

**ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO INSERCIÓN-DELECIÓN (I/D) DEL GEN DE LA
ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA (ECA) CON LA ACTIVIDAD DE ESTA
ENZIMA EN SUERO DE MUJERES GESTANTES DE LA CIUDAD DE ARMENIA,
QUINDÍO.**

JOHANNY AGUILLÓN OSMA

**UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO
FACULTAD DE EDUCACIÓN
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA Y EDUCACIÓN AMBIENTAL
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES Y
METABÓLICAS (GECAVYME)
ARMENIA – QUINDIO
2005**

**ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO INSERCIÓN-DELECIÓN (I/D) DEL GEN DE LA
ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA (ECA) CON LA ACTIVIDAD DE ESTA
ENZIMA EN SUERO DE MUJERES GESTANTES DE LA CIUDAD DE ARMENIA,
QUINDÍO.**

JOHANNY AGUILLÓN OSMA

**Trabajo de Grado presentado como requisito para optar el título de Licenciado en
Biología y Educación Ambiental**

DIRECTORA

NELSY LOANGO CHAMORRO Lic. MSc.

ASESORA

PATRICIA LANDAZURI MSc. PhD.

UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO

FACULTAD DE EDUCACIÓN

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA Y EDUCACIÓN AMBIENTAL

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES Y

METABÓLICAS (GECAVYME)

ARMENIA – QUINDIO

2005

Nota de aceptación:

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Armenia, 2005

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme vivir y por ser la fuente de fortaleza para cada situación adversa que se presenta en mi vida.

A mi familia, especialmente a mi madre Maria Inés Osma G, por todo el amor y la confianza que ha depositado en mí.

A mis abuelos maternos, quienes dedicaron gran parte de su vida en mi crianza y educación, brindándome siempre motivos para seguir adelante.

A mi directora, magíster Nelsy Loango Chamorro, por toda el apoyo, paciencia y dedicación que tuvo conmigo, por haberme guiado por todo este proceso y por que mas que mi directora es una gran amiga.

A la directora del grupo de investigación, Doctora Patricia Landazuri, por el apoyo y respaldo que me brindó durante todo el proyecto.

A la especialista, Ana Maria López, quien me brindó su conocimiento y me orientó en el desarrollo del proyecto.

A la bacterióloga del grupo, Juanita Trejos, por su inmensa colaboración con el desarrollo de este proyecto.

A todo el grupo de investigación GECAVYME, especialmente a la Dra. Maria Teresa Montoya; a mis compañeros Ramiro Vargas, Hernán Valencia y Daisy Lozano; quienes me colaboraron para que este proyecto se lleve a cabo.

A la familia, Vargas Alzate y al señor José Omar Chica por todo su apoyo y colaboración durante toda la carrera.

A los docentes y demás personas que de una u otra forma aportaron para la realización de este proyecto.

DEDICATORIA

Este trabajo de grado es dedicado a la memoria de mi abuelo Arturo Osma, quien ha sido la persona que me brindó un respaldo incondicional durante toda su vida, me enseñó lo que un libro o la academia no le puede enseñar a una persona, a encontrar el verdadero sentido a la vida en las cosas simples que cada día nos nutren de esperanzas.

Y a mi madre, a quien adeudo gran parte de lo que soy y que sin su apoyo y confianza no hubiese sido posible alcanzar esta meta.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
1. RESUMEN	
2. INTRODUCCIÓN	2
3. OBJETIVOS	5
3.1. Objetivo general	5
3.2. Objetivos específicos	5
4. ESTADO DEL ARTE	6
5. MARCO TEÓRICO	10
5.1. Sistema renina angiotensina	10
5.2. Enzima convertidora de angiotensina (ECA)	13
5.3. Acciones de la angiotensina II	17
5.4. Polimorfismo I/D del gen de la ECA	18
5.5. Hipertensión y preeclampsia	20
5.5.1. Hipertensión esencial	20
5.5.2. Hipertensión durante el embarazo	20
5.5.3. Preeclampsia	21
6. METODOLOGÍA	24
6.1. Población de referencia	24
6.1.1. Población de estudio	24
6.2. Criterios para la selección de los sujetos de estudio	24
6.2.1 Criterios de inclusión	25
6.2.2. Criterios de exclusión	25
6.3. Fase de consulta	26
6.4. Toma de la muestra	26
6.5. Fase de laboratorio	27

	Pag.
6.6. Definición de las Variables	27
6.6.1. Presión sanguínea	27
6.6.2. Diagnóstico de Preeclampsia	28
6.7. Actividad de la ECA en suero	28
6.8. Determinación del polimorfismo I/D	29
6.8.1. Extracción ADN.	28
6.8.2. Reacción en cadena de la Polimerasa. (PCR)	29
6.8.3. Electroforesis.	29
6.9. Análisis de resultados	30
7. RESULTADOS	31
7.1. Actividad de la enzima convertidora de angiotensina	32
7.1.1. La edad con relación a la presión arterial y los niveles de enzima convertidora de angiotensina	32
7.1.2. El tiempo de gestación con relación a la actividad de la ECA y a la presión arterial	33
7.1.3. La actividad de la ECA y presión arterial.	34
7.1.3.1. Presión arterial sistólica	34
7.1.3.2. Presión arterial diastólica	35
7.1.4. Actividad de la ECA y preeclampsia	36
7.2. Polimorfismo inserción/delección (I/D) del gen de la ECA	37
7.2.1. Frecuencias alélicas y genotípicas	37
7.2.2. Polimorfismo I/D y la actividad de la ECA	38
7.2.3. Polimorfismo I/D y presión arterial sistólica	39
8. DISCUSION	41
9. CONCLUSIONES	51
BIBLIOGRAFIA	53

