



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“POLIMORFISMOS T-786C, G894T Y G10T EN EL GEN NOS3 Y SU  
RELACIÓN CON PRESIÓN ARTERIAL ALTA EN POBLACIÓN  
GUERRERENSE”.**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**PRESENTA:**

**QBP. RUBÉN BARRIENTOS NORIEGA**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. LORENZO SALGADO GOYTIA**

**CODIRECTORA DE TESIS: DRA. ALEJANDRA GUADALUPE GARCÍA ZAPIÉN**

CHILPANCINGO, GRO. ENERO 2017.

**“POLIMORFISMOS T-786C, G894T Y G10T EN EL GEN NOS3 Y SU RELACIÓN  
CON PRESIÓN ARTERIAL ALTA EN POBLACIÓN GUERRERENSE”.**

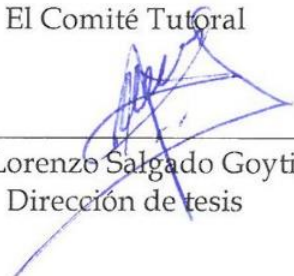


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

APROBACIÓN DE TESIS

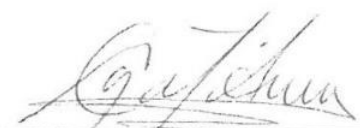
En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 29 días del mes de septiembre de dos mil dieciséis, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Polimorfismos T-786C, G894T y G10T en el gen NOS3 y su relación con presión arterial alta en población guerrerense", presentada por el alumno Rubén Barrientos Noriega, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

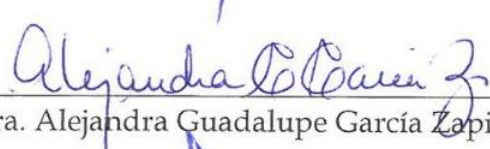
El Comité Tutorial

  
Dr. Lorenzo Salgado Goytia  
Dirección de tesis

  
Dr. Donaciano Flores Robles

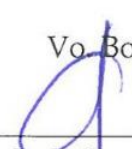
  
Dra. Isela Parra Rojas

  
Dra. Natividad Castro Alarcón

  
Dra. Alejandra Guadalupe García Zapién

Vo. Bo

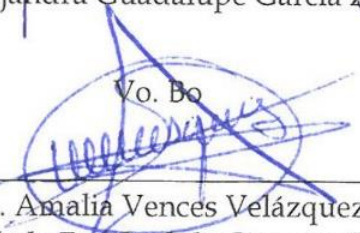
Vo. Bo

  
Dra. Isela Parra Rojas  
Coordinadora del Posgrado de la Facultad de  
Ciencias Químico Biológicas



Coordinación del  
Posgrado de la FCQB

Coordinación 2014-2018

  
Dra. Amalia Vences Velázquez  
Directora de la Facultad de Ciencias Químico  
Biológicas

  
UAGro  
Universidad Autónoma de Guerrero  
DIRECCIÓN 2014 -

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN OBESIDAD Y DIABETES, DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS PERTENECIENTE A LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO.

**BAJO LA DIRECCIÓN DE:**

DR. LORENZO SALGADO GOYTIA

**CODIRECCIÓN DE:**

DRA. ALEJANDRA GUADALUPE GARCÍA ZAPIÉN

**LA ASESORÍA DE:**

DRA. ISELA PARRA ROJAS

DRA. NATIVIDAD CASTRO ALARCÓN

DR. DONACIANO FLORES ROBLES

ESTA INVESTIGACIÓN SE DESARROLLÓ CON EL FINANCIAMIENTO DE PIFI 2015.

DURANTE EL PERÍODO EN QUE CURSÓ LA MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS, EL C. RUBÉN BARRIENTOS NORIEGA, RECIBIÓ BECA DEL CONACYT.

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente agradezco a la Universidad Autónoma de Guerrero y a la Facultad de Ciencias Químico Biológicas por haberme aceptado a ser parte de ella y abierto las puertas en su seno científico a fin de estudiar la Maestría en Ciencias Biomédicas, así como a los diferentes docentes que brindaron sus conocimientos en esta etapa de formación.

Gracias por la dirección del Dr. Lorenzo Salgado y codirección de la Dra. Alejandra G. García, participación de la Dra. Isela Parra, Dra. Natividad Castro y Dr. Donaciano Flores, por su paciencia, compromiso y criterio. Ha sido satisfactorio contar su guía.

Gracias a todos mis compañeros en la maestría y en el Laboratorio de Investigación en Obesidad y Diabetes, partícipes en mi preparación para la vida profesional, en especial a Alejandra, Constanza, Dulce y Julio con los cuales conviví más tiempo e hicieron que este trabajo fuera menos complicado y más entretenido. Aunque casi ya no los vea, mi amistad sigue presente.

Gracias a mi familia y a mi novia Laura, quienes tuvieron confianza en mí y me empujaron emocionalmente durante mi aventura en la tesis de maestría.

## DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis a mis padres, porque gracias a ellos estoy en este mundo, por su apoyo incondicional y su paciencia, todo lo que soy es gracias a ellos.

*“La verdadera ignorancia no es la ausencia de conocimientos... sino el hecho de rehusarse a adquirirlos”*

(Karl Popper)

## ÍNDICE

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>INDICE DE TABLAS Y FIGURAS</b>	<b>I</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>II</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>III</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>3</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>5</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>12</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>17</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>18</b>

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

		PÁGINA
<b>Tabla 1</b>	Secuencia de los iniciadores, programa de amplificación, enzimas de restricción y temperaturas de restricción	4
<b>Tabla 2</b>	Características clínicas y bioquímicas de los grupos de estudio	5
<b>Tabla 3</b>	Efecto de las covariables sobre la presión arterial sistólica y diastólica	6
<b>Tabla 4</b>	Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas los polimorfismos T-786C, G894T y G10T del gen <i>NOS3</i> en la población guerrerense	7
<b>Tabla 5</b>	Comparación de las características clínicas y bioquímicas en la población guerrerense, agrupadas por genotipos del polimorfismo T-786C	8
<b>Tabla 6</b>	Comparación de las características clínicas y bioquímicas en la población guerrerense, agrupadas por genotipos del polimorfismo G894T	9
<b>Tabla 7</b>	Comparación de las características clínicas y bioquímicas en la población guerrerense, agrupadas por genotipos del polimorfismo G10T	9
<b>Tabla 8</b>	Frecuencias de haplotipos inferidos en la población guerrerense	10
<b>Figura 1</b>	Desequilibrio de ligamiento de los SNPs: T-786C, G894T y G10T, en el gen <i>NOS3</i>	11



