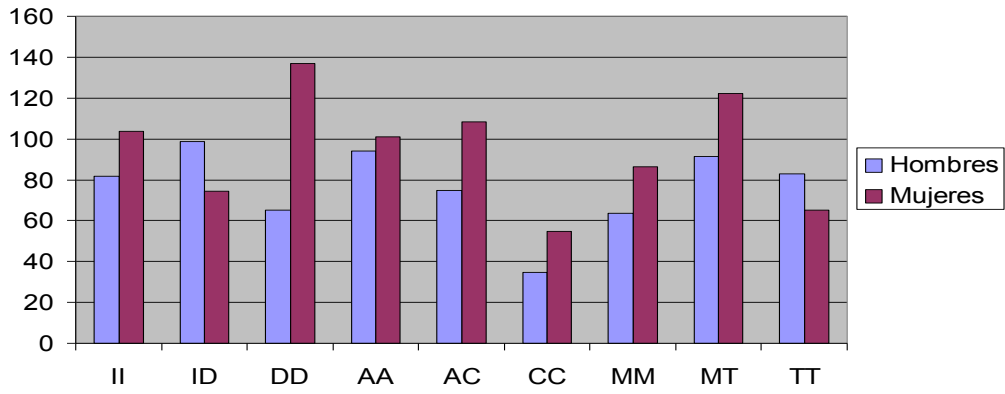
Los valores obtenidos de AI en el grupo de sujetos con el genotipo TT son de 82.87 ± 45.74 pgr/mL en varones ($n = 7$) y 65.00 ± 64.03 en mujeres ($n = 9$), observándose un incremento claro de AI en varones respecto a mujeres no significativo.

Los valores obtenidos de AII en el grupo de sujetos con el genotipo TT son de 18.54 ± 6.97 pgr/mL en varones y 18.73 ± 6.63 en mujeres, no observándose diferencias significativas entre sexos.

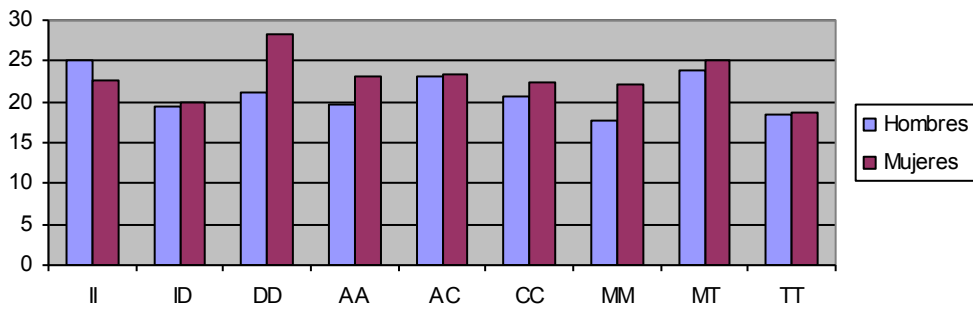
Los valores obtenidos de A-(1-7) en el grupo de sujetos con el genotipo TT son de 38.98 ± 43.97 pgr/mL en varones y 29.54 ± 20.03 en mujeres, observándose un incremento de A-(1-7) en varones respecto a mujeres no significativo.

Los valores obtenidos de la razón AII/AI en los TT por sexos son de 0.27 ± 0.16 en varones y de 0.49 ± 0.34 en mujeres, observándose un incremento no significativo de los valores de la razón en mujeres respecto a varones.

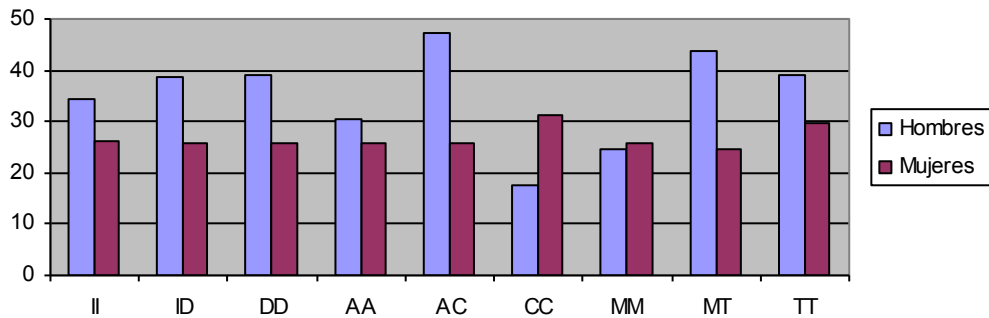
Valores Medios de AI por genotipos comparando sexos



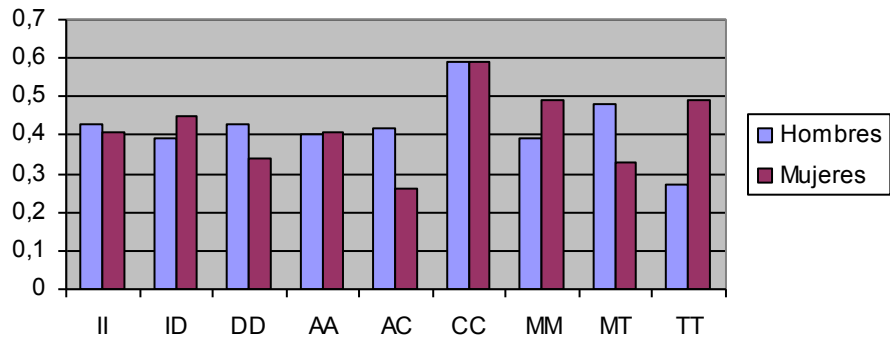
Valores Medios de All por genotipos comparando sexos



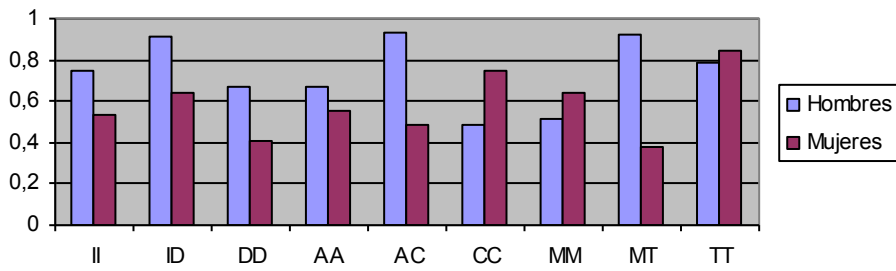
Valores Medios de A-(1-7) por genotipos comparando sexos



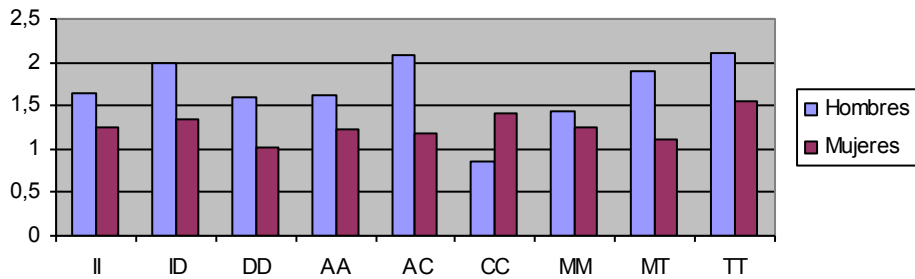
Valores Medios de AII/AI por genotipos comparando sexos



Valores Medios de A-(1-7)/AI por genotipos comparando sexos



Valores Medios de A-(1-7)/AII por genotipos comparando sexos



Los valores obtenidos de la razón A-(1-7)/AI en los TT por sexos son de 0.80 ± 1.17 en varones y de 0.85 ± 0.80 en mujeres, observándose un leve incremento no significativo de los valores de la razón en mujeres respecto a varones.

Los valores obtenidos de la razón A-(1-7)/AII en los TT por sexos son de 2.12 ± 1.76 en varones y de 1.56 ± 0.84 en mujeres, observándose un incremento no significativo de los valores de la razón en varones respecto a mujeres.

4.7.2- Polimorfismo I/D del gen de la ECA (Tabla 6.2):

4.7.2.a- Genotipo II (Tabla 6.3.4 y Figs 6.1-6.6):

Los valores obtenidos de AI en el grupo de sujetos con el genotipo II son de 81.63 ± 65.82 pgr/mL en varones (n = 10) y 103.72 ± 127.36 en mujeres (n = 16), observándose un incremento claro de AI en mujeres respecto a los varones no significativo.

Los valores obtenidos de AII en el grupo de sujetos con el genotipo II son de 25.17 ± 12.86 pgr/mL en varones y 22.73 ± 9.85 en mujeres, observándose un incremento de AII en varones respecto a las mujeres no significativo.

Los valores obtenidos de A-(1-7) en el grupo de sujetos con el genotipo II son de 34.57 ± 24.12 pgr/mL en varones y 26.27 ± 15.33 en mujeres, observándose un incremento claro no significativo de A-(1-7) en varones respecto a mujeres.

Los valores obtenidos de la razón AII/AI en los II por sexos son de 0.44 ± 0.33 en varones y de 0.41 ± 0.31 en mujeres, observándose un incremento no significativo de los valores de la razón en hombres respecto a mujeres.

Los valores obtenidos de la razón A-(1-7)/AI en los II por sexos son de 0.75 ± 0.85 en varones y de 0.53 ± 0.63 en mujeres, observándose un incremento claro no significativo de los valores de la razón en varones respecto a mujeres.

Los valores obtenidos de la razón A-(1-7)/AII en los II por sexos son de 1.65 ± 1.38 en varones y de 1.25 ± 0.68 en mujeres, observándose un incremento claro no significativo de los valores de la razón en varones respecto a mujeres.

4.4.2.b- Genotipo ID (Tabla 6.3.5 y Figs 6.1-6.6):

Los valores obtenidos de AI en el grupo de sujetos con el genotipo ID son de 98.61 ± 147.41 pgr/mL en varones ($n = 17$) y 74.39 ± 65.92 en mujeres ($n = 20$), observándose un incremento claro de AI en varones respecto a las mujeres no significativo.

Los valores obtenidos de AII en el grupo de sujetos con el genotipo ID son de 19.41 ± 7.20 pgr/mL en varones y 19.95 ± 8.12 en mujeres, no observándose diferencias significativas entre sexos.

Los valores obtenidos de A-(1-7) en el grupo de sujetos con el genotipo ID son de 38.52 ± 28.29 pgr/mL en varones y 25.94 ± 15.26 en mujeres, observándose un incremento importante de A-(1-7) en varones respecto a mujeres no significativo.

Los valores obtenidos de la razón AII/AI en los ID por sexos son de 0.40 ± 0.25 en varones y de 0.45 ± 0.36 en mujeres, observándose un incremento no significativo de los valores de la razón en mujeres respecto a hombres.

Los valores obtenidos de la razón A-(1-7)/AI en los ID por sexos son de 0.92 ± 0.94 en varones y de 0.65 ± 0.60 en mujeres, observándose un incremento no significativo de los valores de la razón en varones respecto a mujeres (0.92 vs 0.65).

Los valores obtenidos de la razón A-(1-7)/AII en los ID por sexos son de 2.00 ± 1.11 en varones y de 1.35 ± 0.54 en mujeres, observándose un incremento claro *significativo* de los valores de la razón en varones respecto a mujeres (2.00 vs 1.35).

4.4.2.c- Genotipo DD (Tabla 6.3.6 y Figs 6.1-6.6):

Los valores obtenidos de AI en el grupo de sujetos con el genotipo DD son de 65.37 ± 46.84 pgr/mL en varones ($n = 16$) y 136.73 ± 112.44 en mujeres ($n = 14$), observándose un incremento claro *significativo* de los valores de AI en mujeres respecto a varones (136.73 vs 65.37 , $p < 0.05$).

Los valores obtenidos de AII en el grupo de sujetos con el genotipo DD son de 21.16 ± 6.64 pgr/mL en varones y 28.28 ± 14.26 en mujeres, observándose un incremento de AII en mujeres respecto a varones no significativo.

Los valores obtenidos de A-(1-7) en el grupo de sujetos con el genotipo DD son de 38.95 ± 50.13 pgr/mL en varones y 25.92 ± 11.21 en mujeres, observándose un incremento claro de A-(1-7) en varones respecto a mujeres no significativo.

Los valores obtenidos de la razón AII/AI en los DD por sexos son de 0.44 ± 0.22 en varones y de 0.35 ± 0.29 en mujeres, observándose un incremento claro no significativo de los valores de la razón en varones respecto a mujeres.

Los valores obtenidos de la razón A-(1-7)/AI en los DD por sexos son de 0.67 ± 0.77 en varones y de 0.41 ± 0.45 en mujeres, observándose un incremento claro no significativo de los valores de la razón en varones respecto a mujeres.

Los valores obtenidos de la razón A-(1-7)/AII en los DD por sexos son de 1.69 ± 1.54 en varones y de 1.04 ± 0.52 en mujeres, observándose un incremento claro no significativo de los valores de la razón en varones respecto a mujeres.

4.7.3- Polimorfismo A1166C del gen del AT1 (Tabla 6.2):

4.7.3.a- Genotipo AA (Tabla 6.3.7 y Figs 6.1-6.6):

Los valores obtenidos de AI en el grupo de sujetos con el genotipo AA son de 93.92 ± 133.50 pgr/mL en varones (n = 21) y 101.19 ± 117.25 en mujeres (n = 27), observándose un incremento claro de AI en mujeres respecto a los varones no significativo.

Los valores obtenidos de AII en el grupo de sujetos con el genotipo AA son de 19.74 ± 7.43 pgr/mL en varones y 23.09 ± 12.41 en mujeres, observándose un incremento de AII en mujeres respecto a los varones no significativo.

Los valores obtenidos de A-(1-7) en el grupo de sujetos con el genotipo AA son de 30.60 ± 17.64 pgr/mL en varones y 25.73 ± 14.12 en mujeres, observándose un incremento no significativo de A-(1-7) en varones respecto a mujeres.

Los valores obtenidos de la razón AII/AI en los AA por sexos son de 0.40 ± 0.30 en varones y de 0.42 ± 0.33 en mujeres, observándose un incremento no significativo de los valores de la razón en mujeres respecto a varones.

Los valores obtenidos de la razón A-(1-7)/AI en los AA por sexos son de 0.67 ± 0.66 en varones y de 0.56 ± 0.56 en mujeres, observándose un incremento claro no significativo de los valores de la razón en varones respecto a mujeres.

Los valores obtenidos de la razón A-(1-7)/AII en los AA por sexos son de 1.63 ± 0.72 en varones y de 1.23 ± 0.52 en mujeres, observándose un incremento claro *significativo* de los valores de la razón en varones respecto a mujeres (1.63 vs 1.23).

4.7.3.b- Genotipo AC (Tabla 6.3.8 y Figs 6.1-6.6):

Los valores obtenidos de AI en el grupo de sujetos con el genotipo AC son de 74.83 ± 57.93 pgr/mL en varones ($n = 20$) y 108.27 ± 89.95 en mujeres ($n = 20$), observándose un incremento claro de AI en mujeres respecto a los varones no significativo.

Los valores obtenidos de AII en el grupo de sujetos con el genotipo AC son de 23.22 ± 10.13 pgr/mL en varones y 23.41 ± 10.00 en mujeres, no observándose diferencias significativas entre sexos.

Los valores obtenidos de A-(1-7) en el grupo de sujetos con el genotipo AC son de 47.31 ± 49.15 pgr/mL en varones y 25.65 ± 14.27 en mujeres, observándose un incremento importante de A-(1-7) en varones respecto a mujeres casi significativo (47.31 vs 25.65).

Los valores obtenidos de la razón AII/AI en los AC por sexos son de 0.42 ± 0.23 en varones y de 0.37 ± 0.32 en mujeres, observándose un incremento no significativo de los valores de la razón en hombres respecto a mujeres.

Los valores obtenidos de la razón A-(1-7)/AI en los AC por sexos son de 0.94 ± 1.04 en varones y de 0.50 ± 0.60 en mujeres, observándose un incremento no significativo de los valores de la razón en varones respecto a mujeres (0.94 vs 0.50).

Los valores obtenidos de la razón A-(1-7)/AII en los AC por sexos son de 2.08 ± 1.76 en varones y de 1.19 ± 0.68 en mujeres, observándose un incremento claro *significativo* de los valores de la razón en varones respecto a mujeres (2.08 vs 1.19 , $p < 0.05$).

4.7.3.c- Genotipo CC (Tabla 6.3.9 y Figs 6.1-6.6):

Debido al pequeño tamaño de la muestra para varones CC ($n = 2$), no se puede realizar una comparación estadística con el grupo de mujeres CC ($n = 3$).

Los valores obtenidos de AI en el grupo de sujetos con el genotipo CC son de 34.85 ± 3.32 pgr/mL en varones y 54.7 ± 42.96 en mujeres, observándose un incremento claro de los valores de AI en mujeres respecto a varones (54.7 vs 34.85).

Los valores obtenidos de AII en el grupo de sujetos con el genotipo CC son de 20.6 ± 3.53 pgr/mL en varones y 22.30 ± 3.90 en mujeres, observándose un incremento leve de AII en mujeres respecto a varones.

Los valores obtenidos de A-(1-7) en el grupo de sujetos con el genotipo CC son de 17.4 ± 1.70 pgr/mL en varones y 31.43 ± 14.76 en mujeres, observándose un incremento claro de A-(1-7) en mujeres respecto a varones.

Los valores obtenidos de la razón AII/AI en los CC por sexos son de 0.60 ± 0.16 en varones y de 0.59 ± 0.37 en mujeres, no observándose diferencias apreciables.

Los valores obtenidos de la razón A-(1-7)/AI en los CC por sexos son de 0.50 en varones y de 0.75 ± 0.57 en mujeres, observándose un incremento claro de los valores de la razón en mujeres respecto a varones.

Los valores obtenidos de la razón A-(1-7)/AII en los CC por sexos son de 0.86 ± 0.23 en varones y de 1.42 ± 0.66 en mujeres, observándose un incremento claro de los valores de la razón en mujeres respecto a varones.

5-TABLAS:

A1= Angiotensina I (AI), A2= Angiotensina (AII), A17= Angitensina A-(1-7).
AG2AG1= AII/AI, AG17AG1= A-(1-7)/AI, AG17AG2=A-(1-7)/AII

Tabla 1
Valores medios de la muestra

Estadísticos descriptivos

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.	Varianza
A1	93	23,30	630,00	92,4763	102,1154	10427,562
A2	93	6,40	65,60	22,3527	10,0018	100,036
A17	93	12,10	190,00	31,4613	27,3108	745,878
AG2AG1	93	,05444	1,41288	,4157655	,2945366	8,675E-02
AG17AG1	93	,06050	3,36207	,6571712	,7172605	,514
AG17AG2	93	,4343	5,6405	1,494544	1,032491	1,066
N válido (según lista)	93					

Tabla 2.1
Valores medios para AGT

Informe

AGT		A1	A2	A17	AG2AG1	AG17AG1	AG17AG2
MM	Media	76,2815	20,2630	25,4704	,4468646	,5840395	1,326913
	N	27	27	27	27	27	27
	Desv. típ.	65,4080	7,7089	10,5093	,3417586	,4694711	,444778
MT	Media	107,5120	24,6660	33,9880	,4051333	,6430004	1,485206
	N	50	50	50	50	50	50
	Desv. típ.	125,9189	11,4374	31,6940	,2727559	,7506608	1,152641
TT	Media	72,8188	18,6500	33,6750	,3965115	,8248646	1,806604
	N	16	16	16	16	16	16
	Desv. típ.	55,7447	6,5496	31,7925	,2899776	,9446200	1,304103

Tabla 2.2
Valores medios para ECA

Informe

ECA		A1	A2	A17	AG2AG1	AG17AG1	AG17AG2
II	Media	95,2269	23,6692	29,4654	,4219288	,6174728	1,404022
	N	26	26	26	26	26	26
	Desv. típ.	106,8275	10,9404	19,1650	,3153290	,7153097	1,003843
ID	Media	85,5216	19,7027	31,7216	,4270336	,7720579	1,645608
	N	37	37	37	37	37	37
	Desv. típ.	110,0028	7,6078	22,7800	,3139710	,7725181	,899438
DD	Media	98,6700	24,4800	32,8700	,3965268	,5498828	1,386685
	N	30	30	30	30	30	30
	Desv. típ.	90,0715	11,2751	37,4125	,2579606	,6480732	1,208489

Tabla 2.3
Valores medios para ATI

Informe

AT1		A1	A2	A17	AG2AG1	AG17AG1	AG17AG2
AA	Media	98,0083	21,6250	27,8625	,4123586	,6074157	1,404786
	N	48	48	48	48	48	48
	Desv. típ.	123,2993	10,5610	15,7672	,3129378	,6039877	,642121
AC	Media	91,5525	23,3175	36,4850	,3972250	,7176610	1,639444
	N	40	40	40	40	40	40
	Desv. típ.	76,5741	9,9351	37,3724	,2730191	,8652835	1,393419
CC	Media	46,7600	21,6200	25,8200	,5967964	,6509047	1,197022
	N	5	5	5	5	5	5
	Desv. típ.	32,3056	3,4040	12,9893	,2707615	,4241492	,571018