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Vías Metabólicas de la Cascada del SRA.	12
Figura 2. Esquema del gen de la ECA y determinación del polimorfismo I/D	18
Figura 3. Fotografía polimorfismo I/D en gel de Agarosa al 2%.	30
Figura 4. Relación de la edad con la presión arterial y la actividad de la ECA.	33
Figura 5. Relación del tiempo de gestación con la actividad de la ECA y la presión arterial.	34
Figura 6. Relación entre la actividad de la ECA y la presión arterial sistólica.	35
Figura 7. Relación de la actividad de la ECA con la presión arterial diastólica.	36
Figura 8. Relación del polimorfismo I/D y la actividad de la ECA en gestantes.	39
Figura 9. Relación entre el polimorfismo I/D y la presión arterial.	40

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Variables de la población de estudio para los dos muestreos.	31
Tabla 2. Distribución de la actividad de la ECA y la presión arterial.	32
Tabla 3. Variables de las gestantes con preeclampsia.	37
Tabla 4. Distribución alélica y genotípica de la población.	37

LISTA DE ANEXOS

	Pag.
Anexo 1. Consentimiento Informado	56
Anexo 2. Encuesta	57
Anexo 3. Metodología para la determinación de la actividad de la ECA	58
Anexo 4. Metodología de extracción de ADN	60
Anexo 5. Metodología para PCR del polimorfismo I/D	62

1. RESUMEN

La enzima convertidora de angiotensina (ECA) juega un importante papel en la homeostasis cardiovascular debido a que es la responsable de catalizar el paso de la Angiotensina I a Angiotensina II, un potente vasoconstrictor; a la vez que inactiva la Bradiquinina, una sustancia vasodilatadora. El polimorfismo Inserción/ Delección (I/D) es una mutación consistente en la delección o presencia de un fragmento de 287 pb en el intrón 16 del gen de la ECA; que ha sido relacionado con hipertensión, enfermedades cardiovasculares y desarrollo de preeclampsia.

Son muy pocos los estudios que asocian el polimorfismo I/D y la actividad de la ECA con la presión arterial en poblaciones mestizas. Este estudio se realizó con 120 gestantes a las cuales se les tomó dos muestras, una antes de las 20 semanas y otra después de las 20 semanas que asistieron a control prenatal al Centro de Salud La Milagrosa de la ciudad de Armenia; a las cuales se les determinó el polimorfismo mediante la técnica de PCR y la actividad de la ECA en suero por medio de espectrofotometría, utilizando FAPGG como sustrato.

Los niveles de actividad fueron 81.5 U/L y 89.5 U/L para los dos respectivos muestreos; las frecuencias genotípicas fueron; para II de 23.3%, ID de 50% y DD de 26.7%. Las frecuencias alélicas fueron 51.7% para el alelo D y 48.3% para el alelo I. Los niveles de actividad fueron elevados para el genotipo DD y bajos para II. Se determinaron relaciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre la actividad de la ECA con el tiempo de gestación, la presión arterial diastólica y con el polimorfismo I/D de la misma enzima.

Palabras claves: Enzima convertidora de angiotensina (ECA), polimorfismo I/D, presión arterial, FAPGG.

2. INTRODUCCIÓN

Son muchas las enfermedades que afectan la salud del hombre, pero también son muchos los esfuerzos que éste realiza para encontrar la solución o evitarlos. Sin embargo, falta bastante por estudiar en diversas enfermedades o desórdenes relacionados con ellas, las cuales presentan unas tasas significativamente altas de morbilidad y mortalidad, como es el caso de la hipertensión arterial.

La Hipertensión arterial es el trastorno cardiovascular mas frecuente que afecta por lo menos al 20% de la población adulta con una tasa de 15.8 por cada 100.000 habitantes. Para el departamento del Quindío, este desorden estuvo relacionado con el 25% de todas las disfunciones cardiovasculares ⁽¹⁾.

Además, en el embarazo, es la complicación médica más común ⁽²⁾ uno de sus estados es la preeclampsia, la cual es un desorden hipertensivo específico de gestantes, que afecta por lo menos del 5% al 8% de todos los embarazos ⁽³⁾, presentándose después de la semana 20 del periodo de gestación y se manifiesta como un desorden sistémico; caracterizado por proteinuria, edema, y anormalidades en el sistema renal y de coagulación, ocasionando en la mayoría de los casos no tratados, la muerte a la madre y al feto ⁽³⁾.

La preeclampsia esta asociada a factores tanto genéticos como ambientales, aumentando su incidencia en mujeres con problemas hipertensivos o renales previos al embarazo, de estrato socio-económico bajo, asociada a la falta de control prenatal y a las condiciones ambientales circundantes. Es más frecuente de desarrollarse en jóvenes durante el primer embarazo y en nulíparas de mayor edad, hipertensas previas y diabéticas ⁽³⁾. La preeclampsia en Colombia según el Ministerio de Salud se presenta con una tasa de 1:4500 ⁽¹⁾.

Uno de los factores genéticos más estudiados es el polimorfismo Inserción/ Delección (I/D) del gen que codifica para la enzima convertidora de angiotensina (ECA); el cual ha sido relacionado con enfermedades del sistema cardiovascular, como lo son las cardiopatías, cardiomiopatías; como también en casos de infarto al miocardio y por supuesto, con el desarrollo de preeclampsia; algunos estudios sugieren que esta variación del gen puede tener efectos que predisponen a sufrir de hipertensión severa en casos con historia familiar de hipertensión ⁽⁴⁾. Por otra parte, se ha establecido que la actividad de ésta enzima, se encuentra estrechamente relacionada con enfermedades de hipertensión arterial, que en gestantes se presenta en estados hipertensivos denominados preeclampsia y eclampsia.