## Resumen

**Antecedentes:** A nivel mundial, uno de cada tres adultos tiene presión arterial alta. El óxido nítrico (NO) es un radical libre endógeno, que participa en la vasorelajación, y por consiguiente, en la reducción de la resistencia vascular y de la presión arterial. El óxido nítrico es sintetizado por la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), codificada en el gen *NOS3*. Los polimorfismos (T-786C, G894T y G10T) localizados en este gen, pueden estar relacionados con la reducción de la expresión o de la actividad de eNOS, provocando menor producción de NO y a su vez estar asociados clínicamente con la presión arterial alta. **Objetivo:** Evaluar si los polimorfismos T-786C, G894T y G10T en el gen *NOS3* están asociados con la presencia de presión arterial alta en población guerrerense. **Materiales y métodos:** Se seleccionaron 109 casos con PAS 120-139 mmHg y/o PAD 80-89 mmHg y 271 controles con PAS <120 y PAD <80 mmHg, todos entre 18-30 años, originarios del Estado de Guerrero. Se genotipificaron por PCR-RFLPs. **Resultados:** En el análisis, las frecuencias alélicas mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el polimorfismo G894T, entre casos y controles, pero no se mantuvieron después del ajuste por covariables ( $p > 0.05$ ). Por coeficientes de regresión, se determinó que el género ( $\beta = 10.642$  mmHg) e IMC ( $\beta = 1.361$  mmHg), incrementaron significativamente ( $p < 0.01$ ) la PAS, mientras que el género ( $\beta = 2.281$  mmHg), el IMC ( $\beta = 0.633$  mmHg) y la glucosa ( $\beta = 0.082$  mmHg) incrementaron significativamente la PAD. Las frecuencias del haplotipo TTG (3 SNPs) mostraron diferencias significativas entre normotensos e individuos guerrerenses con presión arterial alta (RM=2.38, IC 95% 1.13-4.98,  $p < 0.05$ ). **Conclusión:** El haplotipo TTG de los polimorfismos T-786C, G894T y G10T de *NOS3*, se asocia con la presión arterial alta en población guerrerense.

**Palabras Clave:** Óxido nítrico, polimorfismo, T-786C, G894T, G10T, gen *NOS3*, presión arterial alta.

## Abstract

**Background:** Globally, one in three adults has high blood pressure. Nitric oxide (NO) is an endogenous free radical, involved in vasorelaxation, and therefore, in reducing vascular resistance and blood pressure. Nitric oxide is synthesized by the enzyme endothelial nitric oxide synthase (eNOS), encoded in the *NOS3* gene. The polymorphisms (T-786C, G894T and G10T) localized in this gene may be related to the reduction of eNOS expression or activity, leading to lower NO production and in turn being clinically associated with high blood pressure. **Objective:** To evaluate whether the T-786C, G894T and G10T polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene are associated with the presence of high blood pressure in population of the State of Guerrero. **Materials and methods:** We selected 109 cases with SBP 120-139 mmHg and/or DBP 80-89 mmHg and 271 controls with SBP <120 and DBP <80 mmHg, all aged 18-30, originating in the State of Guerrero. They were genotyped by PCR-RFLPs. **Results:** In the analysis, allele frequencies showed significant differences ( $p < 0.05$ ) in the G894T polymorphism between cases and controls, but were not maintained after adjustment for covariates ( $p > 0.05$ ). By regression coefficients, gender ( $\beta = 10.642$  mmHg) and BMI ( $\beta = 1.361$  mmHg) were significantly increased ( $p < 0.01$ ) SBP, while gender ( $\beta = 2.281$  mmHg), BMI ( $\beta = 0.633$  mmHg) and glucose ( $\beta = 0.082$  mmHg) significantly increased DBP. The frequencies of the TTG haplotype (Three SNPs) showed significant differences between normotensive and individuals of the State of Guerrero with high blood pressure (OR = 2.38, 95% CI 1.13-4.98,  $p < 0.05$ ). **Conclusion:** The TTG haplotype of *NOS3* polymorphisms T-786C, G894T and G10T is associated with high blood pressure in population of the State of Guerrero.

**Key words:** Nitric oxide, polymorphism, T-786C, G894T, G10T, *NOS3* gene, high blood pressure.

## Introducción

A nivel mundial, alrededor del 50% de las muertes son causadas por presión arterial alta, ocurre en individuos con presión sistólica entre 115-140 mmHg, sugiriendo que una importante proporción de la mortalidad en humanos es atribuible a la prehipertensión (120-139/80-89 mmHg) (Williams *et al.*, 2009).

La prehipertensión es una fase preclínica, en la que los individuos presentan niveles de la presión arterial superiores a lo normal, favoreciendo un mayor riesgo para desarrollar hipertensión (Vasan *et al.*, 2001). Guzmán-Guzmán *et al.* (2013), reportaron una prevalencia de prehipertensión del 38.9% en hombres y 21.1% en mujeres en el Estado de Guerrero.

La hipertensión arterial, se define como una presión igual o superior a 140/90 mmHg en adultos de 18 años o más (Pickering *et al.*, 2005). La hipertensión es una enfermedad compleja, que puede conllevar a accidentes cerebrovasculares, infarto al miocardio, insuficiencia cardiaca y enfermedad arterial coronaria (Chobanian *et al.*, 2003). La prevalencia de hipertensión en hombres es de 17.2% y mujeres del 9.4%, en el Estado de Guerrero (INSP, 2013).

En el desarrollo de la hipertensión, el evento primario es la disfunción endotelial, que involucra la alteración de las propiedades vasodilatadoras del endotelio (Williams *et al.*, 1996); principalmente, la disminución en la síntesis, liberación y actividad de un factor derivado del endotelio, el óxido nítrico (NO). Bajo condiciones fisiológicas, el NO desempeña un papel importante en la regulación del tono vascular, el cual ejerce efectos vasoprotectores: eliminando radicales superóxido, inhibiendo la agregación plaquetaria, la adhesión leucocitaria y la proliferación de las células musculares lisas (Kubes *et al.*, 1991).

La enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), sintetiza al óxido nítrico, a partir de L-arginina sin gasto de energía. El gen que codifica a la eNOS se localiza en 7q36 e incluye 26 exones, abarcando 21 kb del genoma (Marsden *et al.*, 1993). Actualmente, hay más de 1,450 polimorfismos validados en la base de SNP (NCBI, 2016). Varios estudios, han mostrado efectos funcionales e implicaciones clínicas

de los SNPs T-786C, G894T y G10T en el gen *NOS3*, con enfermedades cardiovasculares.

El SNP T-786C, ubicado en la región promotora del gen *NOS3*, se ha relacionado con una secuencia consenso para la proteína de replicación A1 (RPA1), un factor transcripcional negativo para *NOS3*. Experimentalmente, mediante ensayos de luciferasa, se ha observado en portadores del alelo C, una reducción en la actividad de la región promotora del gen *NOS3* con una consecuente disminución de los niveles de óxido nítrico en cultivos de células endoteliales humanas (Miyamoto *et al.*, 2000).

El SNP G894T (exón 7) ocasiona la sustitución de ácido glutámico (Glu) por ácido aspártico (Asp) en la posición 298 de la eNOS. Este cambio, implica la reducción de la biodisponibilidad de la enzima eNOS catalíticamente activa (Casas *et al.*, 2006).

Para el SNP G10T (intrón 23), la presencia del alelo T, genera un sitio de reconocimiento para el corte y empalme, se afecta así la estabilidad del ARN mensajero y con ello se alteran los niveles de expresión de la enzima eNOS, y a la vez se pueden disminuir los niveles de óxido nítrico (Abel & Wilkins, 2004; Li *et al.*, 2011).

Existen resultados controversiales con respecto a la asociación de estos polimorfismos en diversas poblaciones, cabe mencionar que en México, no se ha investigado la asociación de estos polimorfismos con la presión arterial alta.