Tabla 2.4
Prueba t-Student: MM VS. MT

Estadísticos de grupo

AGT		N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	MM	27	76,2815	65,4080	12,5878
	MT	50	107,5120	125,9189	17,8076
A2	MM	27	20,2630	7,7089	1,4836
	MT	50	24,6660	11,4374	1,6175
A17	MM	27	25,4704	10,5093	2,0225
	MT	50	33,9880	31,6940	4,4822
AG2AG1	MM	27	,4468646	,3417586	6,577E-02
	MT	50	,4051333	,2727559	3,857E-02
AG17AG1	MM	27	,5840395	,4694711	9,035E-02
	MT	50	,6430004	,7506608	,1061595
AG17AG2	MM	27	1,326913	,444778	8,55975E-02
	MT	50	1,485206	1,152641	,163008

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

Tabla 2.5**Prueba t-Student:-Student: MM ⁽¹⁾ VS. TT ⁽³⁾****Estadísticos de grupo**

	AGT	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	1	27	76,2815	65,4080	12,5878
	3	16	72,8187	55,7447	13,9362
A2	1	27	20,2630	7,7089	1,4836
	3	16	18,6500	6,5496	1,6374
A17	1	27	25,4704	10,5093	2,0225
	3	16	33,6750	31,7925	7,9481
AG2AG1	1	27	,4468646	,3417586	6,577E-02
	3	16	,3965115	,2899776	7,249E-02
AG17AG1	1	27	,5840395	,4694711	9,035E-02
	3	16	,8248646	,9446200	,2361550
AG17AG2	1	27	1,326913	,444778	8,55975E-02
	3	16	1,806604	1,304103	,326026

* - $p < 0.05$ # - $p < 0.01$ ° - $p \approx 0.05$ **Tabla 2.6****Prueba t-Student:-Student: MT VS. TT****Estadísticos de grupo**

	AGT	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	MT	50	107,5120	125,9189	17,8076
	TT	16	72,8187	55,7447	13,9362
A2	MT*	50	24,6660	11,4374	1,6175
	TT	16	18,6500	6,5496	1,6374
A17	MT	50	33,9880	31,6940	4,4822
	TT	16	33,6750	31,7925	7,9481
AG2AG1	MT	50	,4051333	,2727559	3,857E-02
	TT	16	,3965115	,2899776	7,249E-02
AG17AG1	MT	50	,6430004	,7506608	,1061595
	TT	16	,8248646	,9446200	,2361550
AG17AG2	MT	50	1,485206	1,152641	,163008
	TT	16	1,806604	1,304103	,326026

* - $p < 0.05$ # - $p < 0.01$ ° - $p \approx 0.05$

Tabla 2.7
Prueba t-Student:-Student: II Vs. ID

Estadísticos de grupo

	ECA	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	II	26	95,2269	106,8275	20,9506
	ID	37	85,5216	110,0028	18,0844
A2	II	26	23,6692	10,9404	2,1456
	ID	37	19,7027	7,6078	1,2507
A17	II	26	29,4654	19,1650	3,7586
	ID	37	31,7216	22,7800	3,7450
AG2AG1	II	26	,4219288	,3153290	6,184E-02
	ID	37	,4270336	,3139710	5,162E-02
AG17AG1	II	26	,6174728	,7153097	,1402838
	ID	37	,7720579	,7725181	,1270012
AG17AG2	II	26	1,404022	1,003843	,196870
	ID	37	1,645608	,899438	,147867

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

Tabla 2.8
Prueba t-Student:-Student: II Vs. DD

Estadísticos de grupo

	ECA	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	II	26	95,2269	106,8275	20,9506
	DD	30	98,6700	90,0715	16,4447
A2	II	26	23,6692	10,9404	2,1456
	DD	30	24,4800	11,2751	2,0585
A17	II	26	29,4654	19,1650	3,7586
	DD	30	32,8700	37,4125	6,8306
AG2AG1	II	26	,4219288	,3153290	6,184E-02
	DD	30	,3965268	,2579606	4,710E-02
AG17AG1	II	26	,6174728	,7153097	,1402838
	DD	30	,5498828	,6480732	,1183214
AG17AG2	II	26	1,404022	1,003843	,196870
	DD	30	1,386685	1,208489	,220639

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

A1= Angiotensina I (AI), A2= Angiotensina (AII), A17= Angitensina A-(1-7).
AG2AG1= AII/AI, AG17AG1= A-(1-7)/AI, AG17AG2=A-(1-7)/AII

Tabla 2.9
Prueba t-Student:-Student: ID Vs. DD

Estadísticos de grupo

	ECA	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	ID	37	85,5216	110,0028	18,0844
	DD	30	98,6700	90,0715	16,4447
A2	ID *	37	19,7027	7,6078	1,2507
	DD	30	24,4800	11,2751	2,0585
A17	ID	37	31,7216	22,7800	3,7450
	DD	30	32,8700	37,4125	6,8306
AG2AG1	ID	37	,4270336	,3139710	5,162E-02
	DD	30	,3965268	,2579606	4,710E-02
AG17AG1	ID	37	,7720579	,7725181	,1270012
	DD	30	,5498828	,6480732	,1183214
AG17AG2	ID	37	1,645608	,899438	,147867
	DD	30	1,386685	1,208489	,220639

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

Tabla 2.10
Prueba t-Student:-Student: AA VS. AC

Estadísticos de grupo

	AT1	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	AA	48	98,0083	123,2993	17,7967
	AC	40	91,5525	76,5741	12,1074
A2	AA	48	21,6250	10,5610	1,5243
	AC	40	23,3175	9,9351	1,5709
A17	AA	48	27,8625	15,7672	2,2758
	AC	40	36,4850	37,3724	5,9091
AG2AG1	AA	48	,4123586	,3129378	4,517E-02
	AC	40	,3972250	,2730191	4,317E-02
AG17AG1	AA	48	,6074157	,6039877	8,718E-02
	AC	40	,7176610	,8652835	,1368133
AG17AG2	AA	48	1,404786	,642121	9,26821E-02
	AC	40	1,639444	1,393419	,220319

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

A1= Angiotensina I (AI), A2= Angiotensina (All), A17= Angitensina A-(1-7).
AG2AG1= All/AI, AG17AG1= A-(1-7)/AI, AG17AG2=A-(1-7)/All

Tabla 2.11
Prueba t-Student:-Student: AA VS. CC

Estadísticos de grupo

	AT1	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	AA	48	98,0083	123,2993	17,7967
	CC	5	46,7600	32,3056	14,4475
A2	AA	48	21,6250	10,5610	1,5243
	CC	5	21,6200	3,4040	1,5223
A17	AA	48	27,8625	15,7672	2,2758
	CC	5	25,8200	12,9893	5,8090
AG2AG1	AA	48	,4123586	,3129378	4,517E-02
	CC	5	,5967964	,2707615	,1210882
AG17AG1	AA	48	,6074157	,6039877	8,718E-02
	CC	5	,6509047	,4241492	,1896853
AG17AG2	AA	48	1,404786	,642121	9,26821E-02
	CC	5	1,197022	,571018	,255367

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

Tabla 2.12
Prueba t-Student:-Student: AC VS. CC

Estadísticos de grupo

	AT1	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	AC	40	91,5525	76,5741	12,1074
	CC *	5	46,7600	32,3056	14,4475
A2	AC	40	23,3175	9,9351	1,5709
	CC	5	21,6200	3,4040	1,5223
A17	AC	40	36,4850	37,3724	5,9091
	CC	5	25,8200	12,9893	5,8090
AG2AG1	AC	40	,3972250	,2730191	4,317E-02
	CC	5	,5967964	,2707615	,1210882
AG17AG1	AC	40	,7176610	,8652835	,1368133
	CC	5	,6509047	,4241492	,1896853
AG17AG2	AC	40	1,639444	1,393419	,220319
	CC	5	1,197022	,571018	,255367

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

A1= Angiotensina I (AI), A2= Angiotensina (All), A17= Angitensina A-(1-7).
 AG2AG1= All/AI, AG17AG1= A-(1-7)/AI, AG17AG2=A-(1-7)/All

Tabla 4.1
Valores medios de los Hombres

SEXO		AI	AII	A-(1-7)	AII/AI	AI/A-(1-7)	AII/A-(1-7)
HOMBRE	MEDIA	82.29	21.39	37.76	0.42	0.79	1.80
	N	43	43	43	43	43	43
	D. TIP	101.02	8.71	36.47	36.47	0.85	1.32

Tabla 4.2
Valores medios de los Hombres por genotipos

A1 A2 A17 AG2AG1 AG17AG1 AG17AG2 * ECA

ECA		A1	A2	A17	AG2AG1	AG17AG1	AG17AG2
II	Media	81,6300	25,1700	34,5700	,4372627	,7535561	1,655697
	N	10	10	10	10	10	10
	Desv. típ.	65,8258	12,8631	24,1179	,3359457	,8554369	1,381012
ID	Media	98,6118	19,4059	38,5176	,3984182	,9166729	1,998384
	N	17	17	17	17	17	17
	Desv. típ.	147,4085	7,1908	28,2904	,2551054	,9370644	1,107508
DD	Media	65,3687	21,1562	38,9500	,4384301	,6705652	1,690534
	N	16	16	16	16	16	16
	Desv. típ.	46,8366	6,6447	50,1262	,2259633	,7738501	1,542768

A1 A2 A17 AG2AG1 AG17AG1 AG17AG2 * AT1

AT1		A1	A2	A17	AG2AG1	AG17AG1	AG17AG2
AA	Media	93,9190	19,7381	30,6000	,4027454	,6702478	1,627679
	N	21	21	21	21	21	21
	Desv. típ.	133,5030	7,4260	17,6366	,2974503	,6618773	,725770
AC	Media	74,8300	23,2200	47,3150	,4252819	,9387189	2,083393
	N	20	20	20	20	20	20
	Desv. típ.	57,9288	10,1268	49,1554	,2264020	1,0376623	1,762065
CC	Media	34,8500	20,6000	17,4000	,5986642	,4992308	,864462
	N	2	2	2	2	2	2
	Desv. típ.	3,3234	3,5355	1,6971	,1585405	1,09E-03	,230747

A1 A2 A17 AG2AG1 AG17AG1 AG17AG2 * AGT

AGT		A1	A2	A17	AG2AG1	AG17AG1	AG17AG2
MM	Media	63,5083	17,8833	24,8333	,3914787	,5110124	1,432402
	N	12	12	12	12	12	12
	Desv. típ.	46,6283	5,2312	10,4771	,2342794	,3497477	,493456
MT	Media	91,5167	23,9875	43,8667	,4808311	,9221687	1,898193
	N	24	24	24	24	24	24
	Desv. típ.	129,5369	9,8475	41,7791	,2828834	,9125651	1,469203
TT	Media	82,8714	18,5429	38,9857	,2747041	,7976922	2,118941
	N	7	7	7	7	7	7
	Desv. típ.	45,7435	6,9735	43,9692	,1573679	1,1746837	1,764021

A1= Angiotensina I (AI), A2= Angiotensina (AII), A17= Angitensina A-(1-7).
AG2AG1= AII/AI, AG17AG1= A-(1-7)/AI, AG17AG2=A-(1-7)/AII

Tabla 4.3.1
Prueba t-Student: HOMBRES MM VS. MT

Estadísticos de grupo

	AGT	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	MM	12	63,5083	46,6283	13,4604
	MT	24	91,5167	129,5369	26,4416
A2	MM	12	17,8833	5,2312	1,5101
	MT *	24	23,9875	9,8475	2,0101
A17	MM	12	24,8333	10,4771	3,0245
	MT *	24	43,8667	41,7791	8,5281
AG2AG1	MM	12	,3914787	,2342794	6,763E-02
	MT	24	,4808311	,2828834	5,774E-02
AG17AG1	MM	12	,5110124	,3497477	,1009635
	MT	24	,9221687	,9125651	,1862766
AG17AG2	MM	12	1,432402	,493456	,142449
	MT	24	1,898193	1,469203	,299900

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

Tabla 4.3.2
Prueba t-Student: HOMBRES MM VS. TT

Estadísticos de grupo

	AGT	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	MM	12	63,5083	46,6283	13,4604
	TT	7	82,8714	45,7435	17,2894
A2	MM	12	17,8833	5,2312	1,5101
	TT	7	18,5429	6,9735	2,6357
A17	MM	12	24,8333	10,4771	3,0245
	TT	7	38,9857	43,9692	16,6188
AG2AG1	MM	12	,3914787	,2342794	6,763E-02
	TT	7	,2747041	,1573679	5,948E-02
AG17AG1	MM	12	,5110124	,3497477	,1009635
	TT	7	,7976922	1,1746837	,4439887
AG17AG2	MM	12	1,432402	,493456	,142449
	TT	7	2,118941	1,764021	,666737

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

Tabla 4.3.3
Prueba t-Student: HOMBRES MT VS. TT

Estadísticos de grupo

	AGT	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	MT	24	91,5167	129,5369	26,4416
	TT	7	82,8714	45,7435	17,2894
A2	MT	24	23,9875	9,8475	2,0101
	TT	7	18,5429	6,9735	2,6357
A17	MT	24	43,8667	41,7791	8,5281
	TT	7	38,9857	43,9692	16,6188
AG2AG1	MT	24	,4808311	,2828834	5,774E-02
	TT	7	,2747041	,1573679	5,948E-02
AG17AG1	MT	24	,9221687	,9125651	,1862766
	TT	7	,7976922	1,1746837	,4439887
AG17AG2	MT	24	1,898193	1,469203	,299900
	TT	7	2,118941	1,764021	,666737

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

Tabla 4.3.4
Prueba t-Student: HOMBRES II VS. ID

Estadísticos de grupo

	ECA	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	II	10	81,6300	65,8258	20,8160
	ID	17	98,6118	147,4085	35,7518
A2	II	10	25,1700	12,8631	4,0677
	ID	17	19,4059	7,1908	1,7440
A17	II	10	34,5700	24,1179	7,6267
	ID	17	38,5176	28,2904	6,8614
AG2AG1	II	10	,4372627	,3359457	,1062354
	ID	17	,3984182	,2551054	6,187E-02
AG17AG1	II	10	,7535561	,8554369	,2705129
	ID	17	,9166729	,9370644	,2272715
AG17AG2	II	10	1,655697	1,381012	,436714
	ID	17	1,998384	1,107508	,268610

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

Tabla 4.3.5
Prueba t-Student: HOMBRES II VS. DD

Estadísticos de grupo

	ECA	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	II	10	81,6300	65,8258	20,8160
	DD	16	65,3688	46,8366	11,7091
A2	II	10	25,1700	12,8631	4,0677
	DD	16	21,1563	6,6447	1,6612
A17	II	10	34,5700	24,1179	7,6267
	DD	16	38,9500	50,1262	12,5315
AG2AG1	II	10	,4372627	,3359457	,1062354
	DD	16	,4384301	,2259633	5,649E-02
AG17AG1	II	10	,7535561	,8554369	,2705129
	DD	16	,6705652	,7738501	,1934625
AG17AG2	II	10	1,655697	1,381012	,436714
	DD	16	1,690534	1,542768	,385692

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

Tabla 4.3.6
Prueba t-Student: HOMBRES ID VS. DD

Estadísticos de grupo

	ECA	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	ID	17	98,6118	147,4085	35,7518
	DD	16	65,3688	46,8366	11,7091
A2	ID	17	19,4059	7,1908	1,7440
	DD	16	21,1563	6,6447	1,6612
A17	ID	17	38,5176	28,2904	6,8614
	DD	16	38,9500	50,1262	12,5315
AG2AG1	ID	17	,3984182	,2551054	6,187E-02
	DD	16	,4384301	,2259633	5,649E-02
AG17AG1	ID	17	,9166729	,9370644	,2272715
	DD	16	,6705652	,7738501	,1934625
AG17AG2	ID	17	1,998384	1,107508	,268610
	DD	16	1,690534	1,542768	,385692

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

A1= Angiotensina I (AI), A2= Angiotensina (All), A17= Angitensina A-(1-7).
AG2AG1= All/AI, AG17AG1= A-(1-7)/AI, AG17AG2=A-(1-7)/All

Tabla 4.3.7

Prueba t-Student: HOMBRES AA VS. AC

Estadísticos de grupo

	AT1	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	AA	21	93,9190	133,5030	29,1327
	AC	20	74,8300	57,9288	12,9533
A2	AA	21	19,7381	7,4260	1,6205
	AC	20	23,2200	10,1268	2,2644
A17	AA	21	30,6000	17,6366	3,8486
	AC	20	47,3150	49,1554	10,9915
AG2AG1	AA	21	,4027454	,2974503	6,491E-02
	AC	20	,4252819	,2264020	5,063E-02
AG17AG1	AA	21	,6702478	,6618773	,1444335
	AC	20	,9387189	1,0376623	,2320284
AG17AG2	AA	21	1,627679	,725770	,158376
	AC	20	2,083393	1,762065	,394010

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

Tabla 4.3.8

Prueba t-Student: HOMBRES AA VS. CC

Estadísticos de grupo

	AT1	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	AA	21	93,9190	133,5030	29,1327
	CC	2	34,8500	3,3234	2,3500
A2	AA	21	19,7381	7,4260	1,6205
	CC	2	20,6000	3,5355	2,5000
A17	AA	21	30,6000	17,6366	3,8486
	CC	2	17,4000	1,6971	1,2000
AG2AG1	AA	21	,4027454	,2974503	6,491E-02
	CC	2	,5986642	,1585405	,1121050
AG17AG1	AA	21	,6702478	,6618773	,1444335
	CC	2	,4992308	1,0879E-03	7,692E-04
AG17AG2	AA	21	1,627679	,725770	,158376
	CC	2	,864462	,230747	,163163

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

A1= Angiotensina I (AI), A2= Angiotensina (AII), A17= Angitensina A-(1-7).
AG2AG1= AII/AI, AG17AG1= A-(1-7)/AI, AG17AG2=A-(1-7)/AII

Tabla 4.3.9
Prueba t-Student: HOMBRES AC VS. CC

Estadísticos de grupo

AT1	N	Media	Desviación tıp.	Error tıp. de la media
A1 AC #	20	74,8300	* 57,9288	12,9533
CC	2	34,8500	3,3234	2,3500
A2 AC	20	23,2200	10,1268	2,2644
CC	2	20,6000	3,5355	2,5000
A17 AC	20	47,3150	49,1554	10,9915
CC	2	17,4000	1,6971	1,2000
AG2AG1 AC	20	,4252819	,2264020	5,063E-02
CC	2	,5986642	,1585405	,1121050
AG17AG1 AC	20	,9387189	1,0376623	,2320284
CC	2	,4992308	1,0879E-03	7,692E-04
AG17AG2 AC *	20	2,083393	1,762065	,394010
CC	2	,864462	,230747	,163163

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

Tabla 5.1
Valores medios en Mujeres

SEXO		AI	AII	A-(1-7)	AII/AI	AI/A-(1-7)	AII/A-(1-7)
MUJER	MEDIA	101.23	23.17	26.04	0.41	0.54	1.23
	N	50	50	50	50	50	50
	D. TIP	103.25	11.01	13.98	0.32	0.57	0.58

Tabla 5.2
Valores medios de las Mujeres por genotipos

A1 A2 A17 AG2AG1 AG17AG1 AG17AG2 * ECA

ECA		A1	A2	A17	AG2AG1	AG17AG1	AG17AG2
II	Media	103,7250	22,7313	26,2750	,4123452	,5324207	1,246725
	N	16	16	16	16	16	16
	Desv. típ.	127,3581	9,8880	15,3275	,3126503	,6274191	,683057
ID	Media	74,3950	19,9550	25,9450	,4513566	,6491352	1,345748
	N	20	20	20	20	20	20
	Desv. típ.	65,9206	8,1226	15,2581	,3614144	,5972334	,542141
DD	Media	136,7286	28,2786	25,9214	,3486372	,4119602	1,039428
	N	14	14	14	14	14	14
	Desv. típ.	112,4368	14,2658	11,2121	,2913726	,4555609	,517799

A1 A2 A17 AG2AG1 AG17AG1 AG17AG2 * AT1

AT1		A1	A2	A17	AG2AG1	AG17AG1	AG17AG2
AA	Media	101,1889	23,0926	25,7333	,4198356	,5585463	1,231424
	N	27	27	27	27	27	27
	Desv. típ.	117,2510	12,4132	14,1199	,3299026	,5628442	,518480
AC	Media	108,2750	23,4150	25,6550	,3691680	,4966032	1,195495
	N	20	20	20	20	20	20
	Desv. típ.	89,9518	10,0018	14,2733	,3163652	,5976765	,682367
CC	Media	54,7000	22,3000	31,4333	,5955512	,7520206	1,418729
	N	3	3	3	3	3	3
	Desv. típ.	42,9578	3,8974	14,7595	,3661286	,5669770	,664208

A1 A2 A17 AG2AG1 AG17AG1 AG17AG2 * AGT

AGT		A1	A2	A17	AG2AG1	AG17AG1	AG17AG2
MM	Media	86,5000	22,1667	25,9800	,4911734	,6424611	1,242521
	N	15	15	15	15	15	15
	Desv. típ.	77,3642	8,9514	10,8737	,4111619	,5522507	,398627
MT	Media	122,2769	25,2923	24,8692	,3352585	,3853067	1,103987
	N	26	26	26	26	26	26
	Desv. típ.	123,1549	12,8969	13,5214	,2482253	,4409204	,550700
TT	Media	65,0000	18,7333	29,5444	,4912506	,8459986	1,563674
	N	9	9	9	9	9	9
	Desv. típ.	64,0309	6,6289	20,0334	,3406021	,7981327	,838573

A1= Angiotensina I (AI), A2= Angiotensina (AII), A17= Angitensina A-(1-7).
AG2AG1= AII/AI, AG17AG1= A-(1-7)/AI, AG17AG2=A-(1-7)/AII