La ECA se clasifica como una metaloproteína ácida, presentando un átomo de zinc en su sitio activo. Generalmente se encuentra localizada en las células endoteliales de varios órganos como pulmón, riñón, corazón, cerebro, placenta, plasma, entre otros. Dicha enzima interviene en el sistema renina angiotensina, donde cataliza la reacción del

cambio de angiotensina I a angiotensina II; este último compuesto aumenta la secreción de aldosterona y la consecuente contracción de las arterias, generando de esta forma el aumento de la presión sanguínea ⁽⁵⁾.

A pesar de la extensiva investigación que se ha realizado durante las últimas décadas, poco se conoce acerca de la patogénesis de la hipertensión, por lo tanto, el análisis del material genético para la detección de genes involucrados en el desarrollo de preeclampsia y de otras enfermedades a nivel cardiovascular, podría resultar efectiva en una temprana detección, diagnóstico y prevención de complicaciones de salud relacionadas con éstas y con ello mejorar la calidad de vida de los pacientes hipertensos y reducir los altos costos de atención médica hospitalaria, que estos requieren.

En las décadas de los 70's y 80's se realizaba una prueba en gestantes para el diagnóstico temprano de preeclampsia, que se basaba en la determinación de la Angiotensina II ⁽⁶⁾; sin embargo, esta prueba no era muy específica y generaba efectos secundarios en las pacientes, por tal motivo se dejó de aplicar.

Con la realización de este trabajo se pretendió determinar la asociación entre el polimorfismo I/D del gen de la ECA y la actividad de esta enzima con la presión arterial, como marcador predictivo de riesgo de preeclampsia en el embarazo sin efectos adversos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Determinar la asociación entre el polimorfismo I/D de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y su actividad con la presión arterial en mujeres gestantes.

3.2. Objetivos específicos

Determinar por medio de espectrofotometría los niveles de la ECA presentes en suero de mujeres embarazadas.

Establecer si la actividad de la ECA varía con relación al tiempo de gestación y con la edad.

Determinar si la actividad de la ECA presenta relación con la presión arterial.

Determinar la frecuencia genotípica y alélica para el gen de la ECA en los sujetos de estudio por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.

Establecer la relación del polimorfismo I/D del gen de la ECA con los niveles en suero de la enzima y con la presión arterial.

Relacionar el polimorfismo I/D de la ECA y su actividad con el desarrollo de preeclampsia.

4. ESTADO DEL ARTE

Rigat y colaboradores en 1990, estudiaron una población caucásica de hombres y mujeres, para analizar el polimorfismo I/D de la ECA y los niveles de la misma enzima en suero; encontraron que había una relación estadísticamente significativa, puesto que, para el genotipo DD se presentaban unos niveles mas altos comparados con el genotipo ID e II con niveles intermedios y bajos respectivamente ⁽⁷⁾.

Li J, Hu HY, Zhao YN. en 1992, midieron la actividad de la enzima ECA en mujeres embarazadas normotensas y con hipertensión, encontraron que los niveles de ECA eran mayores en hipertensas que en normotensas ($p = 0.01$) y que la presión arterial presentaba una relación directamente proporcional a la actividad de la enzima; concluyeron que los disturbios en la regulación de la actividad de la ECA pueden ser factores responsables en el desarrollo de hipertensión ⁽⁸⁾.

En 1996, Bloem; Manatunga y Howard realizaron un estudio en adolescentes blancos y negros para determinar si el grupo racial tenía alguna influencia sobre el polimorfismo de la ECA y la actividad de esta enzima en suero; encontrando que la actividad de la enzima presenta diferencias estadísticamente significativas con los genotipos del polimorfismo I/D, distribuidos así; niveles altos en el genotipo DD, intermedios para el genotipo ID y bajos para el genotipo II en los sujetos blancos, pero no presentaba ninguna diferencia en los niveles en los genotipos de los sujetos negros. Concluyendo entonces que, existe una importante variación étnica en la regulación genética de la actividad de la ECA y su polimorfismo con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares ⁽⁹⁾.

Morgan y colaboradores en 1999, en un estudio de casos y controles sobre el polimorfismo I/D del gen de la ECA y su asociación con preeclampsia en mujeres Ucranianas, reportaron que aunque el genotipo DD mostraba una frecuencia mayor en casos que en los controles, no se presentaba ninguna relación en cuanto a distribución genotípica y frecuencia alélica de dicho polimorfismo con la preeclampsia ⁽¹⁰⁾.

Zhou N, y colaboradores, en 1999, encontraron que había una alta asociación entre la preeclampsia y el genotipo DD comparado con los controles. Además, postulan que en contraparte a este suceso el genotipo II es un marcador genético que reduce el riesgo de preeclampsia ⁽¹¹⁾.

En un estudio caso control realizado en el 2000 por Natogowska-Glosnicka y colaboradores. Se determinó que de acuerdo a los resultados encontrados en una población de 276 gestantes caucásicas de Polonia no existe relación alguna entre el polimorfismo I/D y el desarrollo de hipertensión inducida por el embarazo ⁽¹²⁾.

En el 2001, Seremak y colaboradores, realizaron un estudio caso control en mujeres gestantes con hipertensión inducida por el embarazo; los resultados de dicho estudio arrojaron una sobre expresión significativa del alelo I en los casos, mientras que la población control se encontraba en equilibrio según la Ley de Hardy – Weinberg. Por tal motivo, ellos postulan que dicha variación juega un importante rol en la etiología del desorden objeto de estudio ⁽¹³⁾.

Jaana Heiskanen y colaboradores en el 2001, publicaron un estudio de la asociación del polimorfismo del gen de la ECA con colestasis obstétrica y con preeclampsia, donde llegaba a la conclusión que el genotipo DD es un marcador genético asociado a un elevado riesgo de sufrir colestasis obstétrica, pero el polimorfismo I/D de la enzima no juega un papel significativo para el desarrollo de preeclampsia ⁽¹⁴⁾.