El propósito de este estudio es evaluar si los polimorfismos T-786C, G894T y G10T en el gen *NOS3*, están asociados con la presencia de presión arterial alta en población guerrerense.

## **Materiales y métodos**

### Población

En este estudio observacional de casos y controles participaron 380 individuos originarios del Estado de Guerrero, entre 18 y 30 años de edad. Los 109 casos con PAS  $\geq 120$  y/o PAD  $\geq 80$  mmHg y los 271 controles, PAS  $< 120$  y/o PAD  $< 80$  mmHg. La presión arterial fue medida con un baumanómetro digital (OMRON, Kyoto, Japón) después de 5 min de reposo del individuo. El peso e IMC se determinaron en la Tanita BC-553 (Tanita Corporation, Arlington, IL, USA). Todos los participantes firmaron la carta de consentimiento informado.

### Obtención de muestras para determinaciones bioquímicas.

A los individuos participantes, se les extrajo 8 mL de sangre venosa en ayuno previo de 12 h. Las concentraciones séricas de colesterol total, glucosa y triglicéridos, se determinaron en el analizador semiautomático para química clínica Spinlab (Spinreact, Girona, España).

### Extracción de ADN

Se aisló el ADN genómico de leucocitos periféricos, a partir de la sangre del tubo con EDTA, mediante la técnica de Miller modificada (Sambrook & Russell, 2001). El ADN se cuantificó en NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Genotipificación de los polimorfismos T-786C, G10T, y G894T de *NOS3*.

La genotipificación se llevó a cabo mediante PCR-RFLPs, con las secuencias de los iniciadores y los programas de amplificación para cada uno de los SNPs (Tabla 1). Cada reacción de PCR consistió de 1x de buffer, 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 250  $\mu\text{M}$  de dNTPs, 0.2 mM de cada iniciador, 0.25 U de *Taq* DNA Polimerasa (Invitrogen, Waltham, MA, USA) y  $\sim 100$  ng de ADN genómico, en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$  en el termociclador Veriti 96-Well (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). La restricción de los fragmentos amplificados, se realizó a las temperaturas indicadas por el fabricante con 1.0 U de enzima (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)

(Tabla 1). Los fragmentos digeridos fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% y visualizados por tinción con nitrato de plata.

### Análisis estadístico

Para el análisis de resultados se usó el software Stata 11 (StataCorp, College Station, TX, USA). Los datos clínicos y bioquímicos, se muestran como medianas (percentil 25 y percentil 75). Las comparaciones entre grupos se analizaron con la prueba U de Mann-Withney y Kruskal-Wallis. Para analizar la asociación de las covariables con el incremento de la presión arterial, se utilizaron coeficientes beta, que representan estimaciones de cambio en el modelo de regresión. El cambio de una unidad en la variable independiente, representa el incremento o disminución según el coeficiente beta, de la variable dependiente. Para evaluar si las variaciones genéticas se asocian independientemente con la presión arterial alta, después del ajuste por covariables, incluyendo colesterol, glucosa, triglicéridos e IMC, se usó la regresión logística. Para calcular la probabilidad que la presión arterial alta se presente en los casos dado que tienen el genotipo de riesgo, se utilizó razón de momios (RM). Equilibrio de Hardy-Weinberg fue evaluado por la prueba de  $\chi^2$ . El desequilibrio de ligamiento (DL), la frecuencia de haplotipos, RM e IC 95%, se hicieron con el software SHEsis (versión en línea).

**Tabla 1.** Secuencia de los iniciadores, programa de amplificación, enzimas de restricción y temperaturas de restricción.

SNP	Condiciones de PCR		RFLPs		
	Secuencia de los iniciadores (5'-3')	Programa de amplificación	Enzima de restricción	Temperatura de restricción	Productos (tamaño del fragmento)
<b>T-786C</b> (rs2070744)	<b>S:</b> 5' ATGCTCCCACCAGGGCATCA 3' <b>A:</b> 5' GTCCTTGAGTCTGACATTAGGG 3' (Colombo <i>et al.</i> , 2003)	95°C /5 min; (95°C /30 s, 62°C /30 s, 72°C /30 s) x 30 ciclos; 72°C /3 min.	<i>NgoMIV</i>	37°C	<b>T:</b> 237 pb; <b>C:</b> 33, 204 pb
<b>G894T</b> (rs1799983)	<b>S:</b> 5' CATGAGGCTCAGCCCCAGAA 3' <b>A:</b> 5' AGTCAATCCCTTTGGTGCTCAC 3' (Li <i>et al.</i> , 2011)	95°C /5 min; (95°C /30 s, 55°C /30 s, 72°C /30 s) x 30 ciclos; 72°C /3 min.	<i>BfuCI</i>	37°C	<b>G:</b> 206 pb; <b>T:</b> 87, 119 pb
<b>G10T</b> (rs7830)	<b>S:</b> 5' AAAGGGGACCTGATGGAGTG 3' <b>A:</b> 5' CCTCAGGCAGTCCTTTAGTC 3' (Li <i>et al.</i> , 2011)	95°C /5 min; (95°C /30 s, 54°C /30 s, 72°C /30 s) x 30 ciclos; 72°C /3 min.	<i>Tsp45I</i>	65°C	<b>G:</b> 187 pb; <b>T:</b> 164, 23 pb

**S** = iniciador sentido; **A** = iniciador antisentido.

## Resultados

### Características de la población

En el estudio participaron 220 mujeres y 160 hombres del estado de Guerrero, de origen mestizo. La población estudiada se agrupó en 109 individuos casos y 271 controles. Al comparar ambos grupos, género, presión sistólica, diastólica, IMC, peso, glucosa, colesterol y triglicéridos, mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Características clínicas y bioquímicas de los grupos de estudio.

	Casos (n= 109)	Controles (n=271)	Valor de $p$
Género, n (%) <sup>++</sup>			
Femenino	28 (26)	192 (71)	<b>&lt;0.001**</b>
Masculino	81 (74)	79 (29)	
Edad, años <sup>+</sup>	21 (19- 22)	21 (19- 22)	0.478*
PAS, mmHg <sup>+</sup>	128 (124- 133)	105 (98- 110)	<b>&lt;0.001*</b>
PAD, mmHg <sup>+</sup>	79 (73- 85)	66 (61- 71)	<b>&lt;0.001*</b>
IMC, kg/m <sup>2</sup> <sup>+</sup>	27.8 (24.7- 32.3)	21.7 (20.2- 23.5)	<b>&lt;0.001*</b>
Peso, kg <sup>+</sup>	79.7 (64.9- 96.8)	55 (50.1- 60.9)	<b>&lt;0.001*</b>
Glucosa, mg/dL <sup>+</sup>	89 (82- 96)	83 (76- 89)	<b>&lt;0.001*</b>
Colesterol, mg/dL <sup>+</sup>	170 (145- 188)	157.5 (138- 183)	<b>0.011*</b>
Triglicéridos, mg/dL <sup>+</sup>	106 (73- 160)	81.5 (59- 109)	<b>&lt;0.001*</b>

PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica, IMC: índice de masa corporal. Datos en <sup>+</sup> medianas y rangos intercuartiles, y <sup>++</sup> frecuencias y porcentajes. \* Prueba de Mann-Whitney, \*\*prueba de  $\chi^2$ .