5.3.1

Prueba t-Student: MUJERES MM ⁽¹⁾ VS. MT ⁽²⁾

Estadísticos de grupo

	AGT	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	1	15	86,5000	77,3642	19,9753
	2	26	122,2769	123,1549	24,1527
A2	1	15	22,1667	8,9514	2,3112
	2	26	25,2923	12,8969	2,5293
A17	1	15	25,9800	10,8737	2,8076
	2	26	24,8692	13,5214	2,6518
AG2AG1	1	15	,4911734	,4111619	,1061615
	2	26	,3352585	,2482253	4,868E-02
AG17AG1	1	15	,6424611	,5522507	,1425905
	2	26	,3853067	,4409204	8,647E-02
AG17AG2	1	15	1,242521	,398627	,102925
	2	26	1,103987	,550700	,108001

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

Tabla 5.3.2

Prueba t-Student: MUJERES MM VS. TT

Estadísticos de grupo

	AGT	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	MM	15	86,5000	77,3642	19,9753
	TT	9	65,0000	64,0309	21,3436
A2	MM	15	22,1667	8,9514	2,3112
	TT	9	18,7333	6,6289	2,2096
A17	MM	15	25,9800	10,8737	2,8076
	TT	9	29,5444	20,0334	6,6778
AG2AG1	MM	15	,4911734	,4111619	,1061615
	TT	9	,4912506	,3406021	,1135340
AG17AG1	MM	15	,6424611	,5522507	,1425905
	TT	9	,8459986	,7981327	,2660442
AG17AG2	MM	15	1,242521	,398627	,102925
	TT	9	1,563674	,838573	,279524

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

A1= Angiotensina I (AI), A2= Angiotensina (All), A17= Angitensina A-(1-7).
AG2AG1= All/AI, AG17AG1= A-(1-7)/AI, AG17AG2=A-(1-7)/All

Tabla 5.3.3
Prueba t-Student: MUJERES MT VS. TT

Estadísticos de grupo

	AGT	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	MT	26	122,2769	123,1549	24,1527
	TT	9	65,0000	64,0309	21,3436
A2	MT	26	25,2923	12,8969	2,5293
	TT	9	18,7333	6,6289	2,2096
A17	MT	26	24,8692	13,5214	2,6518
	TT	9	29,5444	20,0334	6,6778
AG2AG1	MT	26	,3352585	,2482253	4,868E-02
	TT	9	,4912506	,3406021	,1135340
AG17AG1	MT	26	,3853067	,4409204	8,647E-02
	TT	9	,8459986	,7981327	,2660442
AG17AG2	MT	26	1,103987	,550700	,108001
	TT	9	1,563674	,838573	,279524

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

Tabla 5.3.4
Prueba t-Student: MUJERES II VS. ID

Estadísticos de grupo

	ECA	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	II	16	103,7250	127,3581	31,8395
	ID	20	74,3950	65,9206	14,7403
A2	II	16	22,7313	9,8880	2,4720
	ID	20	19,9550	8,1226	1,8163
A17	II	16	26,2750	15,3275	3,8319
	ID	20	25,9450	15,2581	3,4118
AG2AG1	II	16	,4123452	,3126503	7,816E-02
	ID	20	,4513566	,3614144	8,081E-02
AG17AG1	II	16	,5324207	,6274191	,1568548
	ID	20	,6491352	,5972334	,1335454
AG17AG2	II	16	1,246725	,683057	,170764
	ID	20	1,345748	,542141	,121226

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

A1= Angiotensina I (AI), A2= Angiotensina (All), A17= Angitensina A-(1-7).
AG2AG1= All/AI, AG17AG1= A-(1-7)/AI, AG17AG2=A-(1-7)/All

Tabla 5.3.5
Prueba t-Student: MUJERES II VS. DD

Estadísticos de grupo

	ECA	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	II	16	103,7250	127,3581	31,8395
	DD	14	136,7286	112,4368	30,0500
A2	II	16	22,7313	9,8880	2,4720
	DD	14	28,2786	14,2658	3,8127
A17	II	16	26,2750	15,3275	3,8319
	DD	14	25,9214	11,2121	2,9966
AG2AG1	II	16	,4123452	,3126503	7,816E-02
	DD	14	,3486372	,2913726	7,787E-02
AG17AG1	II	16	,5324207	,6274191	,1568548
	DD	14	,4119602	,4555609	,1217538
AG17AG2	II	16	1,246725	,683057	,170764
	DD	14	1,039428	,517799	,138388

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

Tabla 5.3.6
Prueba t-Student: MUJERES ID VS. DD

Estadísticos de grupo

	ECA	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	ID *	20	74,3950	65,9206	14,7403
	DD	14	136,7286	112,4368	30,0500
A2	ID *	20	19,9550	8,1226	1,8163
	DD	14	28,2786	14,2658	3,8127
A17	ID	20	25,9450	15,2581	3,4118
	DD	14	25,9214	11,2121	2,9966
AG2AG1	ID	20	,4513566	,3614144	8,081E-02
	DD	14	,3486372	,2913726	7,787E-02
AG17AG1	ID	20	,6491352	,5972334	,1335454
	DD	14	,4119602	,4555609	,1217538
AG17AG2	ID	20	1,345748	,542141	,121226
	DD	14	1,039428	,517799	,138388

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

A1= Angiotensina I (AI), A2= Angiotensina (All), A17= Angitensina A-(1-7).
AG2AG1= All/AI, AG17AG1= A-(1-7)/AI, AG17AG2=A-(1-7)/All

Tabla 5.3.7
Prueba t-Student: MUJERES AA VS. AC

Estadísticos de grupo

	AT1	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	AA	27	101,1889	117,2510	22,5650
	AC	20	108,2750	89,9518	20,1138
A2	AA	27	23,0926	12,4132	2,3889
	AC	20	23,4150	10,0018	2,2365
A17	AA	27	25,7333	14,1199	2,7174
	AC	20	25,6550	14,2733	3,1916
AG2AG1	AA	27	,4198356	,3299026	6,349E-02
	AC	20	,3691680	,3163652	7,074E-02
AG17AG1	AA	27	,5585463	,5628442	,1083194
	AC	20	,4966032	,5976765	,1336445
AG17AG2	AA	27	1,231424	,518480	9,97815E-02
	AC	20	1,195495	,682367	,152582

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

Tabla 5.3.8
Prueba t-Student: MUJERES AA VS. CC

Estadísticos de grupo

	AT1	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	AA	27	101,1889	117,2510	22,5650
	CC	3	54,7000	42,9578	24,8017
A2	AA	27	23,0926	12,4132	2,3889
	CC	3	22,3000	3,8974	2,2502
A17	AA	27	25,7333	14,1199	2,7174
	CC	3	31,4333	14,7595	8,5214
AG2AG1	AA	27	,4198356	,3299026	6,349E-02
	CC	3	,5955512	,3661286	,2113845
AG17AG1	AA	27	,5585463	,5628442	,1083194
	CC	3	,7520206	,5669770	,3273443
AG17AG2	AA	27	1,231424	,518480	9,97815E-02
	CC	3	1,418729	,664208	,383481

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

A1= Angiotensina I (AI), A2= Angiotensina (AII), A17= Angitensina A-(1-7).
AG2AG1= AII/AI, AG17AG1= A-(1-7)/AI, AG17AG2=A-(1-7)/AII

Tabla 5.3.9
Prueba t-Student: MUJERES AC VS. CC

Estadísticos de grupo

AT1	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1 AC	20	108,2750	89,9518	20,1138
A1 CC	3	54,7000	42,9578	24,8017
A2 AC	20	23,4150	10,0018	2,2365
A2 CC	3	22,3000	3,8974	2,2502
A17 AC	20	25,6550	14,2733	3,1916
A17 CC	3	31,4333	14,7595	8,5214
AG2AG1 AC	20	,3691680	,3163652	7,074E-02
AG2AG1 CC	3	,5955512	,3661286	,2113845
AG17AG1 AC	20	,4966032	,5976765	,1336445
AG17AG1 CC	3	,7520206	,5669770	,3273443
AG17AG2 AC	20	1,195495	,682367	,152582
AG17AG2 CC	3	1,418729	,664208	,383481

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

Tabla 6.1
Valores medios por sexos

Informe

SEXO	A1	A2	A17	AG2AG1	AG17AG1	AG17AG2
Hombre	82,2930	21,3977	37,7605	,4223400	,7871638	1,804141
	43	43	43	43	43	43
	101,0286	8,7143	36,4706	,2599901	,8470115	1,323417
Mujer	101,2340	23,1740	26,0440	,4101115	,5453775	1,228291
	50	50	50	50	50	50
	103,2489	11,0111	13,9846	,3238394	,5686908	,586396

Tabla 6.2
Valores medios Sexo-Genotipos

A1 A2 A17 AG2AG1 AG17AG1 AG17AG2 * SEXO * ECA

SEXO	ECA		A1	A2	A17	AG2AG1	AG17AG1	AG17AG2
HOMBRE	II	Media	81,6300	25,1700	34,5700	,4372627	,7535561	1,655697
		N	10	10	10	10	10	10
		Desv. típ.	65,8258	12,8631	24,1179	,3359457	,8554369	1,381012
	ID	Media	98,6118	19,4059	38,5176	,3984182	,9166729	1,998384
		N	17	17	17	17	17	17
		Desv. típ.	147,4085	7,1908	28,2904	,2551054	,9370644	1,107508
	DD	Media	65,3687	21,1562	38,9500	,4384301	,6705652	1,690534
		N	16	16	16	16	16	16
		Desv. típ.	46,8366	6,6447	50,1262	,2259633	,7738501	1,542768
MUJER	II	Media	103,7250	22,7313	26,2750	,4123452	,5324207	1,246725
		N	16	16	16	16	16	16
		Desv. típ.	127,3581	9,8880	15,3275	,3126503	,6274191	,683057
	ID	Media	74,3950	19,9550	25,9450	,4513566	,6491352	1,345748
		N	20	20	20	20	20	20
		Desv. típ.	65,9206	8,1226	15,2581	,3614144	,5972334	,542141
	DD	Media	136,7286	28,2786	25,9214	,3486372	,4119602	1,039428
		N	14	14	14	14	14	14
		Desv. típ.	112,4368	14,2658	11,2121	,2913726	,4555609	,517799

A1 A2 A17 AG2AG1 AG17AG1 AG17AG2 * SEXO * AT1

SEXO	AT1		A1	A2	A17	AG2AG1	AG17AG1	AG17AG2
HOMBRE	AA	Media	93,9190	19,7381	30,6000	,4027454	,6702478	1,627679
		N	21	21	21	21	21	21
		Desv. típ.	133,5030	7,4260	17,6366	,2974503	,6618773	,725770
	AC	Media	74,8300	23,2200	47,3150	,4252819	,9387189	2,083393
		N	20	20	20	20	20	20
		Desv. típ.	57,9288	10,1268	49,1554	,2264020	1,0376623	1,762065
	CC	Media	34,8500	20,6000	17,4000	,5986642	,4992308	,864462
		N	2	2	2	2	2	2
		Desv. típ.	3,3234	3,5355	1,6971	,1585405	1,09E-03	,230747
MUJER	AA	Media	101,1889	23,0926	25,7333	,4198356	,5585463	1,231424
		N	27	27	27	27	27	27
		Desv. típ.	117,2510	12,4132	14,1199	,3299026	,5628442	,518480
	AC	Media	108,2750	23,4150	25,6550	,3691680	,4966032	1,195495
		N	20	20	20	20	20	20
		Desv. típ.	89,9518	10,0018	14,2733	,3163652	,5976765	,682367
	CC	Media	54,7000	22,3000	31,4333	,5955512	,7520206	1,418729
		N	3	3	3	3	3	3
		Desv. típ.	42,9578	3,8974	14,7595	,3661286	,5669770	,664208

A1 A2 A17 AG2AG1 AG17AG1 AG17AG2 * SEXO * AGT

SEXO	AGT		A1	A2	A17	AG2AG1	AG17AG1	AG17AG2
HOMBRE	MM	Media	63,5083	17,8833	24,8333	,3914787	,5110124	1,432402
		N	12	12	12	12	12	12
		Desv. típ.	46,6283	5,2312	10,4771	,2342794	,3497477	,493456
	MT	Media	91,5167	23,9875	43,8667	,4808311	,9221687	1,898193
		N	24	24	24	24	24	24
		Desv. típ.	129,5369	9,8475	41,7791	,2828834	,9125651	1,469203
	TT	Media	82,8714	18,5429	38,9857	,2747041	,7976922	2,118941
		N	7	7	7	7	7	7
		Desv. típ.	45,7435	6,9735	43,9692	,1573679	1,1746837	1,764021
MUJER	MM	Media	86,5000	22,1667	25,9800	,4911734	,6424611	1,242521
		N	15	15	15	15	15	15
		Desv. típ.	77,3642	8,9514	10,8737	,4111619	,5522507	,398627
	MT	Media	122,2769	25,2923	24,8692	,3352585	,3853067	1,103987
		N	26	26	26	26	26	26
		Desv. típ.	123,1549	12,8969	13,5214	,2482253	,4409204	,550700
	TT	Media	65,0000	18,7333	29,5444	,4912506	,8459986	1,563674
		N	9	9	9	9	9	9
		Desv. típ.	64,0309	6,6289	20,0334	,3406021	,7981327	,838573

Tabla 6.3.1

Prueba t-Student: MM : HOMBRE ⁽¹⁾ VS. MUJER ⁽²⁾

Estadísticos de grupo

	SEXO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	1	12	63,5083	46,6283	13,4604
	2	15	86,5000	77,3642	19,9753
A2	1	12	17,8833	5,2312	1,5101
	2	15	22,1667	8,9514	2,3112
A17	1	12	24,8333	10,4771	3,0245
	2	15	25,9800	10,8737	2,8076
AG2AG1	1	12	,3914787	,2342794	6,763E-02
	2	15	,4911734	,4111619	,1061615
AG17AG1	1	12	,5110124	,3497477	,1009635
	2	15	,6424611	,5522507	,1425905
AG17AG2	1	12	1,432402	,493456	,142449
	2	15	1,242521	,398627	,102925

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

Tabla 6.3.2

Prueba t-Student: MT: HOMBRE ⁽¹⁾ VS. MUJER ⁽²⁾

Estadísticos de grupo

	SEXO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	1	24	91,5167	129,5369	26,4416
	2	26	122,2769	123,1549	24,1527
A2	1	24	23,9875	9,8475	2,0101
	2	26	25,2923	12,8969	2,5293
A17	1	24	43,8667	41,7791	8,5281
	2 *	26	24,8692	13,5214	2,6518
AG2AG1	1	24	,4808311	,2828834	5,774E-02
	2	26	,3352585	,2482253	4,868E-02
AG17AG1	1 #	24	,9221687	,9125651	,1862766
	2	26	,3853067	,4409204	8,647E-02
AG17AG2	1 *	24	1,898193	1,469203	,299900
	2	26	1,103987	,550700	,108001

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

Tabla 6.3.3
Prueba t-Student: TT: HOMBRE (1) VS. MUJER (2)

Estadísticos de grupo

	SEXO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	1	7	82,8714	45,7435	17,2894
	2	9	65,0000	64,0309	21,3436
A2	1	7	18,5429	6,9735	2,6357
	2	9	18,7333	6,6289	2,2096
A17	1	7	38,9857	43,9692	16,6188
	2	9	29,5444	20,0334	6,6778
AG2AG1	1	7	,2747041	,1573679	5,948E-02
	2	9	,4912506	,3406021	,1135340
AG17AG1	1	7	,7976922	1,1746837	,4439887
	2	9	,8459986	,7981327	,2660442
AG17AG2	1	7	2,118941	1,764021	,666737
	2	9	1,563674	,838573	,279524

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

Tabla 6.3.4
Prueba t-Student: II: HOMBRE (1) VS. MUJER (2)

Estadísticos de grupo

	SEXO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	1	10	81,6300	65,8258	20,8160
	2	16	103,7250	127,3581	31,8395
A2	1	10	25,1700	12,8631	4,0677
	2	16	22,7313	9,8880	2,4720
A17	1	10	34,5700	24,1179	7,6267
	2	16	26,2750	15,3275	3,8319
AG2AG1	1	10	,4372627	,3359457	,1062354
	2	16	,4123452	,3126503	7,816E-02
AG17AG1	1	10	,7535561	,8554369	,2705129
	2	16	,5324207	,6274191	,1568548
AG17AG2	1	10	1,655697	1,381012	,436714
	2	16	1,246725	,683057	,170764

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

Tabla 6.3.5
Prueba t-Student: ID: HOMBRE (1) VS. MUJER (2)

Estadísticos de grupo

	SEXO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	1	17	98,6118	147,4085	35,7518
	2	20	74,3950	65,9206	14,7403
A2	1	17	19,4059	7,1908	1,7440
	2	20	19,9550	8,1226	1,8163
A17	1	17	38,5176	28,2904	6,8614
	2	20	25,9450	15,2581	3,4118
AG2AG1	1	17	,3984182	,2551054	6,187E-02
	2	20	,4513566	,3614144	8,081E-02
AG17AG1	1	17	,9166729	,9370644	,2272715
	2	20	,6491352	,5972334	,1335454
AG17AG2	1	17	1,998384	1,107508	,268610
	2	20	1,345748	,542141	,121226

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

Tabla 6.3.6
Prueba t-Student: DD: HOMBRE (1) VS. MUJER (2)

Estadísticos de grupo

	SEXO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	1	16	65,3688	46,8366	11,7091
	2	14	136,7286	112,4368	30,0500
A2	1	16	21,1563	6,6447	1,6612
	2	14	28,2786	14,2658	3,8127
A17	1	16	38,9500	50,1262	12,5315
	2	14	25,9214	11,2121	2,9966
AG2AG1	1	16	,4384301	,2259633	5,649E-02
	2	14	,3486372	,2913726	7,787E-02
AG17AG1	1	16	,6705652	,7738501	,1934625
	2	14	,4119602	,4555609	,1217538
AG17AG2	1	16	1,690534	1,542768	,385692
	2	14	1,039428	,517799	,138388

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

Tabla 6.3.7
Prueba t-Student: AA: HOMBRE (1) VS. MUJER (2)

Estadísticos de grupo

	SEXO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	1	21	93,9190	133,5030	29,1327
	2	27	101,1889	117,2510	22,5650
A2	1	21	19,7381	7,4260	1,6205
	2	27	23,0926	12,4132	2,3889
A17	1	21	30,6000	17,6366	3,8486
	2	27	25,7333	14,1199	2,7174
AG2AG1	1	21	,4027454	,2974503	6,491E-02
	2	27	,4198356	,3299026	6,349E-02
AG17AG1	1	21	,6702478	,6618773	,1444335
	2	27	,5585463	,5628442	,1083194
AG17AG2	1	21	1,627679	,725770	,158376
	2	27	1,231424	,518480	9,97815E-02

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

Tabla 6.3.8
Prueba t-Student: AC: HOMBRE (1) VS. MUJER (2)

Estadísticos de grupo

	SEXO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	1	20	74,8300	57,9288	12,9533
	2	20	108,2750	89,9518	20,1138
A2	1	20	23,2200	10,1268	2,2644
	2	20	23,4150	10,0018	2,2365
A17	1	20	47,3150	49,1554	10,9915
	2	20	25,6550	14,2733	3,1916
AG2AG1	1	20	,4252819	,2264020	5,063E-02
	2	20	,3691680	,3163652	7,074E-02
AG17AG1	1	20	,9387189	1,0376623	,2320284
	2	20	,4966032	,5976765	,1336445
AG17AG2	1	20	2,083393	1,762065	,394010
	2	20	1,195495	,682367	,152582

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

Tabla 6.3.9

Prueba t-Student: CC: HOMBRE ⁽¹⁾ VS. MUJER ⁽²⁾

Estadísticos de grupo

	SEXO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A1	1	2	34,8500	3,3234	2,3500
	2	3	54,7000	42,9578	24,8017
A2	1	2	20,6000	3,5355	2,5000
	2	3	22,3000	3,8974	2,2502
A17	1	2	17,4000	1,6971	1,2000
	2	3	31,4333	14,7595	8,5214
AG2AG1	1	2	,5986642	,1585405	,1121050
	2	3	,5955512	,3661286	,2113845
AG17AG1	1	2	,4992308	1,0879E-03	7,692E-04
	2	3	,7520206	,5669770	,3273443
AG17AG2	1	2	,864462	,230747	,163163
	2	3	1,418729	,664208	,383481

* - $p < 0.05$

- $p < 0.01$

° - $p \approx 0.05$

5-DISCUSIÓN:

5- DISCUSIÓN:

5.1- Valores plasmáticos de los péptidos del SRA en la población a estudio (Tabla 1 y Figs 2.1 y 2.2):

El estudio de los niveles peptídicos del sistema renina-angiotensina-aldosterona, ha representado siempre un problema en tres vertientes: una de ellas debido a la labilidad de estos pequeños péptidos en fluidos biológicos, atacables por muy distintas y poco específicas proteasas, por lo que requieren para su estudio de la composición y fabricación de una mezcla de inhibidores de estas enzimas (ver apartado de Métodos 3.3.1 y 3.3.2); una segunda cuestión, metodológica, que consiste en la elección de los métodos de extracción de la muestra y sistema de análisis y detección para una correcta discriminación de los distintos péptidos (Kohara y cols, 1991; Nakamoto y cols, 1995); y una tercera debida a la variabilidad fisiológica en sus niveles, que son muy influenciados ante distintas condiciones (Workman y cols, 1979; Matsui y cols, 1999).