En Shanghai, Zhu M y colaboradores en el 2001, determinaron que tanto la frecuencia alélica para el alelo D como la frecuencia genotípica del mismo alelo eran muy superiores en las mujeres con hipertensión inducida por el embarazo que en las gestantes normotensas, con un valor de $p < 0.001$, confirmando esto, que la variación genética del locus de la ECA está involucrada en un elevado riesgo de presentar hipertensión durante el embarazo, además, sugiere que el gen de esta enzima puede contribuir a la patogénesis de la hipertensión ⁽¹⁵⁾.

Mello y colaboradores en el 2002, de acuerdo a un estudio caso control de una población Italiana de mujeres con preeclampsia, afirman que existe una asociación significativa entre el polimorfismo I/D el desarrollo de dicho desorden ⁽¹⁶⁾.

Gurdol y colaboradores en el 2004, afirmaron que la actividad de la ECA en plasma y en tejido se presenta bajo un control genético. El incremento de la actividad debido a la delección del polimorfismo I/D del gen de la ECA está asociado con una gran variedad de enfermedades que exhiben disturbios endoteliales. Algunos estudios sugieren que la

incidencia de esta delección y su asociación con preeclampsia varía dependiendo de la población de estudio y su localización geográfica ⁽¹⁷⁾.

En su estudio encontraron que la frecuencia del alelo D era estadísticamente significativa con relación al desarrollo de preeclampsia; además que existe una asociación entre el genotipo II y niveles bajos de actividad de la ECA en preeclampsia, y que el embarazo como tal no afecta la actividad de la enzima ⁽¹⁷⁾.

En un estudio realizado en el 2004 en Porto Alegre, Brasil, por Galao & Souza, con 51 mujeres con preeclampsia y 71 mujeres con embarazo normal; no se determinaron diferencias significativas entre el grupo de estudio y los controles, por ende no se presentó ninguna relación entre el polimorfismo I/D y el desarrollo de preeclampsia ⁽¹⁸⁾.

Hyuanh Choi y colaboradores en el 2004, realizaron un estudio con mujeres embarazadas de Corea, para determinar la asociación entre el polimorfismo I/D y la preeclampsia. En sus resultados se presentó una relación estadísticamente significativa entre el genotipo DD y el desarrollo de preeclampsia, con un $p < 0.05$ ⁽¹⁹⁾.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. Sistema renina angiotensina

El sistema renina angiotensina (SRA) consiste en una cascada de interacciones entre enzimas y sustratos que culminan con la producción de angiotensina II (Ang II), que es un octapéptido activo responsable de los efectos conocidos de este sistema, el cual se encarga de controlar varias funciones esenciales para el organismo. (Fig.1).

El SRA es mucho más complejo de lo que se había pensado, siendo capaz de generar una gran cantidad de péptidos biológicamente activos aptos para producir diversas acciones. En general el SRA controla la presión sanguínea, los líquidos y el balance electrolítico a través de efectos coordinados sobre órganos como el corazón, las arterias, los riñones, entre otros.

El SRA se inicia con el angiotensinógeno (ANG) que es una glucoproteína de 452 aminoácidos cuya síntesis y secreción está regulada en el hígado por un complejo mecanismo fisiológico con mediadores en los cuales intervienen glucocorticoides, estrógenos, hormonas tiroideas y algunas variaciones genéticas, por ejemplo el polimorfismo del gen del angiotensinógeno. Esta regulación no es muy clara en otros tejidos donde también se sintetiza ANG.

El segundo eslabón del SRA es la renina, la cual hidroliza el ANG hasta Angiotensina I (Ang I). La renina es una enzima que se sintetiza en el riñón, de donde proviene su

nombre, como un precursor inactivo ⁽²⁰⁾ conocido como prorenina (ProR). Esta prorenina es procesada por lisis proteica a renina activa por la remoción de 43 aminoácidos del propéptido y secretada en respuesta a estímulos apropiados.

En tejido cardíaco se ha demostrado la síntesis de algunos componentes del SRA (excluyendo renina) y la formación de Ang-II, por lo tanto la renina sería captada de la circulación para producir localmente angiotensina I. Esta difusión de renina en el espacio intracelular cardíaco se produce mediante receptores ⁽²⁰⁾.

Teniendo en cuenta que la renina en sangre se presenta predominantemente en la forma de ProR inactiva, es posible suponer que el corazón retiene ProR y la activa localmente.

En la mujer la ProR plasmática permanece en valores más o menos estables durante la fase folicular del ciclo menstrual y aumenta bruscamente coincidente con el pico de hormona Luteinizante (LH), dissociado de los cambios de renina activa ⁽²¹⁾. Durante las 10 primeras semanas del embarazo aumenta unas 5 a 10 veces y luego decae lentamente hasta valores normales después del parto ⁽²²⁾.