### Asociación de las covariables con el incremento de la presión arterial

En el análisis por coeficientes de regresión, se determinó que el género ( $\beta= 10.642$  mmHg,  $p < 0.01$ ) e IMC ( $\beta= 1.361$  mmHg,  $p < 0.01$ ), se asocian significativamente con el incremento de la presión arterial sistólica, mientras que el género ( $\beta= 2.281$  mmHg,  $p= 0.02$ ), el IMC ( $\beta= 0.633$  mmHg,  $p < 0.01$ ) y la glucosa ( $\beta= 0.082$  mmHg,  $p < 0.01$ ) incrementan significativamente la presión arterial diastólica (Tabla 3).

**Tabla 3.** Efecto de las covariables sobre la presión arterial sistólica y diastólica.

	Presión arterial sistólica			Presión arterial diastólica		
	Coeficiente $\beta$	IC (95%)		Coeficiente $\beta$	IC (95%)	
<b>Género</b>	10.642*	8.483	12.801	2.281*	0.390	4.172
<b>IMC</b>	1.361*	1.127	1.594	0.633*	0.429	0.838
<b>Glucosa</b>	0.040	-0.007	0.088	0.082*	0.040	0.124
<b>Colesterol</b>	0.007	-0.023	0.037	0.013	-0.013	0.039
<b>Triglicéridos</b>	0.001	-0.018	0.019	-0.006	-0.022	0.010

\*Valor significativo  $p < 0.05$

#### Distribución genotípica y alélica de los SNPs T-786C, G894T y G10T de *NOS3*

En el polimorfismo T-786C, se presentaron los genotipos T/T, T/C y C/C, y sus frecuencias fueron 83, 16, y 1%, respectivamente. Las frecuencias alélicas fueron 91 y 9%, para el alelo T y C, respectivamente. Al analizar las frecuencias genotípicas y alélicas entre grupos, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Para el polimorfismo G894T, se observaron los genotipos G/G y G/T con una frecuencia del 90 y 10%, respectivamente. Las frecuencias alélicas fueron 95 y 5%, para el alelo G y T, respectivamente. Al analizar las frecuencias genotípicas entre grupos, se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), y en las frecuencias alélicas el alelo T se asoció con la presión arterial alta (RM= 2.485, IC 95% 1.36- 4.51;  $p = 0.001$ ). Para el polimorfismo G10T, se observaron los genotipos G/G, G/T y T/T, y sus frecuencias fueron 9, 43, y 48%, respectivamente. Las frecuencias alélicas fueron 30 y 70%, para el alelo G y T, respectivamente. Al analizar las frecuencias genotípicas y alélicas entre grupos, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Tabla 4.

Los tres SNPs del gen *NOS3* están en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0.05$ ).



**Tabla 4.** Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas los polimorfismos T-786C, G894T y G10T del gen NOS3 en la población guerrerense.

	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor de <i>p</i>	RM (IC 95%)
<b>SNP T-786C</b>	( <i>n</i> = 109)	( <i>n</i> = 270)		
<i>Genotipos</i>				
T/T	91 (83)	224 (83)	1.000**	
T/C	17 (16)	43 (16)		
C/C	1 (1)	3 (1)		
<i>Alelos</i>				
T	188 (91)	491 (91)	0.885*	
C	18 (9)	49 (9)		
<b>SNP G894T</b>	( <i>n</i> = 109)	( <i>n</i> = 271)		
<i>Genotipos</i>				
G/G	83 (76)	243 (90)	<0.001*	2.718 (1.437- 5.102)
G/T	26 (24)	28 (10)		
T/T	0 (0)	0 (0)		
<i>Alelos</i>				
G	192 (88)	514 (95)	0.001*	2.485 (1.360- 4.514)
T	26 (12)	28 (5)		
<b>SNP G10T</b>	( <i>n</i> = 109)	( <i>n</i> = 271)		
<i>Genotipos</i>				
G/G	16 (15)	24 (9)	0.091*	
G/T	36 (33)	117 (43)		
T/T	57 (52)	130 (48)		
<i>Alelos</i>				
G	68 (31)	165 (30)	0.839*	
T	150 (69)	377 (70)		

Abreviaturas: RM, razón de momios; IC, intervalo de confianza. \*Utilizada la prueba de  $\chi^2$ , \*\*exacta de Fisher

## Características clínicas y bioquímicas de la población guerrerense agrupadas por genotipos

Al analizar la relación de los genotipos del polimorfismo T-786C con las características clínicas y bioquímicas, no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) (Tabla 5).

**Tabla 5.** Comparación de las características clínicas y bioquímicas en la población guerrerense, agrupadas por genotipos del polimorfismo T-786C.

	T/T (n= 315)	T/C (n= 60)	C/C (n= 4)	Valor de p
Género, n (%) <sup>++</sup>				
Femenino	185 (59)	33 (55)	2 (50)	0.773 <sup>**</sup>
Masculino	130 (41)	27 (45)	2 (50)	
Edad, años <sup>+</sup>	21 (19- 22)	21 (19- 23)	20 (18.5- 23)	0.903 <sup>*</sup>
PAS, mmHg <sup>+</sup>	108 (101- 122)	108.5 (100.5- 124)	113 (104.5- 124)	0.863 <sup>*</sup>
PAD, mmHg <sup>+</sup>	70 (63- 76)	69 (63- 76)	66 (62- 71)	0.709 <sup>*</sup>
IMC, kg/m <sup>2</sup> <sup>+</sup>	22.5 (20.6- 24.5)	23.5 (20.8- 25.6)	21.9 (18.9- 27.1)	0.310 <sup>*</sup>
Peso, kg <sup>+</sup>	57.5 (51.1- 67.8)	59.4 (51.6- 72)	66 (54.1- 74.8)	0.458 <sup>*</sup>
Glucosa, mg/dL <sup>+</sup>	85 (78- 91)	83 (76- 90.5)	90 (89.5- 92)	0.142 <sup>*</sup>
Colesterol, mg/dL <sup>+</sup>	159 (141- 184)	162.5 (139.5- 184.5)	173.5 (164.5- 183)	0.563 <sup>*</sup>
Triglicéridos, mg/dL <sup>+</sup>	86 (65- 122)	80.5 (61- 136.5)	88.5 (72.5- 139)	0.607 <sup>*</sup>

PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica, IMC: índice de masa corporal. Datos en <sup>+</sup> medianas y rangos intercuartiles, y <sup>++</sup> frecuencias y porcentajes. <sup>\*</sup> Prueba de Kruskal- Wallis, <sup>\*\*</sup> prueba exacta de Fisher.

Al analizar la relación de los genotipos del SNP G894T con las características clínicas y bioquímicas, la presión sistólica, el IMC, peso y glucosa, mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) (Tabla 6).

**Tabla 6.** Comparación de las características clínicas y bioquímicas en la población guerrerense, agrupadas por genotipos del polimorfismo G894T.