Estas características metodológicas llevan a diferencias significativas en cuanto a los resultados obtenidos por distintos investigadores, adquiriendo, quizás, más relevancia no tanto los valores absolutos de los niveles peptídicos, sino las diferencias que se obtienen debido a tratamientos (Murphey y cols, 2000), entre distintos genotipos (Bloem y cols, 1996; Paillard y cols, 1999; Danser y cols 1998 y 1999) o actividades enzimáticas del eje (Yamada y cols, 1998; van Dijk y cols, 2000).

Por otro lado los índices que reflejan los cocientes peptídicos AII/AI, A-(1-7)/AI y A-(1-7)/AII, podrían asimilar mejor los resultados entre los distintos investigadores, ya que los péptidos aludidos interaccionan en una relación sustrato/producto.

A pesar de la gran cantidad de bibliografía sobre el tema, existen pocos estudios en humanos de los niveles de los péptidos de la angiotensina, en especial de la A-(1-7).

Workman y cols (1979) en una muestra de 88 sujetos hipertensos encontró que los niveles de AI oscilaban desde un mínimo de 12 pgr/mL a un máximo de 1990 pgr/mL, siendo el valor medio en posición supina de 220 pgr/mL.

Matsui y cols (1999) en una muestra de 13 varones japoneses no encontró diferencias en los niveles de AI ni AII entre los sanos y los que tenían una HTA leve en

posición supina, encontrando unos niveles de AI de 304 ± 43 fmol/mL y de AII de 32 ± 6 fmol/mL.

Paillard y cols (1999) describen en su estudio sobre una muestra de 114 sujetos normotensos, 87 hombres y 27 mujeres, un nivel medio de AII de 7.6 ± 6.5 pgr/mL, sin discriminar por sexos. En el mismo sentido Shimamoto y cols (1990) encuentran unos niveles de AII de 12.0 pgr/mL en sujetos sanos.

La razón AII/AI se considera un indicador indirecto de la actividad de la ECA circulante, ya que pese a que existe otra enzima convertora de AI a AII llamada Quimasa (Voors y cols, 1998), su acción en el torrente circulatorio según Saris y cols (2000) es despreciable.

Danser y cols (1999) inyectando I125-AI intravenoso en el antebrazo de 12 mujeres y 17 hombres (de 24 a 67 años de edad) describieron una conversión de I125-AI a I125-AII de 38 ± 4 %, 30 ± 3 % y 31 ± 6 % en sujetos DD, ID y II respectivamente, no encontrando asociación entre las variantes del polimorfismo ECA I/D y dicha conversión.

Por su parte Saris y cols (2000) inyectando AI y AII intraarterialmente en el antebrazo de 14 varones normotensos encontraron una conversión de AI a AII del 36% (rango del 18 al 57%) en la sangre arterial.

En nuestro estudio los valores medios de los péptidos de la angiotensina obtenidos son de 92.47 ± 102.11 pgr/mL de AI, 22.35 ± 10.00 pgr/mL de AII y 31.46 ± 27.31 pgr/mL de A-(1-7).

Los valores medios de la conversión de AI a AII (AII/AI) obtenidos en nuestro estudio son de 0.41 ± 0.29 , de AI a A-(1-7) (A-(1-7)/AI) son de 0.65 ± 0.71 pgr/mL, y de AII a A-(1-7) (A-(1-7)/AII) de 1.49 ± 1.03 pgr/mL.

Se observó una gran desviación en todas las determinaciones que concuerdan con los diferentes trabajos publicados.

5.2- Comparación entre los Valores plasmáticos de los péptidos del SRA en la muestra a estudio en relación con los polimorfismos del gen del Angiotensinógeno, de la ECA y del AT1R.

5.2.1- Valores plasmáticos de los péptidos del SRA en relación con el polimorfismo M235T del gen del Angiotensinógeno (Tablas 2.1, 2.4, 2.5 y 2.6; y Figs 3.1 y 3.2):

En el caso de la AI se observan mayores niveles en MM que en TT, no siendo significativas ninguna de las diferencias. Según la bibliografía previa el alelo T está asociado a unos mayores niveles de AGT (Bloem y cols, 1996; Danser y cols, 1998; Pratt y cols, 1998; Paillard y cols 1999), sin embargo también está asociado a su vez con una disminución en la actividad de la renina (PRA) y sus niveles según Danser y cols (1999), lo que explicaría el hecho de que AI sea mayor en los MM que en los TT (si bien esta diferencia en nuestro estudio no es significativa ni de mucha magnitud). Por otra parte Bohlender y cols (2000), sostienen en su estudio que un aumento en los niveles de AGT produce una disminución del aclaramiento de renina y, por tanto, un aumento de su vida media.

En el caso de la AII los mayores niveles se encuentran mayores niveles en MM que en TT, siendo exclusivamente significativa la diferencia entre MT y TT (24.66 ± 11.43 vs 18.65 ± 6.54 , $p < 0.05$). Por ser la AII la molécula presora más importante del eje se podría considerar que unos mayores niveles de ésta se asocian con una mayor respuesta presora y por tanto con mayor riesgo. Si bien la mayor parte de la bibliografía previa apunta a un aumento del riesgo con el alelo T (Jeunemaitre y cols, 1992; Hata y cols, 1994; Tiret y cols, 1998), algunos estudios señalan al alelo M como el de riesgo para sujetos sin otros factores de riesgo clásicos cardiovasculares (Fernandez-Arcas y cols; 1999; Vasku y cols, 1998), como es el caso de este estudio al utilizar una población joven (edad = 20.67 ± 2.75 años) y sana.

Los mayores niveles de A-(1-7) se encuentran en el alelo T en definitiva, y los menores en los MM (alelo M)(33.98 vs 25.47), siendo clara pero no significativa la diferencia. El efecto final de la A-(1-7) se considera actualmente, de forma unánime, como vasodepresor (Porsti y cols, 1994; Li y cols, 1997; Ferrario y cols, 1998; Paula y cols, 1999; Roks y cols, 1999), jugando un papel contrarregulador de la AII (Ferrario y cols, 1997; Chappell y cols, 1998), y pudiendo considerarse por tanto como un factor protector cardiovascular (Ferrario y cols, 1998). Teniendo en cuenta este hecho, el alelo

T sería el protector en este caso, coincidiendo con lo publicado por Fernández-Arcas (1999).

En la razón AII/AI los mayores niveles se encuentran en los MM, y los menores en los TT, sin embargo ninguna de las diferencias es significativa (0.44 vs 0.39, en MM y TT respectivamente). La razón AII/AI es un índice indirecto *in vivo* de la actividad de la ECA, considerándose los niveles plasmáticos de la ECA como un factor de riesgo (Cambien y cols, 1994).

En el caso de la razón A-(1-7)/AI, indicador de la conversión de AI a A-(1-7), los mayores niveles se encuentran en los TT, y los menores en los MM, siendo llamativas pero no significativas las diferencias (0.82 vs 0.58, respectivamente).

Y en la razón A-(1-7)/AII, indicador de la conversión de AII a A-(1-7), los mayores niveles se encuentran en los TT, y los menores en los MM, aunque las diferencias son evidentes no llegan a la significación (1.80 vs 1.32, respectivamente).

5.2.2- Valores plasmáticos de los péptidos del SRA en relación con el polimorfismo I/D del gen de la ECA (Tabla 2.2, 2.7,2.8 y 2.9; y Figs 3.1 y 3.2):

En el caso de la AI los mayores niveles se encuentran en los DD y en los II, siendo la diferencia mínima (98.67 vs 95.22), y los menores en los ID (85.52), no siendo significativa ninguna de las diferencias. En el polimorfismo I/D de la ECA el alelo D determina un aumento en la actividad de la ECA (Young y cols, 1998; Murphey y cols, 2000) y su concentración (Rigat y cols, 1990), por lo que cabría esperar un mayor paso de AI a AII, una menor concentración de AI y mayor de AII en el alelo D, así como lo opuesto en el alelo I. Sin embargo en la bibliografía previa sólo se ha conseguido relacionar con los niveles y actividad de la ECA, pero no con los niveles de AI, AII ni A-(1-7) (Danser y cols,1999 y 1998), lo que se corresponde con nuestros resultados. Danser y cols mediante dos estudios (1998 y 1999) demostraron un incremento de la ECA circulante en el alelo D, si bien no encontraron ninguna relación con la transformación de AI a AII, ni con los niveles de renina, prorenina, AGT ni aldosterona.

En la AII los mayores niveles se encuentran en los DD y en los II, siendo la diferencia mínima (24.48 vs 23.67), y los menores en los ID (19.70), siendo únicamente significativa la diferencia entre ID y DD (19.70 vs 24.48, $p < 0.05$). Pese al intento de relacionar los polimorfismos I/D de la ECA con los niveles de AII no se ha conseguido detectar el aumento en los DD que sería de esperar, más aún, no se produce una

disminución de la AII en el tratamiento crónico con inhibidores de la ECA, sino sólo un aumento en AI y A-(1-7) (Luque y cols, 1996).

En el caso de la A-(1-7) no hay diferencias significativas, siendo ligeramente mayores en DD (32.87 vs 29.46, en DD e II respectivamente). Cabiendo esperar unos mayores niveles en II y menores en DD, debido a la disminución de la actividad de la ECA en los II, lo que desviaría el eje hacia la formación de A-(1-7).

En la razón AII/AI tampoco existen diferencias. Cabiendo esperar una mayor razón en los DD y menores en II, debido a la mayor actividad de la ECA con el alelo D (Rigat y cols, 1990; Young y cols, 1998; Murphey y cols, 2000).

Y en el caso de las razones A-(1-7)/AI y A-(1-7)/AII los mayores niveles se encuentran en los ID, siendo levemente mayores en los II que en los DD. Dichas razones pretenden representar la conversión de AI y AII a A-(1-7), paso llevado a cabo por varias enzimas.

5.2.3- Valores plasmáticos de los péptidos del SRA en relación con el polimorfismo A1166C del gen del AT1 (Tabla 2.3, 2.10, 2.11 y 2.12; y Figs 3.1 y 3.2):

El escaso número de individuos CC comparado con los otros dos genotipos, que coincide con estudios de prevalencia previos, dificulta el hallazgo de significaciones.

No hay ningún estudio previo que halla conseguido relacionar el polimorfismo A1166C del gen del AT1 con los niveles en plasma de AI, AII ni A-(1-7), sólo con la mayor expresión del receptor AT1 y una mayor respuesta a la AII (Van Geel y cols, 1998 y 2000; Spiering y cols, 2000) en el alelo C.

En el caso de la AI los mayores niveles se encuentran en los AA, seguido de los AC, encontrándose los menores niveles en los CC, siendo únicamente significativa la diferencia entre AC y CC (91.55 vs 46.76, $p < 0.05$). Teniendo en cuenta que la AII provoca a través del receptor AT1 unos mayores niveles de AGT (feedback positivo) (Brasier y cols, 1996; Jamaluddin y cols, 2000) y que el alelo C se ha asociado a una mayor respuesta a la AII (van Geel y cols, 1998 y 2000), en el alelo C los niveles de AGT deberían ser mayores, y por tanto los de AI también, lo que no coincide con nuestros resultados.

En la AII los mayores niveles se encuentran en los AC, siendo iguales en los AA y CC, no siendo significativa ninguna de las diferencias.

Respecto a la A-(1-7) los mayores niveles se encuentran en los AC (36.48 pgr/mL), siendo un poco mayores en los AA que en los CC (27.86 vs 25.82 pgr/mL), no siendo significativa ninguna de las diferencias.

En la razón AII/AI los mayores niveles se encuentran en los CC, intermedios en los AA y menores en los AC, no siendo significativa ninguna de las diferencias. Indicando una mayor conversión en los CC.

En el caso de la razón A-(1-7)/AI los mayores niveles se encuentran en los AC, intermedios en los CC y menores en los AA, no siendo significativa ninguna de las diferencias; y en la razón A-(1-7)/AII los mayores niveles se encuentran en los AC, intermedios en los AA y menores en los CC, no siendo significativa ninguna de las diferencias. Indicando una mayor conversión en los AC.

5.3- Descripción de los valores plasmáticos de los péptidos del SRA en Hombres (Tabla 4.1):

Los valores obtenidos de los distintos péptidos del SRA en hombres ($n = 43$) son de 82.29 ± 101.03 pgr/mL (media \pm desviación típica) para la AI, 21.40 ± 8.71 pgr/mL para la AII, 37.76 ± 36.47 pgr/mL para la A-(1-7), 0.42 ± 0.26 para la razón AII/AI, 0.79 ± 0.85 para la razón A-(1-7)/AI, y de 1.80 ± 1.32 para la razón A-(1-7)/AII.

5.3.1- Valores plasmáticos de los péptidos del SRA en Hombres en relación a los distintos genotipos:

5.3.1.1- Genotipos del polimorfismo M235T del angiotensinógeno en hombres (Tabla general 4.2, y pormenorizadas 4.3.1, 4.3.2 y 4.3.3; Figs 4.1 y 4.2):

En el caso de la AI los niveles son mayores en TT con respecto a MM (82.87 vs 63.50) pero no significativos. Así el alelo T tiene en varones aumento de AI, que no se observaba cuando se consideraba toda la muestra (incluyendo a las mujeres), y que se puede explicar aparentemente por la mencionada relación entre el alelo T y una mayor producción de AGT (Bloem y cols, 1996; Danser y cols, 1998; Pratt y cols, 1998; Paillard y cols 1999) y el aumento en la actividad de la renina que se produce en varones (Wagner y cols, 1990, en ratones).

En la AII en varones los mayores niveles se encuentran en MT, siendo casi iguales en TT y MM (18.54 vs 17.88), y encontrándose únicamente significativa la diferencia entre MM y MT (17.88 vs 23.98, $p < 0.05$).

En el caso de la A-(1-7) en varones los niveles son mayores en TT que en MM (38.98 vs 24.83)(siendo aun mayores en los MT), si bien sólo es significativa la diferencia entre MM y MT (24.83 vs 43.86, $p < 0.05$).

En la razón AII/AI en varones los niveles son mayores en el alelo M de forma no significativa, lo que significaría una mayor actividad de la ECA en los MM (y por tanto mayor riesgo potencial en el sentido del estudio de Fernandez-Arcas y cols (1999)).

En la razón A-(1-7)/AI en varones los niveles son superiores en TT que en MM (0.79 vs 0.51), no siendo significativa ninguna de las diferencias, lo que significaría un mayor paso a A-(1-7) desde AI en el alelo T.

Y en el caso de la razón A-(1-7)/AII en varones los mayores niveles se encuentran claramente en los TT, y los menores en los MM (2.11 vs 0.1.43), lo que significaría un mayor paso a A-(1-7) desde AII en el alelo T. No siendo sin embargo significativa ninguna de las diferencias.

El hecho de que la mayor parte de las significaciones se produzcan entre MM y MT viene determinado hasta cierto punto por el pequeño tamaño relativo de los TT ($n = 7$).

5.3.1.2.- Genotipos del polimorfismo I/D de la ECA en hombres (Tabla general 4.2, y pormenorizadas en 4.3.4, 4.3.5 y 4.3.6; y Figs 4.1 y 4.2):

En el caso de la AI en varones los niveles son mayores en el alelo I de forma no significativa (81.63 vs 65.36, en II y DD respectivamente). Así el alelo I tiene mayores niveles de AI en la muestra como cabría esperar por la menor actividad conversora de AI a AII, con respecto al alelo D (Young y cols, 1998; Murphey y cols, 2000).

En la AII en varones los mayores niveles se encuentran en II, no siendo significativa ninguna de las diferencias. Así el alelo D tiene un menor nivel de AII, lo que no se explica conforme a la mayor actividad de la ECA, coincidiendo sin embargo con los estudios previos que no consiguen relacionar los polimorfismos ECA I/D con otros niveles que no sean los de la enzima de conversión (Chadwick y cols, 1997; Young y cols, 1998; Danser y cols, 1998).

En la A-(1-7) en varones los mayores niveles se encuentran en el alelo D, de forma no significativa. Así el alelo I tiene un menor nivel de A-(1-7), lo que no se explica conforme a la menor actividad relativa de la ECA de dicho polimorfismo (ni

conforme al supuesto aumento de riesgo cardiovascular con el que se ha asociado en estudios previos al alelo D).

Respecto a la razón AII/AI en varones no se aprecian diferencias entre los alelos, lo que viene a corroborar los resultados de los estudios de Danser y cols (1998 y 1999), Chadwick y cols (1997) y Young y cols (1998).

En la razón A-(1-7)/AI en varones los niveles son mayores en II con respecto a DD (0.75 vs 0.67), pero de forma no significativa. Suponiéndose una menor actividad de la ECA en los II se puede explicar el mayor paso a A-(1-7) por ser una vía alternativa, sin embargo, como hemos visto, no se corresponde con unos mayores niveles plasmáticos absolutos de A-(1-7).

Y en el caso de la razón A-(1-7)/AII en varones no hay diferencias significativas entre los alelos. Suponiéndose una mayor actividad ECA relativa en los DD, y suponiendo un mayor paso a AII (que no aumenta su valor absoluto en nuestra muestra como hemos visto), se puede explicar el mayor paso a A-(1-7) desde AII en los DD que en los II, por ser en teoría mayor el nivel de AII en los DD.

5.3.1.3- Genotipos del polimorfismo A1166C del AT1 en hombres (Tabla general 4.2, y pormenorizadas en 4.3.7, 4.3.8 y 4.3.9; y Figs 4.1 y 4.2):

Considerando todos los varones de la muestra (n = 43) discriminando para el polimorfismo del AT1 nos encontramos con los siguientes grupos: AA (n = 21), AC (n = 20) y CC (n = 2). Por lo que los valores de CC no son significativos, pudiendo compararse estadísticamente sólo los AA con los AC.

En el caso de la AI en varones los mayores niveles se encuentran en los AA, y los menores en CC, no siendo significativa ninguna de las diferencias. Teniendo en cuenta que la AII provoca a través del receptor AT1 unos mayores niveles de AGT (feedback positivo)(Brasier y cols, 1996; Jamaluddin y cols, 2000) y que el alelo C se ha asociado a una mayor respuesta a la AII (van Geel y cols, 1998 y 2000; Spiering y cols, 2000), en el alelo C los niveles de AGT deberían ser mayores, y por tanto los de AI también, lo que no coincide con nuestros resultados.

En la AII en varones los niveles son mayores en los AC que en los AA de forma no significativa.

En la A-(1-7) en varones los mayores niveles se encuentran en los AC, y siendo menores en AA, (y los más bajos en los CC), no siendo significativa ninguna de las diferencias.

Respecto a la razón AII/AI en varones los mayores valores se encuentran en los CC, siendo iguales en los AC y AA (0.42 vs 0.40), no siendo significativa ninguna de las diferencias.

En el caso de las razones A-(1-7)/AI y A-(1-7)/AII en varones, los mayores valores se encuentran en los AC, siendo menores en los AA, y los más pequeños en los CC, no siendo significativa ninguna de las diferencias.

En conjunto, y debido en parte al pequeño tamaño de los CC ($n = 2$), no se encuentran diferencias significativas en los genotipos del polimorfismo A1166C del gen del AT1.

4.9- Descripción de los valores plasmáticos de los péptidos del SRA en Mujeres (Tabla 5.1):

Los valores obtenidos de los distintos péptidos del SRA en mujeres ($n = 50$) son de 101.23 ± 103.25 pgr/mL (media \pm desviación típica) para la AI, 23.17 ± 11.01 pgr/mL para la AII, 26.04 ± 13.98 pgr/mL para la A-(1-7), 0.41 ± 0.32 para la razón AII/AI, 0.54 ± 0.57 para la razón A-(1-7)/AI, y de 1.23 ± 0.58 para la razón A-(1-7)/AII.

5.4.1- Valores plasmáticos de los péptidos del SRA en Mujeres en relación a los distintos genotipos (Tabla 5.2):

5.4.1.1- Genotipos del polimorfismo M235T del gen del angiotensinógeno en mujeres (Tabla general 5.2, y pormenorizadas en 5.3.1, 5.3.2 y 5.3.3; Figs 5.1 y 5.2):

Existe un aumento no significativo de la AI favorecido por el alelo M. Si tenemos en cuenta por un lado, que tanto el alelo T del angiotensinógeno (Bloem y cols, 1996; Danser y cols, 1998; Pratt y cols, 1998; Paillard y cols, 1999) como los estrógenos aumentan la síntesis de AGT (Campbell y cols, 1997; Pratt y cols, 1998; Brosnihan y cols, 1999), y por otro lado, que tanto en la mujer como en los homocigóticos TT se ha descrito una menor actividad de la renina plasmática (Danser y cols, 1998; Fernández-Arcas y cols, 1999); los resultados obtenidos, se podrían explicar por un efecto compensatorio de la P.R.A. en respuesta a una menor concentración del angiotensinógeno inicial (MM).

Respecto a los niveles de AII, están aumentados no significativamente en relación al alelo M, siendo mayores en los MM que en los TT (22.16 vs 18.73). Si bien, es conocido que la regulación del SRA tiende a mantener constante los niveles de AII, en este caso, el observado aumento de la AII relativo al alelo M parece tener mayor dependencia de la actividad de la PRA.

Los mayores niveles de A-(1-7) se encuentran en los TT, al compararlos con los MM (29.54 vs 25.98) siendo la diferencia no significativa. Este aumento de la A-(1-7) se refleja también para la razón A-(1-7)/AII en mujeres homocigóticas TT, lo cual parece implicar un paso más efectivo de AII a A1-7, mediado por las enzimas prolilendopeptidasa y prolilcarboxipeptidasa (Ferrario y cols, 1997).