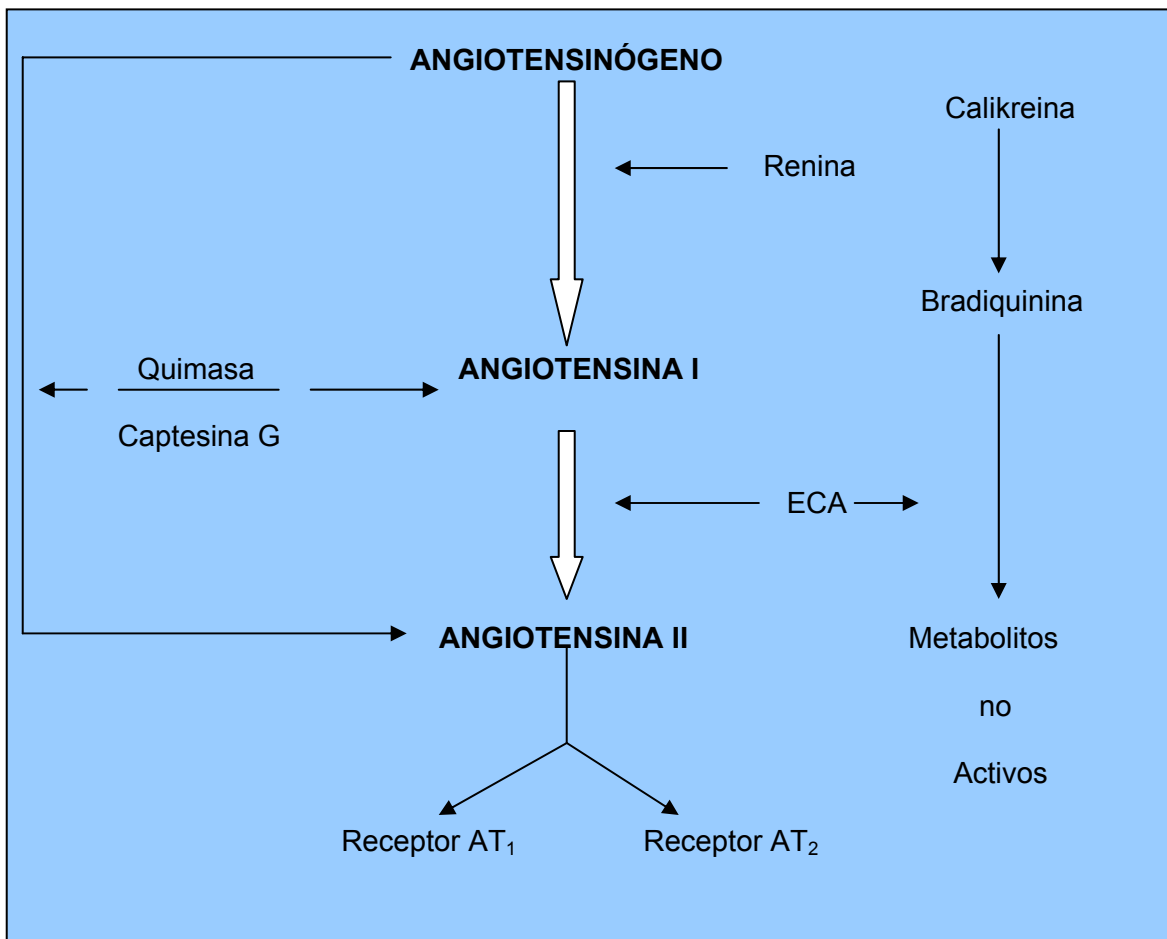


Figura 1. Vías Metabólicas de la Cascada del SRA.

En la figura 1, se describen las vías metabólicas más importantes de los péptidos de la cascada del SRA. De hecho, el destino de cada vía depende del tejido y de las concentraciones y condiciones cinéticas de los metabolitos y enzimas responsables.

El tercer componente del sistema es la ECA que convierte la Ang I a Ang II, removiendo dos aminoácidos de su extremo carboxilo; esta Ang II es una sustancia de características vasoconstrictoras. Además, la misma enzima es la encargada de inhibir la actividad de bradiquinina, el cual es el péptido encargado de la vasodilatación ⁽²³⁾.

Finalmente se presentan los receptores de membrana para la Ang II que son de dos tipos: Los AT₁ se encuentran en las glándulas suprarrenales, en el cerebro, en el riñón, en el músculo liso vascular y en el corazón, mientras que los receptores AT₂ se encuentran en grandes cantidades en los tejidos fetales para luego disminuir gradualmente después del nacimiento.

Los receptores AT₁ pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a proteína G, tal como en el caso de los receptores beta adrenérgicos ⁽²³⁾.

Los AT₂ inhiben el crecimiento celular e inducirían apoptosis, y participan también en antiproliferación de células endoteliales coronarias y diferenciación celular ⁽²³⁾.

En síntesis el SRA se resume en el siguiente proceso: La renina actúa sobre el angiotensinógeno (tetradecapéptido) sintetizado por el hígado y el riñón, y da lugar a la formación de Ang I que es un decapeptido inactivo, que luego pierde 2 aminoácidos por la acción hidrolítica de la ECA, transformándose en el octapéptido activo Ang II, el cual es un potente vasoconstrictor, la ECA además hidroliza la Bradiquinina, que es la sustancia encargada de la vasodilatación.

5.2. Enzima convertidora de angiotensina (ECA)

La enzima convertidora de angiotensina es una dipeptidil carboxipeptidasa conocida también como una kininasa II (EC: 3.4.15.1), es una enzima transmembranal que presenta un átomo de zinc por cada molécula, en su parte activa y por tal motivo es considerada una metaloproteína.

El importante papel que juega en la regulación de la presión arterial y en el metabolismo salino, lo efectúa convirtiendo Ang I en el potente vasoconstrictor Ang-II y además degradando el péptido vasodilatador bradiquinina. Ambos participan en la regulación del tono vascular y en la función cardíaca ⁽⁵⁾.

La ECA actúa también sobre otros sustratos, ampliando sus funciones en diferentes aspectos fisiológicos como: metabolismo neuronal, hematopoyesis, digestión y reproducción. Está ampliamente distribuida en el organismo, en células epiteliales, neuroepiteliales y mononucleares ⁽²⁴⁾ y al mismo tiempo en fluidos biológicos como orina, líquido cerebroespinal y líquido amniótico.

La ECA humana se presenta en dos formas, una de peso molecular entre 150-180 KDa (ECA somática) con dos dominios homólogos que se denominan, de acuerdo a su posición en la cadena: N-terminal o Dominio-N y C-terminal o Dominio-C; conteniendo ambos zinc en el sitio de unión y un centro activo ⁽²⁵⁾. La otra es de bajo peso molecular

(90-100 kDa) y encontrada en testículo (ECA germinativa o testicular) que contiene solamente el Dominio-C.