	G/G (n= 326)	G/T (n= 54)	Valor de p
Género, n (%) <sup>++</sup>			
Femenino	190 (58)	30 (56)	0.707**
Masculino	136 (42)	24 (44)	
Edad, años <sup>+</sup>	21 (19- 22)	21 (20- 23)	0.178*
PAS, mmHg <sup>+</sup>	108 (101- 121)	116 (103- 129)	<b>0.022*</b>
PAD, mmHg <sup>+</sup>	69 (62- 75)	73 (66- 80)	0.050*
IMC, kg/m <sup>2</sup> <sup>+</sup>	22.4 (20.6- 24.2)	24.4 (22- 29.7)	<b>&lt;0.001*</b>
Peso, kg <sup>+</sup>	57.3 (51.2- 66.3)	65.8 (53.3- 84.5)	<b>0.002*</b>
Glucosa, mg/dL <sup>+</sup>	84 (77- 91)	87.5 (81- 95)	<b>0.021*</b>
Colesterol, mg/dL <sup>+</sup>	159 (141- 182)	166 (142- 196)	0.122*
Triglicéridos, mg/dL <sup>+</sup>	85 (63- 121)	88 (66- 144)	0.393*

PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica, IMC: índice de masa corporal. Datos en <sup>+</sup> medianas y rangos intercuartiles, y <sup>++</sup> frecuencias y porcentajes. \* Prueba de Mann-Whitney, \*\* prueba de  $\chi^2$ .

Al analizar la relación de los genotipos del SNP G10T con las características clínicas y bioquímicas, el IMC mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) (Tabla 7).

**Tabla 7.** Comparación de las características clínicas y bioquímicas en la población guerrerense, agrupadas por genotipos del polimorfismo G10T.

	G/G (n= 40)	G/T (n= 153)	T/T (n= 187)	Valor de p
Género, n (%) <sup>++</sup>				
Femenino	20 (50)	90 (59)	110 (59)	0.565**
Masculino	20 (50)	63 (41)	77 (41)	
Edad, años <sup>+</sup>	21 (19- 22.5)	21 (19- 23)	21 (19- 22)	0.666*
PAS, mmHg <sup>+</sup>	112.5 (103- 126)	107 (100- 119)	109 (102- 123)	0.131*
PAD, mmHg <sup>+</sup>	69.5 (61.5- 79.5)	67 (61- 74)	71 (64- 76)	0.052*
IMC, kg/m <sup>2</sup> <sup>+</sup>	23.95 (22.1- 28.5)	22 (20.6- 24.4)	22.6 (20.6- 24.5)	<b>0.014*</b>
Peso, kg <sup>+</sup>	66.4 (53.7- 80)	57.5 (50.8- 66.5)	57.4 (51.3- 67)	0.058*
Glucosa, mg/dL <sup>+</sup>	85 (78- 92)	85 (78- 92)	84 (77- 91)	0.840*
Colesterol, mg/dL <sup>+</sup>	162.5 (141- 188.5)	159 (140- 186)	160 (141- 181)	0.854*
Triglicéridos, mg/dL <sup>+</sup>	88.5 (66.5- 126)	84 (61- 123)	87 (66- 124)	0.358*

PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica, IMC: índice de masa corporal. Datos en + medianas y rangos intercuartiles, y ++ frecuencias y porcentajes. \* Prueba de Kruskal- Wallis, \*\* prueba de  $\chi^2$ .

En el ajuste por covariables en un modelo logístico, para los polimorfismos T-786C, G894T y G10T de *NOS3*, no se observaron asociaciones significativas ( $p > 0.05$ ) con la presión arterial alta (datos no mostrados).

### Haplotipos

A partir de los polimorfismos T-786C, G894T y G10T del gen *NOS3*, se infirieron 8 haplotipos, de los cuales sólo 3 presentaron una frecuencia mayor al 5%. Al analizarlos, el haplotipo TGT fue el más frecuente (64%), mientras el haplotipo CTT, fue el menos frecuente con un 0.01%. El haplotipo TTG, mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ), con una RM= 2.380 (IC 95% 1.136- 4.986). (Tabla 8).

**Tabla 8.** Frecuencias de haplotipos inferidos en la población guerrerense

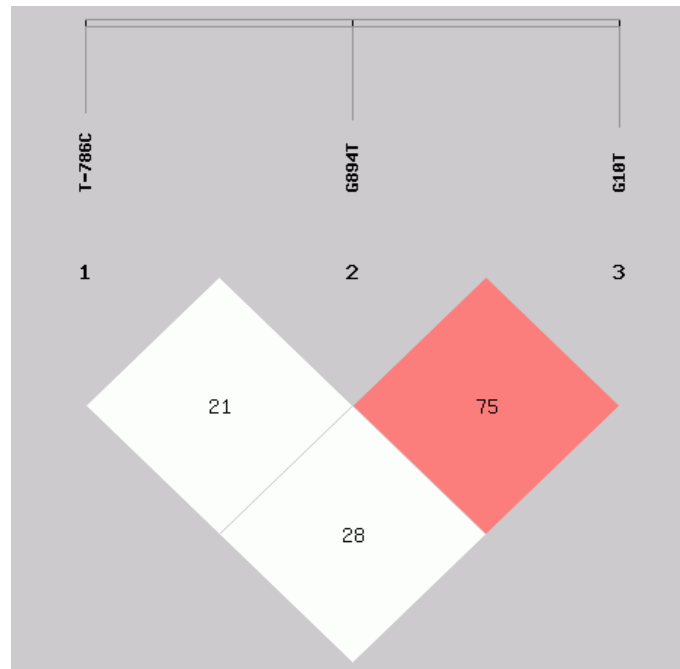
Polimorfismos			Caso	Control	Valor	RM	(IC 95%)
T-786C	G894T	G10T	(n= 148) n (%)	(n= 358) n (%)	de p		
T	G	T	141 (65)	343 (64)	0.822*	1.043	(0.723- 1.505)
T	G	G	42 (19)	126 (23)	0.175*	0.760	(0.510- 1.131)
T	T	G	14 (7)	15 (3)	<b>0.018*</b>	<b>2.380</b>	(1.136- 4.986)
C	T	G	9 (4)	5 (1)	ND	ND	
C	G	T	7 (3)	26 (5)	ND	ND	
C	G	G	3 (1)	17 (3)	ND	ND	
T	T	T	2 (1)	6 (1)	ND	ND	
C	T	T	0 (0)	1(0)	ND	ND	

El orden de los alelos en los haplotipos inferidos es T-786C, G894T y G10T a fin de corresponder con las localizaciones físicas en el gen *NOS3*. Abreviaturas: H, haplotipo; RM, razón de momios; IC, intervalo de confianza; ND, no determinada. \*Utilizada la prueba exacta de Fisher.

### Desequilibrio de ligamiento

Se midió el desequilibrio de ligamiento (DL) entre los tres polimorfismos en el gen *NOS3*, fue medido por el coeficiente de desequilibrio de ligamiento estandarizado de Lewontin ( $D'$ ), en toda la población de estudio. Las comparaciones entre los polimorfismos G894T y G10T, mostraron un alto DL ( $D' = 0.75$ ) (Figura 1).

**Figura 1.** Desequilibrio de ligamiento de los SNPs: T-786C, G894T y G10T, en el gen NOS3.



\* Un par de locus que muestran un moderado LD tienen una  $D'$  entre 0.33 y 0.5, y un alto LD si  $D' > 0.5$ \* ( $D'$  en la figura está multiplicado por 100).