Es digna de mención la falta de correlación AI-AII de los dos genotipos homocigóticos ($R = 0.286$ y 0.089 en MM y TT, respectivamente), teniendo presente que esta correlación es habitualmente la más significativa de todo el sistema. Habiendo planteado que la linealidad de las correlaciones entre los distintos péptidos está referida a la regulación del propio sistema, es notorio que en el caso del AGT en mujeres se produce, debido a las variaciones de éste como substrato limitante de la renina, un efecto descompensador del paso más equilibrado (AI-AII).

5.4.1.2- Genotipos del polimorfismo I/D del gen de la ECA en mujeres (Tabla general 5.2, y pormenorizadas en 5.3.4, 5.3.5 y 5.3.6; Figs 5.1 y 5.2):

Los mayores niveles de AI se encuentran en las mujeres homocigóticas DD, estos niveles son significativamente mayores que en los heterocigóticos ID (136.72 vs 74.39, $p < 0.05$, en DD y ID respectivamente), no alcanzando significación frente a los homocigóticos II. Teniendo en cuenta que el alelo D presenta un aumento de la actividad de la ECA (Cambien y cols, 1988; Tired y cols, 1992; Rigat y cols, 1990), si bien en estudios previos no se ha podido establecer relación alguna entre los niveles peptídicos de la angiotensina y el polimorfismo I/D (Danser y cols, 1998 y 1999; van Dijk y cols, 2000; Murphey y cols, 2000), se podría interpretar que un aumento de la actividad de la ECA lleva a un aumento de los niveles de la AII de forma significativa entre los mismos genotipos (19.95 vs 28.27, $p < 0.05$, en ID y DD respectivamente), que nos llevaría a un aumento relativo del AGT mediante retroalimentación positiva (Brasier y cols, 1996; Jamaluddin y cols, 2000), lo que explicaría un aumento, no compensado por la actividad de la renina, de la angiotensina I.

Respecto a la A-(1-7), teniendo presente que en los genotipos DD se ha observado en la población un aumento de los niveles tanto de AI como AII, y que ambos son substratos de la A-(1-7), debería de existir un aumento de A-(1-7) que no se aprecia, lo cual podría explicarse por un aumento en la degradación de la A-(1-7) debido a un aumento de la actividad de la ECA en los individuos homocigóticos para el alelo D (Cambien y cols, 1988; Tired y cols, 1992; Rigat y cols, 1990).

En la razón AII/AI en mujeres, resulta destacable el hecho de que sea justamente en el genotipo DD en los que encontremos una menor relación AII/AI (no siendo significativa ninguna de las diferencias), siendo ésta considerada como el mejor índice *in vivo* de la actividad enzimática de la ECA. Sin embargo, la correlación AI-AII en mujeres, y en este genotipo (DD), presenta su máxima expresión ($R=0,827$); lo que indica una estrecha relación sustrato-producto.

No encontramos diferencias significativas entre las razones A-(1-7)/AI, ni A-(1-7)/AII en mujeres.

5.4.1.3- Genotipos del polimorfismo A1166C del gen del AT1 en mujeres (Tabla general 5.2, y pormenorizadas en 5.3.7, 5.3.8 y 5.3.9; Figs 5.1 y 5.2):

Según trabajos publicados, la única relación posible entre el polimorfismo A1166C del gen del AT1 y variaciones de los niveles peptídicos del SRA podría venir dado por un aumento de la síntesis de AGT desencadenado por un incremento del número (asociado al alelo C)(van Geel y cols, 1998 y 2000; Spiering y cols, 2000) y/o de la actividad de los receptores AT1 activados por la AII (retroalimentación positiva)(Brasier y cols, 1996; Jamaluddin y cols, 2000).

Sin embargo, no existen diferencias significativas entre AI, AII y A-(1-7) entre los diferentes genotipos del polimorfismo A1166C, si bien, el estudio de los individuos homocigóticos para C se encuentra invalidado por el bajo número de individuos de la muestra ($n = 3$).

La no significación de los genotipos, tanto en los valores como en las razones de los péptidos, nos indican que la distribución de la población para estos genotipos no representa variantes que influyan en la regulación del eje; este hecho se corrobora con la excelente correlación de los péptidos en los tres genotipos del polimorfismo ($R = 0.675$, 0.620 y 0.770 para los AA, AC y CC respectivamente).

5.5- Valores plasmáticos de los péptidos del SRA en la población general distribuida por Sexos (Tabla 6.1):

Comparando los niveles peptídicos entre hombres y mujeres se observó un mayor nivel en la AI a favor de la mujeres (101.23 vs 82.29), no siendo significativa la diferencia.

En estudios previos comparando sexos se observa que las mujeres muestran una mayor concentración de AGT (Pratt y cols, 1998; Brosnihan y cols, 1999), una menor actividad de la renina (Campbell y cols, 1997; Danser y cols, 1998), así como una disminución de la actividad de la ECA, por una disminución de su transcripción (Gallagher y cols, 1999), mediados por los estrógenos. Los varones tienen menor cantidad de AGT (Pratt y cols, 1998) y mayor renina por efecto de la testosterona (Wagner y cols, 1990; Danser y cols, 1998). Teniendo presente que la PRA está limitada por la concentración de AGT, y que además recientes estudios (Bohlender y cols, 2000) demuestran que un aumento del AGT produce una disminución del aclaramiento de renina, lo que conlleva un aumento en su vida media, los resultados obtenidos coinciden con lo esperado (el aumento no significativo de AI en mujeres).

En el caso de la AII, según el estudio de Gandhi y cols (1998), no hay diferencias entre sexos ni de la conversión de AI a AII, lo que coincidiría con nuestros resultados; sin embargo según Gallagher y cols (1999) la AII en mujeres es menor.

Respecto al caso de la A-(1-7), hay una diferencia significativa a favor de los hombres (37.76 vs 26.04, $p < 0.05$), lo que constituye un dato de gran interés por inesperado, ya que según estudios previos la A-(1-7) es el producto tanto de la AI como de la AII (Ferrario y cols, 1997 y 1998). Si tenemos presente que en mujeres hay una mayor cantidad de AGT (Pratt y cols, 1998; Brosnihan y cols, 1999) y una disminución de ECA (Gallagher y cols, 1999), esto debería conllevar un aumento de la producción de A-(1-7) procedente de la AI en mujeres. Sin embargo, se observa una disminución en las mujeres. Si a esto le añadimos que las correlaciones AII-A-(1-7) son muy superiores a la de AI-A-(1-7) que es prácticamente nula, podríamos concluir que el paso AII-A-(1-7) es el predominante. Este aumento de A-(1-7) podría conllevar en el hombre un equilibrio de las cifras de AII, que como sabemos es el principal factor a regular en el sistema. Teniendo en cuenta que los estudios realizados hasta ahora apoyan la función contrarreguladora de la A-(1-7) respecto a la AII (Ferrario y cols, 1997), y por tanto considerando a la A-(1-7) como protección cardiovascular, existe cierto contraste con el hecho de que la A-(1-7) sea mayor en los varones, clásicamente peor protegidos contra

las enfermedades cardiovasculares. Sin embargo si consideramos el nivel de actividad del SRA en el plano teórico podríamos decir que los varones, debido a un aumento de la PRA (Danser y cols, 1998) y a un aumento de actividad de la ECA (comparado con mujeres), presentarían una mayor tendencia a tener una AII más elevada que las mujeres, hecho que podría verse compensado por un aumento del paso de AII a A-(1-7); como así se demuestra por la diferente significación de la razón A-(1-7)-AII (1.80 vs 1.22, $p < 0.01$, en varones y mujeres respectivamente).

Para la razón AII/AI no hay diferencias significativas entre hombres y mujeres (0.42 vs 0.41), lo que coincide con los resultados de Gandhi y cols (1998), que no encuentra diferencias en los niveles de AII/AI, AII, ni de P.R.A. entre sexos.

Para las razones A-(1-7)/AI y A-(1-7)/AII hay una diferencia a favor de los varones, que se hace muy significativa en la A-(1-7)/AII (1.80 vs 1.22, $p < 0.01$), lo que indica que el paso a A-(1-7) en varones ocurre desde AI y AII, pero desde el último es mayor. Así el mayor nivel de A-(1-7) en varones respecto a mujeres se podría llevar a cabo desde AII, lo que a su vez explicaría que la cantidad de AII sea la misma en ambos sexos.

- ¿Cómo afectan los genotipos de los polimorfismos estudiados a las relaciones de los niveles peptídicos cuando se distribuye la población según por sexos?:

5.6- Valores plasmáticos de los péptidos del SRA por Sexos en relación a los distintos polimorfismos (Hombre vs. Mujer) (Figura 6.1 a 6.6):

5.6.1- Genotipos del polimorfismo M235T del gen del angiotensinógeno (Tabla 6.2):

5.6.1.a- Genotipo MM (Tabla 6.3.1 y Figs 6.1 a 6.6):

En el genotipo homocigótico MM se mantienen unos valores altos de AI en mujeres sobre hombres que se refleja también en unos mayores niveles de AII de forma no significativa; aunque este último no se corresponde con lo hallado por sexos en general donde no había diferencias, contraponiéndose a los resultados de Gandhi y Gallagher (Gandhi y cols, 1998; Gallagher y cols, 1999).

Para A-(1-7) no hay diferencias significativas entre hombres y mujeres (24.83 vs 25.98).

La razón AII-AI presenta un aumento no significativo en mujeres que no cabría esperar según ningún estudio previo.

Para la razón A-(1-7)/AI hay un aumento no significativo en mujeres respecto a hombres, que no concuerda con los resultados por sexos en general (sin tener en cuenta polimorfismos). Sin embargo para la razón A-(1-7)/AII se mantiene el aumento relativo de los varones con respecto a las mujeres, lo que confirma que la mayor fuente del aumento del A-(1-7) en varones procede de la AII (y no de la AI).

Los resultados obtenidos en este genotipo concuerdan con un patrón que parte de una menor síntesis de AGT (“patrón hombre”) y que conlleva un aumento de la PRA compensatoria. Se podría decir que las mujeres MM son más parecidas a los hombres (sin tener en cuenta polimorfismos) en el equilibrio del SRA.

5.6.1.b- Genotipo MT (Tabla 6.3.2 Figs 6.1 a 6.6):

En el caso de los heterocigóticos MT los valores de AI y AII no se diferencian de los valores obtenidos en la general por sexos. Y en la A-(1-7) se mantiene la diferencia significativa a favor de los hombres (43.86 vs 24.86, $p < 0.05$).

Para la razón AII/AI hay aumento en varones respecto a mujeres no significativo, que no cabría esperar.

Respecto a las razones A-(1-7)/AI y A-(1-7)/AII hay una diferencia a favor de los varones, que se hace significativa en la A-(1-7)/AII (1.89 vs 1.10, $p < 0.05$), y muy significativa en la A-(1-7)/AI (0.92 vs 0.38, $p < 0.01$), lo que coincide con los resultados por sexos en la población general de la muestra.

El genotipo MT asociado a unos valores de AGT intermedios presenta la relación de niveles peptídicos más similares a los de población general dividida por sexos, así como unos índices peptídicos y unas correlaciones acordes con lo esperado, en contraposición a los genotipos homocigóticos de este polimorfismo.

5.6.1.c- Genotipo TT (Tabla 6.3.3 Figs 6.1 a 6.6):

Paradójicamente los niveles de AI son mayores en varones, aunque de forma no significativa, lo que se contrapone con lo esperado según la diferencia entre sexos en la población general, y con estudios previos, en los que el varón presenta menores niveles de AGT (Pratt y cols, 1998; Brosnihan y cols, 1999) y mayor actividad de ECA respecto a la mujer (Gallagher y cols, 1999).

En el caso de la AII no hay diferencia significativa, siendo iguales en el hombre y la mujer (18.54 vs 18.73). Según el estudio de Gandhi y cols (1998) no hay

diferencias de AII entre sexos, ni de la conversión de AI a AII, lo que coincidiría con nuestro resultados para este genotipo y por sexos en general.

Respecto a los valores de A-(1-7) hay una clara diferencia no significativa a favor de los hombres (38.98 vs 29.54), lo que coincide con los resultados por sexos en general.

En el caso de la razón AII/AI hay un paradójico aumento en mujeres respecto a hombres, pero no significativo, que no cabría esperar según los estudios previos.

Para la razón A-(1-7)/AI hay un aumento no significativo en mujeres respecto a hombres (0.84 vs 0.79), que no concuerda con los resultados por sexos en general sin tener en cuenta polimorfismos. Sin embargo para la razón A-(1-7)/AII se mantiene el aumento relativo de los varones con respecto a las mujeres, lo que confirma que la mayor fuente del aumento del A-(1-7) en varones procede de la AII (y no de la AI).

5.6.2- Genotipos del polimorfismo I/D del gen de la ECA (Tabla 6.2):

5.6.2.a- Genotipo II (Tabla 6.3.4 Figs 6.1 a 6.6):

En el caso de AI los valores son claramente mayores en mujeres (103.72 vs 81.63) de forma no significativa; en el de la AII los valores son similares en varones que en mujeres (25.17 vs 22.73); y en el caso de la A-(1-7) hay una diferencia no significativa a favor de los hombres (34.57 vs 26.27), correspondiéndose todo ello con lo esperado por sexos en general.

En el caso de la razón AII/AI no existen diferencias entre sexos; y en el de las razones A-(1-7)/AI y A-(1-7)/AII hay una diferencia no significativa a favor de los varones, lo que coincide también con los resultados por sexos en la población general de la muestra.

Así se puede concluir que el genotipo II no plantea diferencias en el equilibrio del SRA en relación a la comparación entre sexos en la población general.

5.6.2.b- Genotipo ID (Tabla 6.3.5 Figs 6.1 a 6.6):

En el caso de la AI los valores presentan un aumento no significativo en varones (98.61 vs 74.39), lo que no se corresponde con lo esperado por sexos en general, ni con lo esperado en los estudios previos, debido a los menores valores de angiotensinógeno (Pratt y cols, 1998; Brosnihan y cols, 1999), y mayor actividad relativa de la ECA (Gallagher y cols, 1999) en los varones.

En la AII no hay diferencia significativa, siendo iguales en el hombre y la mujer. Según el estudio de Gandhi y cols (1998) no hay diferencias de AII entre sexos, ni de la conversión de AI a AII, lo que coincidiría con nuestro resultado y nuestros resultados por sexos en general.

Respecto a la A-(1-7), hay diferencias no significativas a favor de los hombres (38.51 vs 25.94). Lo que coincide con los resultados por sexos en general.

En la razón AII/AI hay un leve, pero paradójico aumento, no significativo, en mujeres respecto a hombres (0.45 vs 0.39), que no cabría esperar según los estudios previos.

En el caso de las razones A-(1-7)/AI y A-(1-7)/AII hay una clara diferencia a favor de los varones, que se hace significativa en la A-(1-7)/AII (1.99 vs 1.34, $p < 0.05$), lo que indica que el mayor paso a A-(1-7) en varones ocurre desde AII para este genotipo. Así el mayor nivel de A-(1-7) en varones respecto a mujeres se podría llevar a cabo desde AII, lo que a su vez explicaría que la cantidad de AII sea la misma en ambos sexos, y no mayor en varones.

Por tanto el genotipo heterocigótico ID presenta una única variación respecto a las diferencias por sexos en la población general, que son los mayores niveles de AI en hombres, una posible explicación a este hecho podría establecerse en que una actividad intermedia de la enzima conversora nos llevaría a unos niveles más equilibrados de AII, y por tanto a una mayor estabilidad en la regulación de la PRA.

5.6.2.c- Genotipo DD (Tabla 6.3.6 Figs 6.1 a 6.6):

En el caso de la AI los valores son mayores en mujeres de forma significativa (136.72 vs 65.36, $p < 0.05$), lo que se corresponde con lo esperado por sexos en general, siendo aún mayor el nivel de AI en este grupo de DD, lo que se podría explicar por estar asociada a una mayor actividad de la ECA (Murphey y cols, 2000).

En la AII los valores son mayores en mujeres (28.27 vs 21.15) de forma no significativa, lo que no se corresponde con lo esperado por sexos en general (donde no había diferencia), ya que según la bibliografía previa no hay diferencias por sexo (Gandhi y cols, 1998), o bien, son menores en mujeres (Gallagher y cols, 1999).

Respecto a la razón AII/AI hay aumento en varones respecto a mujeres no significativo (0.43 vs 0.34), que no cabría esperar según Gandhi y cols (1998) que no hallan diferencias por sexo, pero sí según Gallagher y cols (1999) que hallan el mismo tipo de diferencia.

En la valoración de los niveles de A-(1-7) y de las razones A-(1-7)/AI y A-(1-7)/AII, hay una diferencia no significativa a favor de los varones (38.95 vs 25.92, para la A-(1-7)), lo que coincide con los resultados por sexos en la población general de la muestra.

Para el genotipo DD son dignos de mención los altos niveles de AII en mujeres. Este efecto puede explicarse teniendo en cuenta que los mayores niveles de AI en la mujer, pueden dar lugar, debido al aumento de la actividad de la ECA en los sujetos DD, a una mayor eficiencia de este paso. Contrastando este valor con el gran aumento no significativo de la razón AII/AI en hombres respecto a mujeres (0,43 vs 0,34), atribuible a los altos niveles de AI en las mujeres DD. La explicación a los altos niveles de AI y AII en mujeres DD puede venir mediada por un efecto sinérgico entre la estimulación de la síntesis de AGT vía AII (y su receptor), y el efecto de los estrógenos sobre el mismo (que también aumentan la síntesis de AGT).

5.6.3- Genotipos del polimorfismo A1166C del gen del AT1 (Tabla 6.2):

5.6.3.a- Genotipo AA (Tabla 6.3.7 Figs 6.1 a 6.6):

Los valores de la AI son superiores en mujeres (101.18 vs 93.91) y los valores de A-(1-7) son mayores en varones (30.60 vs 25.73), ambos de forma no significativa, lo que se corresponde con lo esperado por sexos en general.

En el caso de la AII los valores son levemente mayores en mujeres, de forma no significativa (23.09 vs 19.73), lo que no se corresponde con lo esperado por sexos en general (donde no había diferencia), ni con los estudios previos en los que no hay diferencias por sexo (Gandhi y cols, 1998), o bien, son menores en mujeres (Gallagher y cols, 1999).

En la razón AII/AI no hay diferencias significativas entre hombres y mujeres, lo que coincide con los resultados de Gandhi y cols (1998), que no encuentra diferencias en los niveles de AII/AI, AII, ni de PRA entre sexos.

Y en las razones A-(1-7)/AI y A-(1-7)/AII hay una clara diferencia a favor de los varones, que se hace significativa en la A-(1-7)/AII (1.62 vs 1.23, $p < 0.05$), lo que indica que el mayor paso a A-(1-7) en varones ocurriendo desde AI y AII, desde el último es mayor.

5.6.3.b- Genotipo AC (Tabla 6.3.8 y Figs 6.1 a 6.6):

Los valores de AI son mayores en mujeres (108.27 vs 74.83) de forma no significativa; en los valores de AII no hay diferencia significativa, siendo iguales en el hombre y la mujer; y en los de A-(1-7) hay una diferencia casi significativa a favor de los hombres (47.31 vs 25.65, $p < 0.06$), coincidiendo todo ello con nuestros resultados por sexos en general.

En el caso de la razón AII/AI, existe un aumento en varones respecto a mujeres no significativo (0.42 vs 0.36), que no cabría esperar según Gandhi y cols (1998) que no hallan diferencias por sexo, pero sí según Gallagher y cols (1999) que hallan el mismo tipo de diferencia.

Y en las razones A-(1-7)/AI y A-(1-7)/AII, hay una clara diferencia a favor de los varones, que se hace significativa en la A-(1-7)/AII (2.08 vs 1.19, $p < 0.05$). Coincidiendo con los valores generales por sexos.

5.6.3.c- Genotipo CC (Tabla 6.3.9 y Figs 6.1 a 6.6):

Considerando el grupo de sujetos con el genotipo CC ($n = 5$) de la población general, y comparando hombres ($n = 2$) con mujeres ($n = 3$), no se pueden realizar comparaciones estadísticas significativas. Se observa un aumento de los valores en mujeres respecto a hombres para AI, A-(1-7), A-(1-7)/AI y A-(1-7)/AII, siendo similares en AII y AII/AI.

Así, se puede concluir que, para el polimorfismo A1166C del gen del AT1, se mantienen los valores obtenidos para la población general entre sexos, por lo cual *no podemos deducir que la variabilidad funcional del receptor producida por este genotipo afecte a las diferencias entre los dos sexos.*

5.7- Correlaciones de los péptidos de la angiotensina:

Los péptidos de SRA analizados en este estudio se relacionan entre ellos en la forma de sustratos y productos y a la vez por la acción de enzimas comunes. Así la AI es sustrato tanto de la AII como de la A-(1-7), la AII es sustrato de la A(1-7), y la ECA actúa sobre la AI y sobre la A(1-7) (Chappell y cols, 1998). Esto podría significar que los niveles de los distintos péptidos se relacionan de forma lineal, cuando el número

de variables que controlan un determinado paso enzimático no sea excesivo, o bien muy dominante.

Otro aspecto, en este sentido, a tener en cuenta y quizás el más importante, será si existe o no regulación de la acción enzimática en los distintos pasos.

Así la actividad de la renina está limitada por la concentración del angiotensinógeno y regulada por los niveles de AII, mientras que la actividad de la ECA no está regulada por el propio SRA, sino que sus niveles dependen de factores más generales como poliformismos (Cambien y cols, 1988; Rigat y cols, 1990; Tiret y cols, 1992), u hormonas como los estrógenos (Gallager y cols, 1999; Brosnihan y cols, 1999).