La regulación de la síntesis de la ECA es desconocida. La ECA tiene también la propiedad de procesar Ang-(1-7) a Ang-(1-5) y lo efectúa 100 veces más rápido por el Dominio-N que por el Dominio-C, lo que evidencia que los dos dominios de la ECA podrían tener diferentes funciones; así Ang-(1-7) parece ser sustrato específico del Dominio-N de la ECA y además inhibidor del Dominio-C ⁽²⁵⁾.

Este hecho resulta importante para el desarrollo de futuras generaciones de inhibidores de la ECA que reaccionen más específicamente sobre uno de los sitios activos.

Después del empleo exitoso del captopril, primer inhibidor conocido de la ECA, diversos compuestos fueron sintetizados y empleados en el tratamiento de la HTA, enfermedad cardiaca congestiva y prevención del daño miocárdico post-infarto. YA que estas sustancias al inhibir la ECA, disminuye la presión arterial a través de dos mecanismos: prevención de la formación de Angiotensina II y la potenciación de las propiedades hipotensivas de la Bradiquinina. De hecho su inhibición ha sido de importancia durante años en el tratamiento antihipertensivo.

Aunque el primer análisis del suero para la ECA fue descrito en 1970 ⁽²⁴⁾ el interés en la ECA comenzó en 1975 con la observación de Lieberman J, ⁽²⁶⁾, en el cual los niveles de la enzima fueron aumentados para sarcoidosis; sin embargo, la utilización como una prueba

de diagnóstico para esta enfermedad fue limitada por carencia de sensibilidad y especificidad.

En plasma humano los niveles de la ECA son elevados durante la infancia y decrecen en el adulto ⁽³¹⁾. La razón de este hecho es desconocida.

Han habido algunos informes de la influencia de la edad y del género en los niveles de ECA: por ejemplo niños entre 4 y 18 años que tenían valores más altos que adultos, y los hombres presentaban valores levemente más altos que las mujeres ⁽⁷⁾. Sin embargo, la mayoría de los autores no han observado ninguna diferencia significativa en los niveles de la actividad ligada al sexo ⁽²⁷⁾. Tales niveles de ECA permanecen dentro de límites reducidos en un individuo pero varían extensamente entre individuos.⁽²⁷⁾, ahora se sabe que esta variación es debida a un polimorfismo genético (I/D) que influencia los niveles de ECA ⁽⁷⁾.

La clonación del gen de la ECA permitió entre otras cosas la identificación de diversos polimorfismos. Uno de ellos denominado polimorfismo Inserción / Delección (I/D) consiste en la presencia (inserción) o ausencia (delección), de un fragmento de DNA de 287 pares de bases en un intrón corto, que podría provocar variaciones individuales de los niveles de la ECA en plasma ⁽⁷⁾.

Los diferentes estudios realizados parecían indicar que el alelo D estaba asociado: con un aumento de la actividad de la ECA y de producción de Ang-II ⁽²⁷⁾; con riesgo de isquemia coronaria e infarto de miocardio ⁽²⁸⁾; con diabetes tipo-2 ⁽²⁹⁾; con enfermedades

cardiovasculares y aumento en la degradación de bradiquinina ⁽³⁰⁾; con evolución negativa en enfermedades renales ⁽³¹⁾ y otras patologías.

Asimismo, el estudio del polimorfismo I/D de la ECA fue propuesto como un marcador genético para identificar:

- a) Individuos con alto riesgo de enfermedad isquémica coronaria.
- b) Riesgo de re-estenosis coronaria.
- c) Pronóstico en la diabetes tipo-2.

Sin embargo, los resultados contradictorios de los diversos estudios emprendidos están indicando que el significado fisiológico del polimorfismo I/D de la ECA no está para nada definido.

La biología molecular ha proporcionado importantes detalles sobre la estructura y función de la ECA, pero aún permanecen sin resolver numerosos interrogantes. Particularmente los referidos a la estructura terciaria (incluyendo glicosilación) de la proteína, a la expresión y regulación por los tejidos, la especificidad de los dominios N y C, el significado del polimorfismo I/D en diversas patologías y el rol que juegan los homólogos de la ECA.

5.3. Acciones de la angiotensina II

La Angiotensina II juega un importante papel en la regulación de las funciones renales, vasculares y cardíacas. Sus funciones principales se vinculan a estimulación de la sed, vasoconstricción, estimulación de la secreción de aldosterona por la corteza suprarrenal, y acción mitogénica; modula la excreción renal de Na⁺, la contracción y relajación miocárdica, y el tono vascular. Además, participa en la regulación del tono vasomotor, del crecimiento celular y del proceso de apoptosis.

5.4. Polimorfismo I/D del gen de la ECA

El gen de la ECA humano se encuentra localizado en el cromosoma 17q23. En 1981, Rigat y colaboradores ⁽⁷⁾ describieron un polimorfismo en dicho gen que consistía en la presencia (inserción, I) o ausencia (delección, D) de un fragmento de 287 pares de bases en el intrón 16 del gen de la ECA (Figura 2), el cual ha sido implicado en la patogénesis de la hipertensión esencial ⁽²⁵⁾ con la particularidad de que dicho polimorfismo explicaba un 47% de la variabilidad fenotípica de ECA plasmática. Concretamente, se vio que el alelo D se asociaba a unos niveles plasmáticos de ECA aumentados.