## Discusión

Este estudio, fue diseñado para investigar la posible asociación de los polimorfismos T-786C, G894T y G10T del gen *NOS3* con presión arterial alta. Además, ya que el incremento de la presión arterial es de naturaleza multifactorial, se investigó si las características clínicas y bioquímicas como género, IMC, glucosa, colesterol y triglicéridos, pudieran estar influyendo la asociación de los polimorfismos con el incremento de la presión arterial en población guerrerense.

La presión arterial alta es una condición común que afecta a un gran porcentaje de la población masculina. En este estudio el 74% de los casos son hombres, a comparación del 26% de las mujeres. Se ha sugerido que los andrógenos incrementan la presión arterial en hombres; Reckelhoff *et al.* (1999), en un estudio en ratas macho hipertensas, reportó que los andrógenos contribuyen a la elevación de la presión arterial, ya que durante el bloqueo del receptor de andrógeno, se disminuía la presión arterial; como mecanismo, se sugiere que los andrógenos elevan la presión arterial al estimular la actividad de la Renina y la formación de Angiotensina II, favoreciendo la vasoconstricción renal y la reabsorción de sodio (Pechere-Bertschi & Burnier, 2004), por otro lado, en las mujeres los estrógenos juegan un papel importante como protector del sistema vascular, principalmente incrementando la tasa transcripcional de *NOS3*, posiblemente implica la unión de Sp1 en el centro del promotor de *NOS3*, mediada por receptores de estrógenos (Chambliss & Shaul, 2002).

De acuerdo al IMC, el 71% de los individuos del estudio con presión arterial alta tienen sobrepeso u obesidad. El incremento de la presión arterial en estos individuos, podría deberse, a que durante la obesidad, el tejido adiposo secreta adipocinas tales como la leptina, que desencadena la activación del sistema nervioso simpático, para contribuir en la reabsorción de sodio mediante el sistema renina- angiotensina aldosterona (McGill *et al.*, 2009). Otra adipocina, secretada en individuos obesos es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que activa a las MAP cinasas, éstas posteriormente fosforilan residuos de serina en el sustrato 1 del receptor de insulina, disminuyendo su actividad y provocando la resistencia a la

insulina, y posteriormente hiperglicemia (Sánchez-Muñoz *et al.*, 2005). Por otro lado, TNF- $\alpha$ , a través de la cinasa asociada a Rho, fosforila a la proteína ribosomal eEF1A1, que al unirse a la región 3'-UTR del ARN mensajero de eNOS, modula la desestabilización de este último (Yan *et al.*, 2008).

En este estudio, en los individuos con presión arterial alta, la concentración sérica de los triglicéridos mostró una mediana significativamente más elevada, que en los individuos con presión arterial normal, este resultado es consistente con otros estudios (Lee *et al.*, 2009; Ferguson *et al.*, 2008). El colesterol total, muestra un incremento significativo en los individuos con presión arterial alta, aunque manteniéndose dentro de los valores normales (<200 mg/dL, según la OMS), como lo reportado por Saidu *et al.* (2014) en pacientes Nigerianos. Los mecanismos fisiopatológicos que relacionan los niveles de lípidos con la presión arterial alta, son a) que las dislipidemias pueden alterar la función endotelial, lo que consecutivamente disminuye la producción de óxido nítrico, b) las dislipidemias, reducen la sensibilidad del barorreflejo, perdiendo eficiencia para contrarrestar el incremento de la presión arterial y c) las dislipidemias disminuyen la elasticidad de las arterias, reduciendo el efecto Windkessel y por tanto, elevándose la presión arterial (Otsuka *et al.*, 2016).

En estudios que utilizaron un modelo *ex vivo*, mediante el ensayo de relajación en aorta aislada de conejo, las arterias fueron expuestas a concentraciones elevadas de glucosa y presentaron disfunción endotelial (Cosentino & Luscher, 2001); la hiperglicemia parece ser la alteración metabólica más asociada con daño irreversible al endotelio, por diferentes mecanismos, a) incremento en la concentración de glucosa intracelular, afecta la membrana endotelial, b) un aumento en el proceso de glicosilación no enzimática y c) la inactivación del óxido nítrico causada por el incremento de estrés oxidativo (Triana-Mantilla, 2001). En este estudio, los niveles de glucosa son significativamente superiores en los casos, sin embargo las medianas de ambos grupos se sitúan dentro de valores normales (<100 mg/dL, según la OMS), consistente con lo reportado por Saidu *et al.* (2014) en pacientes nigerianos.

En los resultados de este estudio en la población guerrerense, el polimorfismo T-786C de *NOS3*, no se asocia con presión arterial alta, consistente con los reportados por Li *et al.* (2011), quienes no encontraron asociación con la hipertensión ( $p < 0.05$ ). Por otro lado se ha encontrado asociado en hipertensos chinos (Li *et al.*, 2012) y japoneses (Miyamoto *et al.*, 1998). También se ha reportado que en presencia del alelo C del polimorfismo T-786C del gen *NOS3*, hay menor actividad transcripcional y como consecuencia, menor producción de óxido nítrico (Dominiczak & Bohr, 1995; Nakayama *et al.*, 1999; Erbs *et al.*, 2003). Según Ma *et al.* (2006) sugieren que el SNP T-786C no contribuye a la hipertensión por sí solo, sino que puede estar asociado con hipertensión cuando está combinado con otros alelos (polimórficos).

En estudios experimentales en células endoteliales y de corazón en humanos, la presencia del alelo T, del polimorfismo G894T, se traduce en Asp en la proteína eNOS, se sugiere está sujeta a escisión proteolítica (Tesauro *et al.*, 2000). Naber *et al.* (2001) reportaron la asociación del alelo T con el incremento de la resistencia microvascular, lo cual puede provocar el aumento de la presión arterial. En este estudio, los genotipos para el polimorfismo G894T encontrados fueron G/G y G/T (90 y 10%, respectivamente), y similar a esto, se ha reportado la ausencia del genotipo T/T en poblaciones coreanas (Kim *et al.*, 2003) y japonesas (Hibi *et al.*, 1998). El genotipo G/T, se asoció con presión arterial alta en población guerrerense en el análisis en crudo y Srivastava *et al.* (2008) lo asociaron en hipertensos indios (RM= 2.10, IC 95% 1.34–3.28). La frecuencia para el alelo T, es del 12% en los individuos con presión arterial alta. Las frecuencias alélicas de este polimorfismo varían entre poblaciones, en caucásicos Colomba *et al.* (2008) encontraron el alelo T en el 37% de los hipertensos, mientras en asiáticos Men *et al.* (2011), lo reportó con un 8.7%. El genotipo G/T, ha sido asociado con el incremento de IMC y glucosa, similar a lo reportado por Podolsky *et al.* (2007), quienes asociaron un IMC mayor en los individuos que presentaban este genotipo, la evidencia sugiere que la producción de NO inhibe la lipólisis en el tejido adiposo (Elizalde *et al.*, 2000). Con respecto a la glucosa, este genotipo se ha asociado con mayor riesgo a desarrollar



diabetes mellitus tipo 2, relacionándolo a la hiperinsulinemia y una posterior resistencia a la insulina (Monti *et al.*, 2003).