Todo esto nos lleva a plantear que las correlaciones lineales de los niveles peptídicos en función de las distintas variables en estudio, sexo y polimorfismos, nos pueden ayudar a entender nuevos aspectos del SRA.

Las correlaciones entre los niveles peptídicos *en toda la población* se muestran significativas entre los valores de AI y AII ($R = 0.554$), no observándose correlación entre las demás combinaciones peptídicas. Este hecho se puede explicar por las características de la acción de la ECA, que significa una vía enzimática cuya actividad es independiente del SRA, y además de una forma muy predominante respecto a otras enzimas que actúan en el mismo paso (quimasa)(Saris y cols, 2000). Existe una débil correlación de los valores entre la AII y la A(1-7) en la población general, que nos indica cierta especificidad enzimática (prolilendopeptidasa y prolilcarboxipeptidasa) del paso. Sin embargo no se observa ninguna correlación entre AI y A(1-7), quizás por ser un paso muy inespecífico en cuanto a acción enzimática (prolilendopeptidasa, neprilisina, endopeptidasa neutra 24.15)(Ferrario y cols, 1991,1997 y 1998).

Las correlaciones entre péptidos del tipo substrato-producto se producirán siempre que la enzima no esté regulada por los mismos péptidos, u otros derivados de los mismos.

En el caso de la renina una concentración potencialmente alta de AGT como es el caso de los homocigóticos TT del polimorfismo M235T (Jeunemaitre y cols, 1992), llevaría a una disminución de la actividad de la renina plasmática en el estado basal lo que implicaría paradójicamente menores niveles de AI manteniéndose los niveles de AII, ya que la AI no es limitante respecto a la ECA. Por otro lado, los homocigóticos MM presentan una menor producción de AGT que aportaría, en un estado inicial, un nivel menor de AII que llevaría a un aumento de la actividad de renina (Fernández-

Arcas y cols,1999), y por tanto un aumento de AI y un mantenimiento de AII en estado de equilibrio.

Como se puede deducir si *la AII se mantiene estable, lo que es el fin básico del sistema*, la AI varía en función de la actividad plasmática de la renina, que a su vez se ve influida por los distintos genotipos que afectan a la síntesis de AGT. Los genotipos homocigóticos MM y TT no producen correlación entre la AI y la AII; sin embargo el genotipo heterocigótico MT presenta unos niveles de actividad plasmática de la renina intermedios y la correlación AI con AII es significativa (0.618, $p < 0.01$).

Lo contrario ocurre en un paso no regulado como en el caso de los sujetos distribuidos por *genotipos ECA*. En este caso la ECA siempre tiene AI para pasar a AII y no se encuentra regulada por péptidos del sistema, por lo que la correlación es siempre significativa, aunque se hace más evidente en los genotipos de mayor (DD) y menor (II) actividad enzimática ($R = 0.777$ y 0.597 , respectivamente).

El caso del *polimorfismo A1166C del receptor AT1 para la AII* es semejante al caso del polimorfismo ECA, pues aunque se ha observado que la síntesis de AGT puede estar mediada por el efecto de la AII usando como intermediario el receptor AT1 (Brasier y cols, 1996; Jamaluddin y cols, 2000), hasta ahora no podemos considerar este mecanismo como dominante en la síntesis de AGT, y no se conoce cómo este polimorfismo puede actuar en este caso. Por las correlaciones de los tres genotipos entre AI y AII, que son significativas, excepto en los CC por su escaso número, *no parece que este polimorfismo afecte a la regulación del sistema*.

Las diferencias *entre sexos* se establecen en *mejores correlaciones en los péptidos en mujeres que en hombres*; mientras que en estos últimos las distintas correlaciones descienden respecto a la población general, en las mujeres se acentúan con valores de $R = 0.647$ entre AI y AII, y de 0.441 entre AII y A-(1-7) ambos con $p < 0.01$. Sin embargo, sigue sin hallarse correlación entre AI y A-(1-7). Estas diferencias pueden deberse al aumento de la actividad de la renina promovida por la testosterona (Wagner y cols, 1990; Danser y cols, 1998) o al aumento de la síntesis de angiotensinógeno al que dan lugar los estrógenos (Pratt y cols, 1998; Brosnihan y cols, 1999).

Se puede por tanto decir que los polimorfismos actúan en el SRA manteniendo distintos equilibrios peptídicos y que este equilibrio del SRA es mayor en las mujeres valorado desde las correlaciones de los péptidos estudiados.

6- CONCLUSIONES:

6- CONCLUSIONES:

- No existen diferencias significativas en los niveles de los péptidos de la angiotensina analizados en la población distribuida por genotipos.
- Los niveles de A-(1-7), al igual que las razones de conversión A-(1-7)/AI y A-(1-7)/AII, son significativamente mayores en varones que en mujeres en sangre circulante. Los niveles de A-(1-7) fueron de 37.76 pgr/mL en varones y de 26.04 pgr/mL en mujeres, siendo en general mayores que los de AII. Así mismo se observa la tendencia en las mujeres a tener unos mayores niveles de AI.
- Considerando la población a estudio dividida por sexos y comparando entre genotipos observamos un aumento significativo de A-(1-7) en varones con el alelo T, con respecto al alelo M, del polimorfismo M235T del gen del angiotensinógeno. En el caso de las mujeres hallamos un aumento significativo de AI y AII con el genotipo DD del polimorfismo I/D del gen de la ECA.
- Considerando la población a estudio dividida por genotipos y comparando entre sexos observamos un aumento significativo tanto de la A-(1-7), como de sus índices A-(1-7)/AI y A-(1-7)/AII, en varones respecto a mujeres mediado por el alelo T del polimorfismo M235T del gen del angiotensinógeno; un aumento significativo de A-(1-7)/AII en hombres respecto a mujeres y de AI en mujeres respecto a hombres, mediados ambos por el alelo D del polimorfismo I/D del gen de la ECA; y por último, un aumento significativo de la razón A-(1-7)/AII en varones respecto a mujeres mediado por el alelo A del polimorfismo del gen del AT1.
- Los polimorfismos influyen de forma distinta en los valores medios de los péptidos de la angiotensina en hombres y en mujeres, produciendo equilibrios diferentes. Por este motivo deberían ser siempre analizados en relación al sexo.
- Se propone la determinación de la correlación lineal de los péptidos en orden sustrato-producto como un parámetro estimativo "*per se*" de la regulación del SRA.

- De las posibles correlaciones de los péptidos estudiados fueron significativas las habidas entre la AI y la AII , siendo mas débil la correlación entre AII y la A1-7, no existiendo ninguna correlación entre la AI y la A1-7. Aproximadamente un tercio de la AI se transforma en AII en el torrente circulatorio.
- La AII se muestra como el substrato preferente de la A-(1-7) frente a la AI en plasma en oposición a lo hallado en otros tejidos.
- Las correlaciones del tipo substrato-producto se producirían siempre que la enzima no esté regulada por los mismos péptidos del sistema; así las correlaciones relativas a los polimorfismos I/D de la ECA y A1166C del AT1 presentan unos valores estables para los seis genotipos derivados, mientras que las correlaciones del polimorfismo M235T del gen del angiotensinógeno, factor limitante del eje, pierden fuerza en los genotipos homocigóticos (MM y TT).
- Se correlacionan mejor los niveles peptídicos en mujeres que en hombres, tanto en la población dividida por sexos como por genotipos y sexo.

7-BIBLIOGRAFÍA:

BIBLIOGRAFÍA:

1. Abonia JP, Abel KJ, Eddy RL, Elliot RW, Chapman VM, Shows TB, Gross KW. Linkage of Agt and Actsk-1 to distal mouse chromosome 8 loci: a new conserved linkage. *Mammalian Genome*; 4:25-32. 1993.
2. Amant C, Bauters C, Bodart JC, Lablanche JM, Grollier G, Danchin N, Hamon M, Richard F, Helbecque N, McFadden EP, Amouyel P, Bertrand ME. D allele of the angiotensin I-converting enzyme is a major risk factor for restenosis after coronary stenting. *Circulation*; 96:56-60. 1997.
3. Anderson K.M., Murahashi T., Dostal D.E. y Peach M.J. Morphological and biochemical analysis of angiotensin II internalization in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.*, 264:C179-C188. 1993.
4. Arbustini E, Grasso M, Fasani R, Klersy C, Diegoli M, Porcu E, Banchieri N, Fortina P, Danesino C, Specchia G. Angiotensin converting enzyme gene deletion allele is independently and strongly associated with coronary atherosclerosis and myocardial infarction. *Brit Heart J*; 74:584-591. 1995.
5. Arngrimsson R, Purandare S, Connor M, Walker JJ, Bjornsson S, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Geirsson RT, Bjornsson H. Angiotensinogen: a candidate gene involved in preeclampsia?(Letter) *Nature Genet*; 5:114-115. 1993.
6. Baker K. y Aceto J.F. Angiotensin II stimulation of Protein synthesis and cell growth in chick heart cells. *Am. J. Physiol.*, 259:H610-H618. 1990.
7. Barbella Y., Cierco A. e Israel A. Effect of losartan, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, on drinking behavior and renal actions of centrally administered renin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 202:401-406. 1993.
8. Barnes J.M., Steward L.J., Barber P.C. y Barnes N.M. Identification and characterization of angiotensin II receptor subtypes in human brain. *Eur. J. Pharmacol.*, 230:251-258. 1993.
9. Berge KE, Berg K. No effect of insertion/deletion polymorphism at the ACE locus on normal blood pressure level of variability. *Clin Genet*; 45:169-174. 1994.
10. Berge KE, Berg K. Polymorphism at the angiotensinogen (AGT) and angiotensin II type 1 receptor (AT1R) loci and normal blood pressure. *Cin Genet*; 53(3):214-9. 1998.
11. Bergsma D.J., Ellis C., Kumar C. et al. Cloning and characterization of a human angiotensin II type 1 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 183:989-995. 1992.
12. Bergwitz C., Madoff S., Abou-Samra A.B. y Juppner H. Specific, high affinity binding sites for angiotensin II on mycoplasma hyorhinitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 173:1391-1399. 1991.

13. Bloem LJ, Foroud TM, Ambrosius WT, Hanna MP, Tewksbury DA, Pratt JH. Association of the angiotensinogen gene to serum angiotensinogen in blacks and whites. *Hypertension*; 29(5):1078-82. 1996.
14. Bloem LJ, Manatunga AK, Tewksbury DA, Pratt JH. The serum angiotensinogen concentration and variants of the angiotensinogen gene in white and black children. *J Clin Invest*; 95:948-953. 1995.
15. Bohlender J, Menard J, Ganten D, Luft FC. Angiotensinogen concentrations and renin clearance: implications for blood pressure regulation. *Hypertension*; 35(3):780-6. 2000.
16. Bohn M, Berge KE, Bakken A, Erikssen J, Berg K. Insertion/Deletion (I/D) polymorphism at the locus for angiotensin I-converting enzyme and myocardial infarction. *Clin Genet*; 44:292-297. 1993.
17. Bohn M, Berge KE, Bakken A, Erikssen J, Berg K. Insertion/Deletion (I/D) polymorphism at the locus for angiotensin I-converting enzyme and parental history of myocardial infarction. *Clin Genet*; 44:298-301. 1993.
18. Bonnardeux A, Davies E, Jeunemaitre X, Fery I, Charru A, Clauser E, Tiret L, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension*; 24:63-69. 1994.
19. Bottari S.P., Gasparo M., Steckelings U.M. y Levens N.R. Angiotensin II subtypes: Characterization, signaling mechanisms, and possible physiological implications. *Front Neuroendocrinol.*, 14(2):123-171. 1993.
20. Bottari S.P., King I.N., Reichlin S., Dahlstroem I., Lydon N. y DeGasparo M. The angiotensin AT2 receptor stimulates protein tyrosine phosphatase activity and mediates inhibition of particulate guanylate cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 183:206-211. 1992
21. Bouscarel B., Blackmore P.F. y Exton J.H. Characterization of the angiotensin II receptor in primary cultures of rat hepatocytes: Evidence that a single population is coupled to two different responses. *J. Biol. Chem.*, 263:14.913-14.919. 1988.
22. Bouscarel B., Wilson P.B., Blackmore P.F., Lynch C.J. y Exton J.H. Agonist-induced down-regulation of the angiotensin II receptor in primary cultures of rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 263: 14.920-14.924. 1988.
23. Brasier AR, Li J. Mechanisms for inducible control of angiotensinogen gene transcription. *Hypertension*; 27(3Pt2):465-475. 1996.
24. Brauneis U., Vassilev P.M., Quinn S.J., Williams G.H. y Tillotson D.L. ANG II blocks potassium currents in zona glomerulosa cells from rats, bovine, and human adrenals. *Am. J. Physiol.*, 260:E772-E779. 1991.
25. Brosnihan K.B. y Ferrario C.M. En: The hypertension and the brain. Guthiere G.P. and Kotchen T.A., eds., pp: 83-112, *Futura*, 1983.
26. Brosnihan K.B., Santos R.A.S., Block C.H. et al. Biotransformation of angiotensins in the central nervous system. *Ther. Res.*, 9(5):48-59. 1988.

27. Brosnihan KB, Senanayake PS, Li P, Ferrario CM. Bi-directional actions of estrogen on the renin-angiotensin system. *Braz J Med Biol Res*; 32(4):273-381. 1999.
28. Bumpus F.M., Catt K.J., Chiu A.T. et al. Nomenclature for angiotensin receptors: A report of the Nomenclature Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension*; 17:720-721. 1991.
29. Cambien F, Alhenc-Gelas F, Herberth B, Andre JL, Rakotovao R, Gonzales MF, Allegrini J, Bloch C. Familial resemblance of plasma angiotensin-converting enzyme level: the Nancy study. *Am J Hum Genet*; 43:774-780. 1988.
30. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Ricard S, Tiret L, Amouyel P, Alhenc-Gelas F, Soubrier F. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature*; 359:641-644. 1992.
31. Campagnole-Santos M.J., Diz D.I., Santos R.A.S., Khosla M.C. y Ferrario C.M. Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. *Am. J. Physiol.*, 257:H324-H329. 1989.
32. Campagnole-Santos M.J., Heringer S.B., Batista E.N., Khosla M.C. y Santos R.A.S. Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. *Am. J. Physiol.*, 263:R89-R94. 1992.
33. Campbell D.J. y Habener J.F. Angiotensin gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J. Clin. Invest.*; 78:31-39. 1986.
34. Campbell DJ. Differential regulation of angiotensin peptides in plasma and kidney: effects of adrenalectomy and estrogen treatment. *Clin Exp Hypertens*; 19(5-6):687-98. 1997.
35. Capponi A.M., Hoang H.V., y Vallotton M.B. Differential effects of cations and guanyl nucleotides on agonist and antagonist binding to rat adrenal and uterine angiotensin II receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 114:325-333. 1985.
36. Catt K.J. y Aguilera G. Angiotensin II receptors. En: *Cellular Receptors for Hormones and Neurotransmitters*. Schuster D. and Levitzki A. eds., pp: 233-251. New York: Wiley. 1980.
37. Caulfield M, Lavender P, Farrall M, Munroe P, Lawson M, Turner P, Clark AJL. Linkage of angiotensinogen gene to essential hypertension. *New Eng J Med*; 330:1629-1633. 1994.
38. Caulfield M, Lavender P, Newell-Price J, Farrall M, Kamdar S, Daniel H, Lawson M, De Freitas P, Fogarty P, Clark AJL. Linkage of the angiotensinogen gene locus to human essential hypertension in African Caribbeans. *J Clin Invest*; 96:687-692. 1995.
39. Chadwick IG, O'Toole L, Morice AH, Yeo WW, Jackson PR, Ramsay R. Pressor and hormonal responses to angiotensin I infusion in healthy subjects of different angiotensin-converting enzyme genotypes. *J Cardiovasc Pharmacol*; 29(4):485-9. 1997.
40. Chaki S. e Inagami T. New signaling mechanism of angiotensin II in neuroblastoma neuro-2A cells: Activation of soluble guanylyl cyclase via nitric oxide synthesis. *Mol. Pharmacol.*, 43:603-608. 1993.

41. Chang R.S. y Lotti V.J. Angiotensin receptor subtypes in rat, rabbit and monkey Tissues: Relative distribution and species dependency. *Life Sci.*, 49:1485-1490. 1991.
42. Chang R.S.L., Siegl P.K.S., Clineschmidt B.V. et al. In vitro pharmacology of L-158, 809, a new highly potent and selective angiotensin II receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 262:133-138. 1992.
43. Chappell MC, Diz DI, YunisC, Ferrario CM. Differential actions of angiotensin-(1-7) in the kidney. *Kidney Int Suppl*; 68:S3-6. 1998.
44. Chappell MC, Gómez MN, Pirro NT, Ferrario CM. Release of angiotensin-(1-7) from the rat hindlimb: influence of angiotensin-converting enzyme inhibition. *Hypertension*; 35(1Pt2):348-352. 2000.
45. Chappell MC, Pirro NT, Sykes A, Ferrario CM. Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension*; 31(1 Pt 2):362-367. 1998.
46. Chiu A.T., Dunscomb J.H., McCall D.E., Benfield P., Baubonis W. y Sauer B. Characterization of angiotensin AT1A receptor isoform by its ligand binding signature. *Regul. Pept.*, 44:141-147. 1993.
47. Chiu A.T., Herblin W.F., McCall D.E. et al. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 165:196-203. 1989.
48. Chung O, Kuhl H, Stoll M, Unger T. Physiological and pharmacological implications of AT1 versus AT2 receptors. *Kidney Int Suppl*; 67:S95-9. 1998.
49. Clauser E., Curnow K.M., Davies E. et al. Angiotensin II receptors: protein and gene structures, expression and potential pathological involvements. *Eur. J. Endocrin.*, 134:403-411. 1996.
50. Coleman J.K.M., Ong B., Sardinia M.F., Harding J.W. y Wright J.W. Changes in renal blood flow due to infusions of angiotensin II (3-8) [AIV] in normotensive rats. *FASEB J.*, 6:A981. 1992.
51. Cottier C, Matter L, Weidman P, Shaw S y Gnadinger MP. Renal response to low dose infusion of atrial natriuretic peptide in normal man. *Kidney Int.* 34(25):S72-S78. 1988.
52. Cottier C., Matter L., Weidman P., Shaw S. y Gnadinger M.P. Renal response to low dose infusion of atrial natriuretic peptide in normal man. *Kidney Int.* 34(25): S72-S78. 1988.
53. Curnow K.M., Pascoe L. y White P.C. Genetic analysis of the human type-1 angiotensin II receptor. *Mol. Endocrinol.*, 6:1113-1118. 1992.
54. Danser AH, Deinum J, Osterop AP, Admiraal PJ, Schalekamp MA. Angiotensin I to angiotensin II conversion in the human forearm and leg. Effect of the angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism. *J Hypertens*; 17(12 Pt 2):1867-72. 1999.
55. Danser AH, Derkx FH, Schalekamp MA, Hense HW, Riegger GA, Schunkert H. Determinants of interindividual variation of renin and prorenin concentrations: evidence for a sexual dimorphism of (pro)renin levels in humans. *J Hypertens*; 16(6):853-62. 1998.