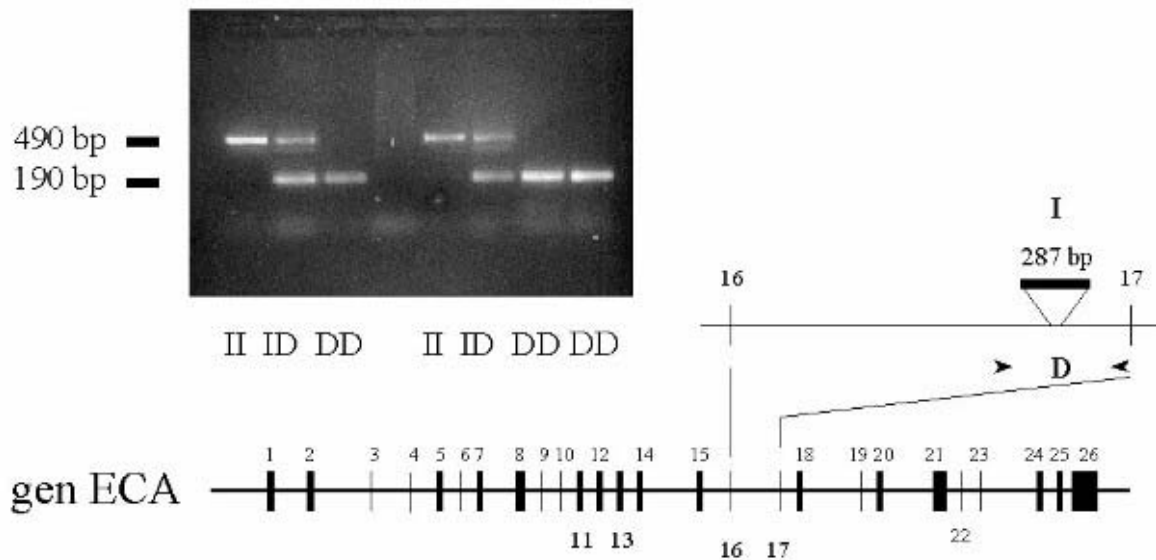


Figura 2. Esquema del gen de la ECA y determinación del polimorfismo I/D.

La parte inferior de la figura 2, representa la estructura del gen de la ECA. Los 26 exones están representados por barras verticales. La parte central de la figura es una ampliación del intrón 16, donde se encuentra localizado el polimorfismo, con la inserción del fragmento ALU de 287 pb. Los puntos de la flecha indican la posición aproximada del par de cebadores para la acción de la PCR. En la parte superior de la figura se representa un gel de Agarosa al 2%, donde se visualizan los productos de PCR. Los genotipos se indican en la parte inferior del gel y el tamaño molecular indicado en la parte izquierda del gel.

El polimorfismo I/D de la ECA define tres genotipos, cuando no existe la delección, el genotipo es conocido como II, de tal forma que si la mutación ocurre solo en uno de los alelos, el genotipo resultante será ID, cuando los dos alelos presentan la delección será DD.

Con respecto a la relación entre esos genotipos y las enfermedades cardiovasculares (ECV), Raynol y colaboradores ⁽³²⁾ han reportado una frecuencia del 48% en el genotipo DD en individuos con cardiomiopatía idiopática dilatada y un 63% en sujetos con cardiomiopatía isquémica, sugiriendo que una variación en este gen puede contribuir a la patogénesis de ambos tipos de cardiomiopatías; en el mismo sentido los resultados de Bedir y colaboradores ⁽³³⁾ describen que los genotipos del gen de la ECA influyen sobre la actividad de esta enzima y que los más altos niveles de la ECA se encontraron en el genotipo DD; además, los resultados del trabajo de Bedir sugieren que el genotipo DD puede tener efectos que predisponen a hipertensión severa en casos con historia familiar de hipertensión.

5.5. Hipertensión y preeclampsia

5.5.1. Hipertensión esencial

Frecuentemente se trata de una hipertensión esencial o primaria, cuando la etiología es desconocida. La hipertensión secundaria es aquella debida a alguna causa fácilmente identificable. Los individuos con tensión arterial alta tienen más riesgo de sufrir una apoplejía o un ataque al corazón.

Se cree que tanto los factores ambientales como los genéticos contribuyen a la hipertensión esencial. La tensión arterial tiende a elevarse con la edad. Es también más frecuente que aparezca si la persona es obesa, tiene una dieta rica en sal y pobre en potasio, bebe elevadas cantidades de alcohol, no tiene actividad física y sufre estrés

psicológico. Aunque está claro que la tendencia a la hipertensión puede ser heredada, se desconocen en gran medida los factores genéticos responsables de la misma.

5.5.2. Hipertensión durante el embarazo

La hipertensión durante el embarazo puede existir previamente o ser inducida por la gestación (denominada clásicamente toxemia del embarazo, puede manifestarse como preeclampsia, eclampsia o hipertensión gestacional)⁽³⁴⁾.

En la preeclampsia la hipertensión se acompaña de edema y proteinuria (excreción renal de proteínas). Afecta entre el 5 y 8% de las gestaciones, más frecuentemente en primíparas, nulíparas, embarazos gemelares, mujeres con antecedentes familiares de hipertensión y mujeres con problemas renales e hipertensivos previos al embarazo. Se especula de su patología por isquemia uterina y/o factores inmunológicos o endocrinos. Debe detectarse precozmente mediante el control periódico y estricto de los factores de riesgo, la tensión arterial, el peso y la orina ⁽³⁴⁾.

5.5.3. Preeclampsia

La preeclampsia se asocia a tasas de morbilidad y de mortalidad significativas para la madre y el bebé. A pesar de una constante reducción en la mortalidad maternal por el desorden en la mayoría de países desarrollados, éste sigue siendo una de las razones más comunes de enfermedad durante el embarazo.

En el Reino Unido, el número de muertes tanto maternas como fetales por causa de la preeclampsia ha disminuido en las últimas décadas ⁽³⁵⁾, sin embargo; en otras partes del mundo, los índices de la mortalidad y la morbilidad siguen siendo muy altos y continuarán estando así hasta que se produzcan mejoras generales en los servicios de maternidad.