Para el polimorfismo G10T, la hipótesis de Derebecka *et al.* (2002), sugiere que la presencia del alelo T puede conducir un corte y empalme aberrante del transcrito primario del gen *NOS3*, basado en el hecho que el polimorfismo produce un dinucleótido idéntico al sitio original donador 5'. Sin embargo, esto no ha sido confirmado por análisis de isoformas de la eNOS. La frecuencia del alelo T, en este estudio, es del 69% en los individuos con presión arterial alta. Mientras en hipertensos caucásicos, Derebecka *et al.* (2002) encontró en el 39.0% el alelo T y consistente con este estudio, no encontró asociación.

En la epidemiología, se utilizan métodos estadísticos, que producen estimaciones ajustadas o corregidas del efecto de exposición con el fin de tener estimaciones que teóricamente, ya no están sesgadas por otras variables (McNamee, 2005). Por ello, a pesar de la asociación del polimorfismo G894T de *NOS3* con presión arterial alta en el análisis en crudo, una vez, que los 3 SNPs (T-786C, G894T y G10T de *NOS3*) fueron analizados en un modelo de regresión logística ajustada por IMC, los polimorfismos no se asocian con presión arterial alta en población guerrerense, confirmando el efecto confusor que estaban causando las covariables.

El análisis por haplotipos es importante en los estudios de asociación, ya que a diferencia de la evaluación individual de cada polimorfismo, la interacción de múltiples marcadores genéticos en un haplotipo puede ser clave para determinar la susceptibilidad a enfermedades (Crawford & Nickerson, 2005; Jacob-Ferreira & Sandrim, 2007). En este estudio, se observaron ocho combinaciones de alelos (los haplotipos conformados por los SNPs de *NOS3*, T-786C en la posición 1, G894T en la posición 2 y G10T en la posición 3), donde los más frecuentes son TGT, TGG y TTG con una frecuencia del 64, 23 y 3%, respectivamente. En el haplotipo TTG, se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con una RM=2.3 (IC 95% 1.13 - 4.9). Sugiriendo que la presencia del alelo de riesgo (T) del polimorfismo G894T, ubicado en la segunda posición del haplotipo TTG, confiere susceptibilidad a desarrollar presión arterial alta en los individuos guerrerenses. Después de haber

hecho una búsqueda de publicaciones con las cuales se pudiesen comparar los haplotipos, solo se encontró el estudio de Li *et al.* (2011) en población china, en el cual se reportan a los haplotipos TGG, TGT y TTG, con una frecuencia de 51%, 25% y 15%, respectivamente. Además, Li *et al.* (2011) reportaron al haplotipo TTG con tendencia a asociarse con hipertensión ( $p= 0.06$ ). La variación en los resultados de ambos estudios, pueden ser debidos a las diferencias en el origen étnico de las poblaciones, mientras Li *et al.* (2011) analizaron una población asiática (chinos), en este estudio se tamizaron pobladores guerrerenses de origen mestizo, en los que el componente europeo está presente en el 28.5%, amerindio en 66%, africano en 4.1% y asiático en 1.4% (Silva-Zolezzi *et al.*, 2009).

De acuerdo al coeficiente de desequilibrio de ligamiento estandarizado de Lewontin ( $D'$ ), se mostró alto desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos G894T y G10T, indicando que en este “bloque” existe un escaso entrelazamiento físico entre los cromosomas homólogos durante la meiosis I (Nussbaum, 2008), y ya que tienen una mayor probabilidad de heredarse en conjunto, pueden ser útiles como marcadores moleculares.

## Conclusiones

Los polimorfismos T-786C, G894T y G10T de *NOS3* no se asocian con la presión arterial alta en población guerrerense.

El género e IMC, se asocian con el incremento de la presión arterial sistólica en población guerrerense.

El género, IMC y glucosa, se asocian con el incremento de la presión arterial diastólica en población del Estado de Guerrero.

El haplotipo TTG de los polimorfismos T-786C, G894T y G10T de *NOS3* se asocia con la presión arterial alta en población guerrerense.

## REFERENCIAS

- Abel, E. D. & Wilkins, M. R. (2004). *Cardiovascular Pharmacogenetics*, Springer.
- Casas, J. P., Cavalleri, G. L., Bautista, L. E., Smeeth, L., Humphries, S. E. & Hingorani, A. D. (2006). Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: a HuGE review. *American Journal of Epidemiology*, 164, 921-35.
- Colomba, D., Duro, G., Corrao, S., Argano, C., Di Chiara, T., Nuzzo, D., *et al.* (2008). Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular damage in hypertensive subjects: an Italian case-control study. *Immunity & ageing : I & A*, 5, 4-4.
- Cosentino, F. & Luscher, T. F. (2001). Effects of blood pressure and glucose on endothelial function. *Current Hypertension Reports*, 3, 79-88.
- Crawford, D. C. & Nickerson, D. A. (2005). Definition and clinical importance of haplotypes. *Annual Review of Medicine*, 56, 303-20.
- Chambliss, K. L. & Shaul, P. W. (2002). Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocrine Reviews*, 23, 665-86.
- Chobanian, A. V., Bakris, G. L., Black, H. R., Cushman, W. C., Green, L. A., Izzo, J. L., Jr., *et al.* (2003). Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*, 42, 1206-52.
- Derebecka, N., Holysz, M., Dankowski, R., Wierzchowicki, M. & Trzeciak, W. H. (2002). Polymorphism in intron 23 of the endothelial nitric oxide synthase gene (NOS3) is not associated with hypertension. *Acta Biochimica Polonica*, 49, 263-8.
- Dominiczak, A. F. & Bohr, D. F. (1995). Nitric oxide and its putative role in hypertension. *Hypertension*, 25, 1202-11.
- Elizalde, M., Ryden, M., van Harmelen, V., Eneroth, P., Gyllenhammar, H., Holm, C., *et al.* (2000). Expression of nitric oxide synthases in subcutaneous adipose tissue of nonobese and obese humans. *Journal of Lipid Research*, 41, 1244-51.
- Erbs, S., Baither, Y., Linke, A., Adams, V., Shu, Y., Lenk, K., *et al.* (2003). Promoter but not exon 7 polymorphism of endothelial nitric oxide synthase affects training-induced correction of endothelial dysfunction. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 23, 1814-9.
- Ferguson, T. S., Younger, N. O., Tulloch-Reid, M. K., Wright, M. B., Ward, E. M., Ashley, D. E., *et al.* (2008). Prevalence of prehypertension and its relationship to risk factors for cardiovascular disease in Jamaica: analysis from a cross-sectional survey. *BMC Cardiovascular Disorders*, 8, 20.
- Guzmán-Guzmán, I. P., Salgado-Goytia, L., Munoz-Valle, J. F., Salgado-Bernabe, A. B., Quiroz-Vargas, I. & Parra-Rojas, I. (2013). Prehypertension in a Mexican population: influence of age, gender, and body fat. *Clinical & Experimental Hypertension*, 35, 67-73.
- Hibi, K., Ishigami, T., Tamura, K., Mizushima, S., Nyui, N., Fujita, T., *et al.* (1998). Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension*, 32, 521-6.
- INSP (2013). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados por entidad federativa, Guerrero.*, Instituto Nacional de Salud Pública.
- Jacob-Ferreira, A. L. B. & Sandrim, V. C. (2007). Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and hypertension: Improved clinical evidence derived from haplotype analysis. *International Journal of Cardiology*, 116, 116.
- Kim, J. U., Chang, H. K., Lee, S. S., Kim, J. W., Kim, K. T., Lee, S. W., *et al.* (2003). Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behcet's disease and rheumatic diseases with vasculitis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 62, 1083-7.