56. Danser AH, Derkx FH, Hense HW, Jeunemaitre X, Riegger GA, Schunkert H. Angiotensinogen (M235T) and angiotensin-converting enzyme (I/D) polymorphisms in association with plasma renin and prorenin levels. *J Hypertens*; 16(12 Pt 2):1879-83. 1998.
57. Davie AP, McMurray JJ. Effect of angiotensin-(1-7) and bradykinin in patients with heart failure treated with an ACE inhibitor. *Hypertension*; 34(3):457-460. 1999.
58. De Gasparo M., Husain A., Alexander W. et al. Proposed update of angiotensin receptor nomenclature. *Hypertension*, 25:924-927. 1995.
59. Deddish PA, Marcic B, Jackman HL, Wang HZ, Skidgel RA, Erdos EG. N-domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and Keto-ACE. *Hypertension*; 31(4):912-917. 1998.
60. Deschepper C.F. Angiotensinogen: hormonal regulation and relative importance in the generation of angiotensin II. *Kidney Int.*, 46(6):1561-1563. 1994
61. Douglas J.G. Angiotensin receptor subtypes of the kidney cortex. *Am. J. Physiol.*, 253:F1-F7. 1987.
62. Douglas J.G., Romero M. y Hopper U. Signaling mechanisms coupled to the angiotensin receptor of proximal tubular epithelium. *Kidney Int.*, Suppl.30:s43-s47. 1990.
63. Dudley D.T. y Summerfelt R.M. Regulated expression of angiotensin II (AT2) binding sites in R3T3 cells. *Regul. Pept.*, 44:199-206. 1993.
64. Dudley D.T., Panek R.L., Major T.C. et al. Subclasses of angiotensin II binding sites and their functional significance. *Mol. Pharmacol.*, 38:370-377. 1990.
65. Dzau V.J, Burt D.W. y Pratt R.E. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Am. J. Physiol.*, 255:F563-F573. 1988.
66. Dzau V.J. y Re R. Tissue angiotensin system in cardiovascular medicine: A paradigm shift?. *Circulation*, 89:493-498. 1994
67. Ehlers MRW, Fox EA, Strydom DJ, Riordan JF Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: the testis isozyme is identical to the C-terminal half of the endothelial angiotensin-converting enzyme. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 86:7741-7745, 1989.
68. Elton T.S., Stephan C.C., Taylor G.R. et al. Isolation of two distinct type 1 angiotensin II receptor genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 184:1067-1073. 1992.
69. Ely D, Turner M, Milsted A. Review of the Y chromosome and hypertension. *Braz J Med Biol Res*; 33(6):679-91. 2000.
70. Esther CR Jr, Marino EM, Howard TE, Machaud A, Corvol P, Capecchi MR, Bernstein KE. The critical role of tissue angiotensin-converting enzyme as revealed by gene targeting in mice. *J Clin Invest*; 99:2375-2385. 1997.
71. Fernandez-Arcas N, Dieguez-Lucena JL, Munoz-moran E, Ruiz-Galdon M, Espinosa-Caliani S, Aranda-Lara P, Martinez-Espigares S, Banderas-Donaire MJ, De Teresa-Galvan E, Reyes-Engel A. The genotype interactions of

- methylenetetrahydrofolate reductase and renin-angiotensin system genes are associated with myocardial infarction. *Atherosclerosis*; 145(2):293-300. 1999.
72. Ferrario C.M., Barnes K.L., Block C.H. et al. Pathways of angiotensin formation and function in the brain. *Hypertension*; 15:113-119. 1990.
 73. Ferrario CM, Brosnihan KB, Diz DI, Jaiswal N, Khosla MC, Milsted A, Tallant EA. Angiotensin-(1-7): a new hormone of the angiotensin system. *Hypertension*; 18(5 Suppl):III126-133. 1991.
 74. Ferrario CM, Chappell MC, Dean RH, Iyer SN. Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function, and natriuresis. *J Am Soc Nephrol*; 9(9):1716-1722. 1998.
 75. Ferrario CM, Martell N, Yunis C, Flack JM, Chappell MC, Brosnihan KB, Dean RH, Fernandez A, Novikov SV, Pinillas C, Luque M. Characterization of angiotensin-(1-7) in the urine of normal and essential Hypertensive subjects. *Am J Hypertens*; 11(2):137-146. 1998.
 76. Ferrario CM. Angiotensin-(1-7) and antihypertensive mechanisms. *J Nephrol*; 11(6):278-83. 1998.
 77. Feuillan P.P., Millan M.A. y Aguilera G. Angiotensin II binding sites in the rat fetus: Characterization of receptor subtypes and interaction with guanyl nucleotides. *Regul. Pept.*, 44:159-169. 1993.
 78. Fornage M, Turner ST, Sing CF, Boerwinkle E. Variation at the M235T locus of the angiotensinogen gene and essential hypertension: a population-based case-control study from Rochester, Minnesota. *Hum Genet*; 96:295-300. 1995.
 79. Fray J. C. S., Park C.S. y Valantine. Calcium and the control of renin secretion. *Endocrine Rev.*, 8:53-93. 1987.
 80. Freeman R. H. y Davis J.O. En: Hypertension 2nd ed. Genest J., kuchel O., Hamet P. and Cantin M., eds., pp: 225-230, McGraw-Hill. 1983.
 81. Fried T.A. y Simpson E.A. Intrarenal localization of angiotensinogen mRNA by RNA-DNA dot blot hybridization. *Am.J. Physiol.* 250:F374-F377. 1986
 82. Frossard PM, Hill SH, Elshahat YI, Obineche EN, Bokhari AM, Lestringant GG, John A, Abdulle AM. Associations of angiotensinogen gene mutations with hypertension and myocardial infarction in a gulf population. *Clin Genet*; 54:285-293. 1998.
 83. Furuta H., Guo D.F. e Inagami T. Molecular cloning and sequencing of the gene encoding human angiotensin II type 1 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 183:8-13. 1992.
 84. Gaillard I, Clauser E, Corvol P. Structure of human angiotensinogen gene. *DNA*; 8:87-99. 1998.
 85. Gaillard-Sánchez I, Mattei MG, Clauser E, Corvol P. Assignment by in situ hybridization of the angiotensinogen gene to chromosome band 1q4, the same region as the human renin gene. *Hum Genet*; 84:341-343. 1990.
 86. Gallagher PE, Li P, Lenhart JR, Chappell MC, Brosnihan KB. Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. *Hypertension*; 31(1Pt2):323-8. 1999.

87. Gandhi SK, Gainer J, King D, Brown NJ. Gender affects renal vasoconstrictor response to AI and AII. *Hypertension*; 31(1):90-6. 1998.
88. Ganong WF. The brain renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol.* 46:17-31. 1984.
89. Gardemann A, Nguyen QD, Humme J, Stricker J, Katz N, Tillmanns H, Herhlein FW, Rau M, Haberbosch W. Angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphism. Absence of an association with the risk of coronary artery disease and myocardial infarction and of a synergistic effect with angiotensin-converting enzyme gene polymorphism on the risk of these diseases. *Eur Heart J*; 19(11):1657-65. 1998.
90. Gemmill RM, Drabkin HA. Report of The Second International Workshop on Human Chromosome 3 Mapping. *Cytogenet Cell Genet*; 57:162-166. 1991.
91. Giner V, Poch E, Bragulat E, Oriola J, Gonzalez D, Coca A, De La Sierra A. Renin-angiotensin system genetic polymorphisms and salt sensitivity in essential hypertension. *Hypertension*; 35(1 Pt 2):512-7. 2000.
92. Griendling K.K., Tsuda T., Berk B.C. y Alexander R.W. Angiotensin II stimulation of vascular smooth muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 14:S27-S33. 1989.
93. Guo DF, Furuta H, Mizukoshi M, Inagami T. The genomic organization of human angiotensin II type 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*; 200:313-319. 1994.
94. Harada K, Komuro I, Hayashi D, Sugaya T, Murakami K, Yazaki Y. Angiotensin II type 1a receptor is involved in the occurrence of reperfusion arrhythmias. *Circulation*; 97:315-317. 1998.
95. Harding J.W., Wright J.W., Swanson G.N., Hanesworth J.M. y Krebs L.T. AT4 receptors: specificity and distribution. *Kidney Int.*, 46(6):1510-1512. 1994.
96. Hata A, Namikawa C, Sasaki M, Sato K, Nakamura T, Tamura K, Lalouel JM. Angiotensinogen as a risk factor for essential hypertension in Japan. *J Clin Invest*; 93:1285-1287. 1994.
97. Hegele RA, Brunt JH, Connelly PW. Genetic and biochemical factors associated with variation in blood pressure in a genetic isolate. *Circulation*; 90:2207-2212. 1994.
98. Herzig TC, Jobe SM, Aoki H, Molkenin JD, Cowley AWJr, Izumo S, Markham BE. Angiotensin II type 1a receptor gene expression in the heart: AP-1 and GATA-4 participate in the response to pressure overload. *Proc Nat Acad Sci*; 94:7543-7548. 1997.
99. Hobart P.M., Fogliano M., O'Connor B.A., Schaeffer I.A. y Chirgwin J. Human renin gene: structure and sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:5026-5030. 1984.

100. Hong J., Sandberg K. y Catt K.J. Novel angiotensin II antagonists distinguish amphibian from mammalian angiotensin II expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol. Pharmacol.*, 39:120-123. 1990.
101. Howard TE, Shai SY, Langford KG, Martin BM, Bernstein KE. Transcription of testicular angiotensin-converting enzyme (ACE) is initiated within the 12th intron of the somatic ACE gene. *Molec Cell Biol*; 10:4294-4302. 1990.
102. Igie R., Erdos E.G., Yeh H.S.J., Sorrels K. y Nakajima T. Angiotensin I converting enzyme of the lung. *Circ. Res.*, 31(II): II51-II56. 1972.
103. Inoue I, Nakajima T, Williams CS, Quackenbush J, Puryear R, Powers M, Cheng T, Ludwig EH, Sharma AM, Hata A, Jeunemaitre X, Lalouel JM. A nucleotide substitution in the promoter of human angiotensinogen is associated with essential hypertension and affects basal transcription in vitro. *J Clin Invest*; 99:1786-1797. 1997.
104. Isa MN, Boyd E, Morrison N, Harrap S, Clauser E, Connor JM. Assignment of the human angiotensin gene to chromosome 1q42-q43 by non isotopic in situ hybridization. *Genomics*; 8:598-600. 1990. Note: Erratum: *Genomics*; 10:1110 only. 1991.
105. Isa MN, Boyd E, Morrison N, Theriault A, Connor JM, Harrap S, Clauser E. Regional chromosomal localization of the human angiotensinogen gene to 1q4.42-4.43 band. (Abstract) *Am J Hum Genet*; 45:a144. 1989.
106. Ito M, Oliverio MI, Mannon PJ, Best CF, Maeda N, Smithies O, Coffman TM. Regulation of blood pressure by type 1A angiotensin II receptor gene. *Proc Nat Acad Sci*; 92:3521-3525. 1995.
107. Itoh S., Carretero O.A. y Murray R. Possible role of adenosine in macula densa mechanism of renin release in rabbits. *J. Clin. Invest.*, 76:1412-1417. 1985.
108. Iwai N. e Inagami T. Identification of two subtypes in the rat type 1 angiotensin II receptor. *FEBS Lett.* 298:257-260. 1992.
109. Iwai N. e Inagami T. Regulation of the expression of the rat angiotensin II receptor mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 182:1094-1099. 1992.
110. Iwai N., Yamano Y., Chaki S. et al. Rat angiotensin II receptor: cDNA sequence and regulation of the gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 177:299-304. 1991.
111. Iyer SN, Lu D, Katovich MJ, Raizada MK. Chronic control of high blood pressure in the spontaneously hypertensive rat by delivery of angiotensin type 1 receptor antisense. *Proc Nat Acad Sci*; 93:9960-9965. 1996.
112. Jackson T.R., Blair L.A., Marshall J., Goedert M. y Hanley M.R. The mas oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature (London)*, 335:437-440. 1988.

113. Jamaluddin M, Meng T, Sun J, Boldogh I, Han Y, Brasier AR. Angiotensin II induces nuclear factor (NF)-kappaB1 isoform to bind the angiotensinogen gene acute-phase response element a stimulus-specific pathway for NF-kappaB activation. *Mol Endocrinol*; 14(1):99-113. 2000.
114. Jarvis M.F., Gessner G.W. y Ly C.G. The angiotensin hexapeptide 3-8 fragment potently inhibits [125I]angiotensin II binding to non-AT1 or -AT2 recognition sites in bovine adrenal cortex. *Eur. J. Pharmacol.*, 219:319-322. 1992.
115. Jeunemaitre X, Ledru F, Battaglia S, Guillanneuf MT, Courbon D, Dumont C, Darmon O, Guize L, Guermonprez JL, Diebold B, Ducimetiere P. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and angiographic extent and severity of coronary artery disease: the CORGENE study. *Hum Genet*; 99(1):66-73. 1997.
116. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charrou A, Hunt SC, Hopkins PN, Williams RR, Lalouel JM, Corvol P. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell*; 71:7-20. 1992.
117. Johnson M.C. y Aguilera G. Angiotensin-II receptor subtypes and coupling to signaling systems in cultured fetal fibroblasts. *Endocrinology (Baltimore)*, 129:1266-1274. 1991.
118. Johnston C.I. Biochemistry and Pharmacology of the renin-angiotensin system. *Drugs*, 39(1):21-31. 1990
119. Julier C, Delepine M, Keabney B, Terwillinger J, Davis S, Weeks D, Bui T, Jeunemaitre X, Velho G, Frogel P, Ratcliffe P, Corvol P, Soubrier F, Lathrop GM. Genetic susceptibility for human familial essential hypertension in a region of homology with blood pressure linkage on rat chromosome 10. *Hum Molec Genet*; 6:2077-2085. 1997.
120. Kageyama R., Ohkubo H. y Nakanishi S. Primary structure of human preangiotensinogen deduced from the cloned cDNA sequence. *Biochemistry* 23:3603-3609,1984
121. Kakar S.S., Riel K.K. y Neill J.D. Differential expression of angiotensin II receptor subtype mRNAs (AT-1A and AT-1B) in the brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 185:688-692. 1992.
122. Kakar S.S., Sellers J.C., Devor D.C., Musgrove L.C. y Neill J.D. Angiotensin II type-1 receptor subtype cDNAs: Differential tissue expression and hormonal regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 183:1090-1096. 1992.
123. Kambayashi Y., Takahashi K., Bardhan S. e Inagami T. Molecular structure and function of angiotensin type 2 receptor. *Kidney Int.*, 46(6):1502-1504. 1994.
124. Kang J., Sumners C. and Posner P. Angiotensin II type 2 receptor-modulated changes in potassium currents in cultured neurons. *Am. J. Physiol.*, 265:C607-C616. 1993.
125. Kapas S., Hinson J.P., Puddefoot J.R., Ho M.M. y Vinson G.P. Internalization of the type 1 angiotensin II receptor (AT1) is required for

protein Kinase C activation but not for inositol trisphosphate in the angiotensin II stimulated rat adrenal cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 204(3):1292-1298. 1994.

126. Katsuya T, Koike G, Yee TW, Sharpe N, Jackson R, Norton R, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ, MacMahon S. Association of angiotensinogen gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease. *Lancet*; 345:1600-1603. 1995.
127. Kehoe P G, Russ C, McIlroy S, Williams H, Holmans P, Holmes C, Liolitsa D, Vahidassr D, Powell J, McGleenon B, Liddell M, Plomin R and 9 others. Variation in DCP1, encoding ACE, is associated with susceptibility to Alzheimer disease. (Letter) *Nature Genet*; 21: 71-72. 1999.
128. Kim DK, Kim JW, Kim S, Gwon HC, Ryu JC, Huh JE, Choo JA, Choi Y, Rhee CH, Lee WR. Polymorphism of angiotensin converting enzyme gene is associated with circulating levels of plasminogen activator inhibitor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 17(11):3242-7. 1997.
129. Kitamura E., Kikkawa R., Fujiwara Y., Imai T. y Shigeta Y. Effect of angiotensin II infusion on glomerular angiotensin II receptor in rats. *Biochim. Biophys. Acta*, 885:309-316. 1986.
130. Kitamura H, Moriyama T, Izumi M, Yokoyama K, Yamauchi A, Ueda N, Kamada T, Imai E. Angiotensin I-converting enzyme insertion/deletion polymorphism: potential significance in nephrology. *Kidney Int Suppl*; 55:S101-3. 1996.
131. Kocsis J.F., Schimmel R.J., McLLroy P.J. y Carsia R.V. Dissociation of increases in intracellular calcium and aldosterone production induced by angiotensin II (AII): evidence for regulation by distinct AII receptor subtypes or isomorphs. *Endocrinology*, 136(4):1626-1634. 1995.
132. Kohara K, Brosnihan KB, Ferrario CM. Angiotensin-(1-7) in the spontaneously hypertensive rat. *Peptides*; 14(5):883-891. 1993.
133. Kohara K, Tabuchi Y, Senanayake P, Brosnihan KB, Ferrario CM. Reassessment of plasma angiotensins measurement: effect of protease inhibitors and sample handling procedures. *Peptides*; 12:1135-1141. 1991.
134. Kremer S.G., Breuer W.V. y Skorecki K.L. Vasoconstrictor hormones depolarize renal glomerular mesangial cells by activating chloride channels. *J. Cell Physiol.*, 138:97-105. 1989.
135. Kunapuli S.P., Prasad G.L. y Kumar A. Expression of human angiotensinogen cDNA in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* 262:7672-7675,1987
136. Lang U., Daniel C., Chardonens D., Capponi A.M. y Vallotton M.B. Modulatory effects of protein Kinase C in bovine adrenal glomerulosa cells. *J. Biol. Chem.*, 262:8047-8050. 1991.
137. Laragh J.H. Atrial natriuretic hormone, the renin-aldosterone axis and blood pressure-electrolyte homeostasis. *New engl. J. Med.* 313:1330-1340. 1985.
138. Lassègue B., Alexander R.W., Clark M. y Griendling K.K. Angiotensin II-induced phosphatidylcholine hydrolysis in cultured vascular smooth muscle cells: Regulation and localization. *Biochem. J.*, 276:19-25. 1991.

139. Lassègue B., Alexander R.W., Clark M., Akers M.A. y Griendling K.K. Phosphatidylcholine is a major source of phosphatidic acid and diacylglycerol in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cells. *Biochem. J.*, 292:509-517. 1993.
140. Lassègue B., Griendling K.K., Murphy T.J. y Alexander R.W. Regulation of angiotensin II receptor expression in vascular smooth muscle cells. *FASEB J.*, 6:A1859. 1992.
141. Le Noble F.A., Schreurs N.H., van Straaten H.W. et al. Evidence for a novel angiotensin II receptor involved in angiogenesis in chick embryochorioallantoic membrane. *Am. J. Physiol.*, 264:R460-R465. 1993.
142. Ledingham JF y Leary WP. Catabolism of angiotensin II. En: Angiotensin (Handbuch der experimentellen Pharmakologie). Page IH and Bumpus FM eds. vol. 37, pp:111-125. Berlin: Springer. 1974.
143. Lefkowitz R.J. G-protein-coupled receptor Kinases. *Cell (Cambridge. Mass)*, 74:409-412. 1993.
144. Lewis J.L., Serikawa T. y Warnock D.G. Chromosomal localization of angiotensin II type 1 receptor isoforms in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 194:677-682. 1993.
145. Li P, Chappell MC, Ferrario CM, Brosnihan KB. Angiotensin-(1-7) augments bradykinin-induced vasodilation by competing with ACE and releasing nitric oxide. *Hypertension*, 29(1Pt2):394-400. 1997.
146. Li Z., Bains J.S. y Ferguson A.V. Functional evidence that the angiotensin antagonist losartan crosses the blood-brain barrier in the rat. *Brain Res. Bull.* 30:33-39. 1993.
147. Lifton RP, Warnock D, Acton RT, Harman L, Lalouel JM. High prevalence of hypertension-associated angiotensinogen variant T235 IN African Americans. (Abstract) *Clin Res*; 260A. 1993.
148. Lindpaintner K, Lee M, Larson MG, Rao VS, Pfeffer MA, Ordovas JM, Schaeffer EJ, Wilson AF, Wilson PWF, Vasan RS, Myers RH, Levy D. Absence of association or genetic linkage between the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular mass. *New Eng J Med*; 334:1023-1028. 1996.
149. Lindpaintner K, Pfeffer MA, Kreutz R, Stampfer MJ, Grodstein F, LaMotte F, Buring J, Hennekens CH. A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *New Eng J Med*; 332:706-711. 1995.
150. Lippold A., Paul M., Fuxe K. y Ganten D. The brain renin-angiotensin system: molecular mechanisms of cell to cell interactions. *Clin Exp. Hypertens.*, 17(1-2):251-266. 1995.
151. Llorens-Cortes C., Greenberg B., Huang H. y Corvol P. Tissue expression and regulation of type 1 angiotensin II receptor subtypes by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain. *Hypertension*, 24(5):538-548. 1994.