- Kubes, P., Suzuki, M. & Granger, D. N. (1991). Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 4651-5.
- Lee, J., Heng, D., Ma, S., Chew, S. K., Hughes, K. & Tai, E. S. (2009). Influence of pre-hypertension on all-cause and cardiovascular mortality: the Singapore Cardiovascular Cohort Study. *International Journal of Cardiology*, 135, 331-7.
- Li, J., Cun, Y., Tang, W. R., Wang, Y., Li, S. N., Ouyang, H. R., *et al.* (2011). Association of eNOS gene polymorphisms with essential hypertension in the Han population in southwestern China. *Genetics and Molecular Research*, 10, 2202-12.
- Li, K., Liang, Y., Sun, Y., Zhang, L. X., Yi, X., Chen, Y., *et al.* (2012). The relationship between polymorphisms at 17 gene sites and hypertension among the Aboriginal Tibetan people. *Biomedical and Environmental Sciences*, 25, 526-32.
- Ma, H. X., Xie, Z. X., Niu, Y. H., Li, Z. Y. & Zhou, P. (2006). Single nucleotide polymorphisms in NOS3 A-922G, T-786C and G894T: a correlation study of the distribution of their allelic combinations with hypertension in chinese Han population. *Yi Chuan*, 28, 3-10.
- Marsden, P. A., Heng, H. H., Scherer, S. W., Stewart, R. J., Hall, A. V., Shi, X. M., *et al.* (1993). Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 17478-88.
- McGill, J. B., Haffner, S., Rees, T. J., Sowers, J. R., Tershakovec, A. M. & Weber, M. (2009). Progress and controversies: treating obesity and insulin resistance in the context of hypertension. *Journal of Clinical Hypertension*, 11, 36-41.
- McNamee, R. (2005). Regression modelling and other methods to control confounding. *Occupational and Environmental Medicine*, 62, 500-6, 472.
- Men, C., Tang, K., Lin, G., Li, J. & Zhan, Y. (2011). ENOS-G894T polymorphism is a risk factor for essential hypertension in China. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 48, 154-7.
- Miyamoto, Y., Saito, Y., Kajiyama, N., Yoshimura, M., Shimasaki, Y., Nakayama, M., *et al.* (1998). Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension*, 32, 3-8.
- Miyamoto, Y., Saito, Y., Nakayama, M., Shimasaki, Y., Yoshimura, T., Yoshimura, M., *et al.* (2000). Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T-->C mutation associated with coronary spastic angina. *Human Molecular Genetics*, 9, 2629-37.
- Monti, L. D., Barlassina, C., Citterio, L., Galluccio, E., Berzuini, C., Setola, E., *et al.* (2003). Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms are associated with type 2 diabetes and the insulin resistance syndrome. *Diabetes*, 52, 1270-5.
- Naber, C. K., Baumgart, D., Altmann, C., Siffert, W., Erbel, R. & Heusch, G. (2001). eNOS 894T allele and coronary blood flow at rest and during adenosine-induced hyperemia. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 281, H1908-12.
- Nakayama, M., Yasue, H., Yoshimura, M., Shimasaki, Y., Kugiyama, K., Ogawa, H., *et al.* (1999). T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation*, 99, 2864-70.
- NCBI 2016. dbSNP. National Center for Biotechnology Information.
- Nussbaum, R. L. (2008). *Thompson & Thompson, 7a ed. : genética en medicina*, Elsevier Masson.
- Otsuka, T., Takada, H., Nishiyama, Y., Kodani, E., Saiki, Y., Kato, K., *et al.* (2016). Dyslipidemia and the Risk of Developing Hypertension in a Working-Age Male Population. *Journal of the American Heart Association*, 4, e003053.
- Pechere-Bertschi, A. & Burnier, M. (2004). Female sex hormones, salt, and blood pressure regulation. *American Journal of Hypertension*, 17, 994-1001.

- Pickering, T. G., Hall, J. E., Appel, L. J., Falkner, B. E., Graves, J., Hill, M. N., *et al.* (2005). Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals: part 1: blood pressure measurement in humans: a statement for professionals from the Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association Council on High Blood Pressure Research. *Circulation*, 111, 697-716.
- Podolsky, R. H., Barbeau, P., Kang, H. S., Zhu, H., Treiber, F. A. & Snieder, H. (2007). Candidate genes and growth curves for adiposity in African- and European-American youth. *International Journal of Obesity*, 31, 1491-9.
- Reckelhoff, J. F., Zhang, H., Srivastava, K. & Granger, J. P. (1999). Gender differences in hypertension in spontaneously hypertensive rats: role of androgens and androgen receptor. *Hypertension*, 34, 920-3.
- Saidu, H., Karaye, K. M. & Okeahialam, B. N. (2014). Plasma lipid profile in Nigerians with high-normal blood pressure. *BMC Research Notes*, 7, 930.
- Sánchez-Muñoz, F., García-Macedo, R., Alarcón-Aguilar, F. & Cruz, M. (2005). Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune. *Gaceta médica de México*, 141, 505-512.
- Silva-Zolezzi, I., Hidalgo-Miranda, A., Estrada-Gil, J., Fernandez-Lopez, J. C., Uribe-Figueroa, L., Contreras, A., *et al.* (2009). Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 8611-6.
- Srivastava, K., Narang, R., Sreenivas, V., Das, S. & Das, N. (2008). Association of eNOS Glu298Asp gene polymorphism with essential hypertension in Asian Indians. *Clinica Chimica Acta*, 387, 80-83.
- Tesauro, M., Thompson, W. C., Rogliani, P., Qi, L., Chaudhary, P. P. & Moss, J. (2000). Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 2832-5.
- Triana-Mantilla, M. E. (2001). La hiperglicemia y sus efectos tóxicos. Un concepto patogénico para la micro y macroangiopatía diabética. *Revista Cubana de Angiología y Cirugía Vasculat*, 2.
- Vasan, R. S., Larson, M. G., Leip, E. P., Kannel, W. B. & Levy, D. (2001). Assessment of frequency of progression to hypertension in non-hypertensive participants in the Framingham Heart Study: a cohort study. *Lancet*, 358, 1682-6.
- Williams, J. S., Brown, S. M. & Conlin, P. R. (2009). Blood-Pressure Measurement. *New England Journal of Medicine*, 360, e6.
- Williams, S. B., Cusco, J. A., Roddy, M. A., Johnstone, M. T. & Creager, M. A. (1996). Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of the American College of Cardiology*, 27, 567-74.
- Yan, G., You, B., Chen, S. P., Liao, J. K. & Sun, J. (2008). Tumor necrosis factor-alpha downregulates endothelial nitric oxide synthase mRNA stability via translation elongation factor 1-alpha 1. *Circulation Research*, 103, 591-7.