152. Lo M., Liu K.L., Lantelme P. y Sassard J. Subtype 2 of angiotensin II receptors controls pressure-natriuresis in rats. *J. Clin. Invest.*, 95(3):1394-1397. 1995.
153. Luque M, Martin P, Martell N, Fernandez C, Brosnihan KB, Ferrario CM. Effects of captopril related to increased levels of prostacyclin and angiotensin-(1-7) in essential hypertension. *J Hypertens*; 14(6):799-805. 1996.
154. Makita N., Iwai N., Inagami T. y Badr K.F. Two distinct pathways in the down-regulation of type-1 angiotensin II receptor gene in rat glomerular mesangial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 185:142-146. 1992.
155. Marcic B, Deddish PA, Jackman HL, Erdos EG. Enhancement of Bradykinin and resensitization of its B2 receptor. *Hypertension*; 33(3):835-843. 1999.
156. Marre M, Jeunemaitre X, Gallois Y, Rodier M, Chatellier G, Sert C, Dusselier L, Kahal Z, Chaillous L, Halimi S, Muller A, sackmann H, Bauduceau B, Bled F, Passa P, Alhenc-Gelas F. Contribution of genetic polymorphism in the renin-angiotensin system to the development of renal complications in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest*; 99: 1585-1595. 1997.
157. Martens JR, Reaves PY, Lu D, Katovich MJ, Berecek KH, Bishop SP, Raizada MK, Gelband CH. Prevention of renovascular and cardiac pathophysiological changes in hypertension by angiotensin II type 1 receptor antisense gene therapy. *Proc Nat Acad Sci.* 95:2664-2669. 1998.
158. Matsui T, Tamaya K, Maysumoto K, Osajima Y, Uezono K, Kawasaki T. Plasma concentration of angiotensin metabolites in young male normotensive and mild hypertensive subjects. *Hypertens Res*; 22(4):273-277. 1999.
159. Mondorf UF, Russ A, Wiessemann A, Herrero M, Oremek G, Lenz T. Contribution of angiotensin I converting enzyme gene polymorphism and angiotensinogen gene polymorphism to blood pressure regulation in essential hypertension. *Am J Hypertens*; 11(2):174-83. 1998.
160. Monnot C., Weber V., Stinnakre J. et al. Cloning and functional characterization of a novel mas-related gene, modulating intracellular angiotensin II actions. *Mol. Endocrinol.*, 5:1477-1487. 1991.
161. Montgomery HE, Clarkson P, Dollery CM, Prasad K, Losi MA, Hemingway H, Statters D, Jubb M, Girvain M, Varnava A, World M, Deanfield J, Talmud P, McEwan JR, McKenna WJ, Humphries S. Association of angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism with change in left ventricular mass in response to physical training. *Circulation*; 96:741-747. 1997.
162. Morduchowicz G.A., Sheikh-Hamad D., Dwyer B.E., Stern N., Jo O.D. y Yanagawa N. Angiotensin II directly increases rabbit renal brush-border membrane sodium transport: Presence of local signal transduction system. *J. Membr. Biol.*, 122:43-53. 1991.
163. Murakami E., Eggena P., Barret J.D. y Sambhi M.P. Heterogeneity of renin substrate released from hepatocytes and in brain extracts. *Life Sci.*, 34:385-392. 1984

164. Murphey LJ, Gainer JW, Vaughan DE, Brown NJ. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism modulates the human in vivo metabolism of bradykinin. *Circulation*; 102(8):829-832. 2000.
165. Murphy T.J., Alexander R.W., Griendling K.K., Runge M.S. y Bernstein K.E. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature (London)*, 351:233-236. 1991.
166. Nakamoto H, Ferrario CM, Fuller SB, Robaczewski DL, Winicov E, Dean RH. Angiotensin-(1-7) and nitric oxide interaction in renovascular hypertension. *Hypertension*; 25:796-802. 1995.
167. Nakamura N., Soubrier F., Menard J., Panthier J.J., Rougeon F. y Corvol P. Nonproportional changes in plasma renin concentration, renal renin content, and rat renin messenger RNA. *Hypertension*, 7:855-859. 1985.
168. Naville D., Lebrethon M.C., Kermabon A.Y., Rouer E., Benarous R. y Saez J.M. Characterization and regulation of the angiotensin II type-1 receptor (binding and mRNA) in human adrenal fasciculata-reticularis cells. *FEBS Lett.* 321:184-188. 1993
169. Nickenig G, Geisen G, Vetter H, Sachinidis A. Characterization of angiotensin receptors on human skin fibroblasts. *J Mol Med*; 75(3):217-222. 1997.
170. Niu T, Chen C, Yang J, Wang B, Wang Z, Schork N, Fang Z, Xu X. Blood pressure and the T174M and M235T polymorphisms of the angiotensinogen gene. *Ann Epidemiol*; 9(4):245-53. 1999.
171. Niu T, Xu X, Rogus J, Zhou Y, Chen C, Yang J, Fang Z, Schmitz C, Zhao J, Rao VS, Lindpaintner K. Angiotensinogen gene and hypertension in Chinese. *J Clin Invest*; 101:188-194. 1998.
172. Ohishi M, Fujii K, Minamino T, Hagaki J, Kamitani A, Rakugi H, Zhao Y, Mikami H, Miki T, Ogihara T. A potent genetic risk factor for restenosis.(Letter) *Nature Genet*; 5:324-325. 1993.
173. Oike Y, Hata A, Ogata Y, Numata Y, Shido K, Kondo K. Angiotensin converting enzyme as a genetic risk factor for coronary artery spasm: implication in the pathogenesis of myocardial infarction. *J Clin Invest*; 96:2975-2979. 1995.
174. Oliverio MI, Kim HS, Ito M, Le T, Audoly L, Best CF, Hiller S, Kluckman K, Maeda N, Smithies O, Coffman TM. Reduced growth, abnormal kidney structure, and type 2 (AT2) angiotensin receptor-mediated blood pressure regulation in mice lacking both AT1a and AT1b receptors for angiotensin II. *Proc Nat Acad Sci*; 95:15496-15501. 1998.
175. Olivieri O, Trabetti E, Grazioli S, Stranieri C, Friso S, Girelli D, Russo C, Pignatti PF, Mansueto G, Corrocher R. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and atheromatous renal artery stenosis. *Hypertension*; 34(5):1097-100. 1999.
176. Paillard F, Chansel D, Brand E, Benetos A, Thomas F, Czekalski S, Ardaillou R, Soubrier F. Genotype-phenotype relationships for the renin-angiotensin-aldosterone system in a normal population. *Hypertension*; 34(3):423-9. 1999.

177. Paula RD, Lima CV, Britto RR, Campagnole-Santos MJ, Khosla MC, Santos RA. Potentiation of the hypotensive effect of bradykinin by angiotensin-(1-7)-related peptides. *Peptides*; 20(4):493-500. 1999.
178. Pobiner B.F., Hewlett E.L. y Garrison J.C. Role of Ni in coupling angiotensin receptors to inhibition of adenilate cyclase in hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 260:16200-16209. 1985.
179. Porsti I, Bara AT, Busse R, Hecker M. Release of nitric oxide by angiotensin-(1-7) from porcine coronary endothelium: implications for a novel angiotensin receptor. *Br J Pharmacol*; 111(3):652-4. 1994.
180. Porter J.P., Said S.I. y Ganong W.F. Vasoactive intestinal peptide stimulates renin secretion in vitro: evidence of a direct action of the peptide on the renal juxtaglomerular cells. *Neuroendocrinology*, 36:404-410. 1983.
181. Pratt JH, Ambrosius WT, Tewksbury DA, Wagner MA, Zhou L, Hanna MP. Serum angiotensinogen concentration in relation to gonadal hormones, body size, and genotype in growing young people. *Hypertension*; 32(5):875-9. 1998.
182. Pucell A.G., Bumpus F.M. y Husain A. Regulation of angiotensin II receptors in cultured rat ovarian granulosa cells by follicle-stimulating hormone and angiotensin II. *J. Biol. Chem.*, 263:11954-11961. 1988.
183. Ramaraj P, Kessler SP, Colmenares C, Sen GC Selective restoration of male fertility in mice lacking angiotensin converting enzymes by sperm-specific expression of the testicular isozyme. *J. Clin. Invest.* 102:371-378. 1998.
184. Reagan L.P., Ye X., Maretzki C.H. y Fluharty S.J. Down-regulation of angiotensin II receptor subtypes and desensitization of cyclic GMP production in neuroblastoma N1E-115 cells. *J. Neurochem.*, 60:24-31. 1993.
185. Regitz-Zagrosek V, Neuss M, Holzmeister J, Warnecke C, Fleck E. Molecular biology of angiotensin receptors and their role in human cardiovascular disease. *J Mol Med*; 74(5):233-251. 1996
186. Rice GI, Foy CA, Grant PJ. Angiotensin converting enzyme and angiotensin II type 1-receptor gene polymorphisms and risk of ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res*; 41(3):746-53. 1999.
187. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*; 86:1343-1346. 1990.
188. Roks AJ, van Geel PP, Pinto YM, Buikema H, Henning RH, de Zeeuw D, van Gilst WH. Angiotensin-(1-7) is a modulator of the human renin-angiotensin system. *Hypertension*; 34(2):296-301. 1999.
189. Rosivall L, Narkates AJ, Oparil S y Navar LG. Denovo intrarenal formation of angiotensin II during control and enhanced renin secretion. *Am J Physiol*; 252:F1118-F1123. 1987.
190. Ruiz J, Blanche H, Cohen N, Velho G, Cambien F, Cohen D, Passa P, Froguel P. Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting

- enzyme gene is strongly associated with coronary heart disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Nat Acad Sci*; 91:3662-3665. 1994.
191. Russ AP, Maerz W, Ruzicka V, Stein U, Grob W. Rapid detection of the hypertension associated met²³⁵-Thr allele of the human angiotensinogen gene. *Hum Mol Genet* 2:609-610. 1993 .
 192. Ryan U.S. and Ryan J.W. Angiotensin converting enzyme: II. Pulmonary endothelial cells in culture. *Env. Health perspectives.*, 35:171-180. 1980.
 193. Sachinidis A., Ko Y., Weisser P. et al. EXP3174, a metabolite of losartan (MK 954, DuP 753) is more potent than losartan in blocking the angiotensin II-induced responses in vascular smooth muscle cells. *J. Hypertens.*, 11:155-162. 1993.
 194. Sandberg K., Ji H., Clark A.J.L., Shapira H. y Catt K.J. Cloning and expression of a novel angiotensin II receptor subtype. *J. Biol. Chem.*, 267:9455-9458. 1992.
 195. Santos RA, Baracho NC. Angiotensin-(1-7) is a potent antidiuretic peptide in rats. *Braz J Med Biol Res*; 25(6):651. 1992.
 196. Santos RA, Brosnihan KB, Jacobsen DW, DiCorleto PE, Ferrario CM. Production of angiotensin-(1-7) by human vascular endothelium. *Hypertension*; 19(2 Suppl):II56-61. 1992.
 197. Sardinia M.F., Hanesworth J.M., Krebs L.T. y Harding J.W. AT4 receptor binding characteristics: D-amino acid and glyche-substituted peptides. *Peptides*, 14:949-954. 1993.
 198. Sardinia M.F., Hanesworth J.M., Krishnan F. y Harding J.W. AT4 receptor structure-Binding relationship: N-terminal-modified angiotensin IV analogues. *Peptides*, 15(8):1399-1406. 1994.
 199. Saris JJ, Van Dijk MA, Kroon I, Schalekamp MA, Danser AH. Functional importanc of angiotensin-converting enzyme-dependent in situ angiotensin II generation in the human forearm. *Hypertension*; 35(3):764-8. 2000.
 200. Sasaki K., Yamano Y., Bardhan S. et al. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature (London)*, 351:230-233. 1991.
 201. Sato A., Suzuki H., Murakami M., Nakazato Y., Iwaita Y. y Saruta T. Glucocorticoid increases angiotensin II type 1 receptor and its gene expression. *Hypertension*, 23:25-30. 1994.
 202. Schiavone M.T., Santos R.A.S., Brosnihan K.B., Khosla M.C. y Ferrario C. Release of vasopressin from the hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:4095-4098. 1988.
 203. Schlondorff D., DeCandido S. y Satriano J.A. Angiotensin II stimulates phospholipases C and A2 in cultured rat mesangial cells. *Am. J. Physiol.*, 253:C113-C120. 1987.

204. Schmidt S, Beige J, Walla-Friedel M, Michel MC, Sharma AM, Ritz E. A polymorphism in the gene for the angiotensin II type 1 receptor is not associated with hypertension. *J Hypertens*; 15(12 Pt 1):1385-8. 1997.
205. Schunkert H, Hense HW, Holmer SR, Stender M, Perz S, Keil U, Lorell BH, Riegger GAJ. Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *New Eng J Med*; 330:1634-1638. 1994.
206. Sealey J.E., Atlas S.A. y Laragh J.H. Prorenin in plasma and kidney. *Fed. Proceed.*, 42:2681-2689. 1983.
207. Shanmugam S. y Sandberg K. Ontogeny of angiotensin II receptors. *Cell Biol. Int.*, 20(3):169-176. 1996.
208. Shanmugam S., Corvol P. y Gasc J.M. Ontogeny of the two angiotensin II type 1 receptor subtypes in rats. *Am. J. Physiol.*, 267:828-836. 1994.
209. Shimamoto K, Nakagawa M, Iimura O. In vivo concentration of kinins and angiotensins. *Horm Metab Res Suppl*; 22:75-9. 1990.
210. Silva L.C.S., Fontes M.A.P., Campagnole-Santos M.J. et al. Cardiovascular effects produced by microinjection of angiotensin-(1-7) on vasopressor and vasodepressor sites of the ventrolateral medulla. *Brain Res.*, 613:321-325. 1993.
211. Skott O. y Briggs J.P. Direct demonstration of macula densa-mediated renin secretion. *Science*, 237: 1618-1620. 1987.
212. Smith J.B. Angiotensin-receptor signaling in cultured vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.*, 250:F759-F769. 1986.
213. Speth R.C. [¹²⁵I]CGP42112 binding reveals differences between rat brain and adrenal AT₂ receptor binding sites. *Regul. pept.*, 44:189-197. 1993.
214. Speth R.C. y Kim K.H. Discrimination of two angiotensin II receptor subtypes with a selective agonist analogue of angiotensin II, p-aminophenylalanine 6 angiotensin II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 169:997-1006. 1990.
215. Spiering W, Kroon AA, Fuss-Lejeune MM, Daemen MJ, de Leeuw PW. Angiotensin II sensitivity is associated with the angiotensin II type 1 receptor A(1166)C polymorphism in essential hypertensives on a high sodium diet. *Hypertension*; 36(3):411-416. 2000.
216. Stangl K, Cascorbi I, Stangl V, Laule M, Mrozikiewicz PM, Schwarz M, Felix SB, Theres H, Baumann G, Roots I. A1166C polymorphism of the angiotensin II type 1 receptor gene and risk of adverse events after coronary catheter interventions. *Am Heart J*; 140(1):170-175. 2000.
217. Stock P, Liefeldt I, Paul M y Ganten D. Local renin angiotensin systems in cardiovascular tissues: localization and functional role. *Cardiology*; 86(1):2-8. 1995.
218. Szpirer C, Riviere M, Szpirer J, Levan G, Guo DF, Iwai N, Inagami T. Chromosomal assignment of human and rat hypertension candidate genes:

- type 1 angiotensin II receptor genes and the SA gene. *J Hypertension*; 11:919-925. 1993.
219. Takayanagi R, Ohnaka K, Sakai Y, Nakao R, Yanase T, Haji M, Inagami T, Furuta H, Gou DF, Nakamuta M, Nawata H. Molecular cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding human type 1 angiotensin II receptor. *Biochem Biophys Res Commun*; 183:910-916. 1992.
220. Tallant EA, Diz DI, Ferrario CM. Antiproliferative actions of angiotensin-(1-7) in the vascular smooth muscle. *Hypertension*; 34(4Pt 2):950-957. 1999.
221. Tallant EA, Jaiswal N, Diz DI, Ferrario CM. Human astrocytes contain two distinct angiotensin receptor subtypes. *Hypertension*; 18(1):32-9. 1991.
222. Timmermans P.B., Chiu A.T., Herblin W.F., Smith R.D. y Wong P.C. Multiple angiotensin receptors: selective ligands and functional correlates. *Jpn. J. Pharmacol.*, 58:135P-141P. 1992.
223. Timmermans P.B., Wong P.C., Chiu A.T. y Harblin W.F. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.*, 12:55-62. 1991.
224. Tired L, Blanc H, Ruidavets JB, Arveiler D, Luc G, Jeunemaitre X, Tichet J, Mallet C, Poirier O, Plouin PF, Cambien F. Gene polymorphisms of the renin-angiotensin system in relation to hypertension and parental history of myocardial infarction and stroke: the PEGASE study. *J Hypertens*; 16(1):37-44. 1998.
225. Tired L, Bonnardeaux A, Poirier O, Ricard S, Marques-Vidal P, Evans A, Arveiler D, Luc G, Kee F, Ducimetiere P, et al. Synergistic effects of angiotensin-converting enzyme and angiotensin-II type 1 receptor gene polymorphisms on risk of myocardial infarction. *Lancet*; 344(8927):910-3. 1994.
226. Tired L, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, Cambien F, Soubrier F. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet*; 51:197-205. 1992.
227. Tissir F., Riviere M., Guo D.F. et al. Localization of the genes encoding the three rat angiotensin II receptors, and the human AGTR2 receptor respectively to rat chromosomes 17q12,2q24 and Xq34, and the human Xq22. *Cytogenet. Cell Genet.*, 71(1):77-80. 1995.
228. Toney G.M. y Porter J.P. Functional role of brain AT1 and AT2 receptors in the central angiotensin II pressor response. *Brain Res.*, 603:57-63. 1993.
229. Tsuda T., Griendling K.K., Ollerenshaw J.D., Lassègue B. y Alexander R.W. Angiotensin II- and endothelin-induced protein phosphorylation in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Vasc. Res.*, 686. 1993.

230. Tsutsumi K. y Saavedra J.M. Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT1 and AT2) in rat brain. *Am. J. Physiol.*, 261:R209-R216. 1991.
231. Tsutsumi K. y Saavedra J.M. Heterogeneity of angiotensin II AT2 receptors in the rat brain. *Mol. Pharmacol.*, 41:290-297. 1992.
232. Tufro-McReddie A., Harrison J.K., Everett A.D. y Gomez R.A. Ontogeny of type 1 angiotensin II receptor gene expression in the rat. *J. Clin. Invest.*, 91:530-537. 1993.
233. Ueda S, Masumori-Maemoto S, Ashino K, Nagahara T, Gotoh E, Umemura S, Ishii M. Hypertension; 35(4):998-1001. 2000.
234. Ullian M.E. y Linas S.L. Angiotensin II surface receptor coupling to inositol trisphosphate formation in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 265:195-200. 1990.
235. Van Dijk MA, Kroon I, Kamper AM, Boomsma F, Danser AH, Chang PC. The angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and responses to angiotensins and bradykinin in the human forearm. *J Cardiovasc Pharmacol*; 35(3):484-90. 2000.
236. Van Geel PP, Pinto YM, Buikema H, van Gilst WH. Is the A1166C polymorphism of the angiotensin II type 1 receptor involved in cardiovascular disease?. *Eur Heart J*; Suppl G:G13-7. 1998.
237. Van Geel PP, Pinto YM, Voors AA, Buikema H, Oosterga M, Crijns HJ, Van Gilst WH. *Hypertension*; 35(3):717-21. 2000.
238. Van Sande M.E., Scharp S.L., Neels H.M. y Van Camp K.O. Distribution of angiotensin converting enzyme in human tissues. *Clin. Chem. Acta.* 147:255-260. 1985.
239. Vasku A, Soucek M, Znojil V, Rihacek I, Tschoplova S, Strelcova L, Cidl K, Blazkova M, Hajek D, Holla L, Vacha J. Angiotensin I-converting enzyme and angiotensinogen Gene interaction and prediction of essential hypertension. *Kidney Int*; 53(6):1479-82. 1998.
240. Viswanathan M., Tsutsumi K., Correa F.M. y Saavedra J.M. Changes in expression of angiotensin receptor subtypes in the rat aorta during development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 179:1361-1367. 1991.
241. Von Lutterotti N., Cantanzaro D.F., Sealey J.E. y Laragh J.H. Renin is not synthesized by cardiac and extrarenal vascular tissues. *Circulation*; 89:458-470. 1994.
242. Voors AA, Pinto YM, Buikema H, Urata H, Oosterga M, Rooks G, Grandjean JG, Ganten D, van Gilst WH. Dual pathway for angiotensin II formation in the human internal mammary arteries. *Br J Pharmacol*; 125(5):1028-32. 1998.
243. Wagner D, Metzger R, Paul M, Ludwig G, Suzuki F, Takahashi S, Murakami K, Ganten D. Androgen dependence and tissue specificity of renin messenger RNA expression in mice. *J Hypertens*; 8(1):45-52. 1990.
244. Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Lindschau C, Horstkamp B, Jupner A, Baur E, Nissen E, Vetter K, Neichel D, Dudenhausen JW, Haller H, Luft FC.

- Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT-1 receptor. *J Clin Invest*; 103:945-952. 1999.
245. Wang WYS, Zee RYL, Morris BJ. Association of angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism with essential hypertension. *Clin Genet*; 51:31-34. 1997.
246. Ward K, Hata A, Jeunemaitre X, Helin C, Nelson L, Namikawa C, Farrington PF, Ogasawara M, Suzumori K, Tomoda S, Berrebi S, Sasaki M, Corvol P, Lifton RP, Lalouel JM. A molecular variant of angiotensinogen associated with preeclampsia. *Nature Genet*; 4:59-61. 1993.
247. Ward K, Hata A, Jeunemaitre X, Helin C, Nelson L, Namikawa C, Farrington PF, Ogasawara M, Suzumori K, Tomoda S, Berrebi S, Sasaki M, Corvol P, Lifton RP, Lalouel JM. A molecular variant of angiotensinogen associated with preeclampsia. *Nature Genet*; 4:59-61. 1993.
248. Welches WR, Brosnihan KB, Ferrario CM. A comparison of the properties and enzymatic activities of three angiotensin processing enzymes: angiotensin converting enzyme, prolyl endopeptidase and neutral endopeptidase 24.11. *Life Sci*; 52(18):1461-80. 1993.
249. Winkelmann BR, Nauck M, Klein B, Russ AP, Bohm BO, Siekmeier R, Ihnken K, Verho M, Gross W, Marz W. Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with increased plasma angiotensin-converting enzyme activity but not with increased risk for myocardial infarction and coronary artery disease. *Ann Intern Med*; 125:19-25. 1996.
250. Workman RJ, Sussman CR, Burkitt DW, Liddle GW. Circulating levels of angiotensin I measured by radioimmunoassay in hypertensive subjects. *Lab Clin Med*; 93(5):847-56. 1979.
251. Wright J.W., Miller-Wing A.V., Shaffer M.J. et al. Angiotensin II (3-8) (Ang IV) hippocampal binding: Potential role in the facilitation of memory. *Brain Res. Bull.*, 32:492-502. 1993.
252. Yamada K, Shridhar NI, Chappell MC, Ganten D, Ferrario CM. Converting enzyme determines plasma clearance of angiotensin-(1-7). *Hypertension*; 32:496-502. 1998.
253. Yoshida H, Mitarai T, Kawamura T, Kitajima T, Miyazaki Y, Nagasawa R, Kawaguchi Y, Kubo H, Ichikawa I, Sakai O. Role of the deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene in the progression and therapeutic responsiveness of Ig A nephropathy. *J Clin Invest*; 96:2162-2169. 1995.
254. Yoshioka T, Xu Y, Yoshida H, Shiraga H, Muraki T, Ito K. Deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene predicts persistent proteinuria in Henoch-Schonlein purpura nephritis. *Arch Dis Child*; 79; 394-399. 1998.
255. Zhang X, Erdmann J, Regitz-Zagrosek V, Kurzinger S, Hense HW, Schunkert H. Evaluation of three polymorphisms in the promoter region of the angiotensin II type 1 receptor gene. *J Hypertens*, 18(3):267-72. 2000.