Los ensayos en la prevención han sido decepcionantes, así que los esfuerzos se centran principalmente en el tratamiento de la hipertensión en embarazo con cuidado prenatal integrado,

La presencia en la medición de la presión sanguínea que sobrepase a 140/90 mmHg, no es infrecuente en el embarazo. Se diagnostica la hipertensión persistente, si un registro elevado se encuentra en dos ocasiones por lo menos con 4 h de separado. La hipertensión persistente ocurre alrededor del 12-22% de embarazos, ⁽³⁶⁾ dependiendo de las poblaciones y las definiciones usadas. El tipo de hipertensión se puede definir más a fondo en base de otras muestras, particularmente proteinuria y anomalías clínicas de coagulación ⁽³⁶⁾.

La Preeclampsia es exclusiva de gestantes puesto que ocurre solamente en presencia de una placenta. Aunque se asocia a una falta de la invasión normal de las células del trofoblasto, conduciendo a un sobregiro de las arteriolas espirales placentarias ⁽³⁷⁾, puede también estar asociada a desórdenes de hiperplacentación generados por diabetes, primigravidez, y embarazo múltiple. Las arteriolas placentarias son la fuente de sangre para el feto y al producirse estas alteraciones en estas estructuras, se puede interferir el desarrollo normal.

En embarazo normal, hay cambios cardiovasculares substanciales con un aumento del 50% en volumen cardiaco y el volumen de la sangre, que se acompaña por una disminución en la presión arterial debido a la vasodilatación periférica. Los cambios generados por la preeclampsia tienden a ser lo contrario.

La enfermedad severa se asocia generalmente a un volumen cardiaco bajo y a una alta resistencia periférica.

Teniendo en cuenta que el sistema renina angiotensina se encuentra altamente distribuido por todo el torrente sanguíneo, es razonable pensar que el proceso de dicho sistema se lleve a cabo en las arterias de la placenta; es aquí donde su producto final puede ejercer sus efectos tanto de vasoconstricción como de remodelación de estas arterias, especialmente de la arteria espiral.

La eclampsia aparece como fase final de la preeclampsia cuando ésta no se ha diagnosticado y controlado. Precedida por cefaleas intensas, náuseas, vómitos, irritabilidad y trastornos visuales, se inicia con una contracción tónica de 30 segundos seguida por contracciones clónicas (convulsión) durante 2 o 3 minutos, para acabar en coma. Es una urgencia médica y obstétrica con alta mortalidad materno-infantil que se trata con hipotensores, diuréticos, dieta, sedantes, anticoagulantes y finalización del embarazo.

6. METODOLOGÍA

6.1. Población de referencia

Se tomó como universo, las mujeres gestantes que acudieron a control prenatal al Centro de Salud “La Milagrosa” de la ciudad de Armenia, Quindío entre el periodo comprendido entre la segunda semana de Marzo del 2004 hasta la segunda semana de septiembre de 2004.

6.1.1. Población de estudio

El tamaño de la muestra fue de 120 mujeres en embarazo con tiempo de gestación inferior a 20 semanas que acudieron a control prenatal del Centro de Salud “La Milagrosa” de la ciudad de Armenia, Quindío iniciando en la segunda semana de Marzo del 2004 hasta la segunda semana de Septiembre de 2004.

6.2. Criterios para la selección de los sujetos de estudio

Para la selección de la muestra poblacional se tuvo en cuenta los siguientes parámetros de inclusión y exclusión.

6.2.1 Criterios de inclusión

Mujeres gestantes que desearan participar en el estudio.

Mujeres gestantes que firmaran el consentimiento informado de aceptación del estudio.

Mujeres gestantes que no presentaran un periodo de gestación mayor a 20 semanas de gestación, a la primera toma de muestra de sangre.

6.2.2. Criterios de exclusión

Mujeres gestantes que no quisieran ser participes del estudio o que presentaran enfermedad renal o sarcoidosis.

Mujeres gestantes con diabetes mellitus diagnosticada, enfermedad tiroidea diagnosticada e hipertensión previa.

Mujeres gestantes que no firmaran el consentimiento informado de aceptación del estudio.

Mujeres gestantes que al momento de toma de la primera muestra de sangre estuvieran un periodo de gestación superior a 20 semanas.

6.3. Fase de consulta

El estudio se inició con la firma del consentimiento informado por cada una de las mujeres participantes del estudio realizado. A cada gestante que recurrió al Centro de Salud “La Milagrosa” de la ciudad de Armenia, se le entregó un formato que contenía información acerca del proyecto y donde, se invitaba por voluntad propia a participar en el estudio de la

determinación del polimorfismo I/D del gen de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y su actividad en suero, durante su periodo de embarazo (Anexo 1).

Además, del consentimiento informado, a la paciente se le diligenciaba otro formato tipo encuesta, donde quedaban consignados datos como: nombres y apellidos, dirección de domicilio, grado de escolaridad, edad, estado civil, tiempo de gestación, presión sanguínea, entre otros, permitiendo así realizar un seguimiento en el transcurso del embarazo (Anexo 2).

6.4. Toma de la muestra

Se realizaron muestreos antes y después de la semana 20 de gestación (no se estableció una semana en particular para la toma de la muestra).

En el primer muestreo (antes de la semana 20), una vez obtenido el consentimiento informado se llevó a cabo la toma de la muestra de sangre y presión arterial por parte de personal especializado para tal función. La toma de la muestra fue por venopunción en un tubo vacutainer (5 ml) sin anticoagulante para la obtención del suero en el cual se determinó los niveles de la enzima y otro tubo vacutainer (5 ml) con EDTA para la obtención del ADN.

Para el segundo muestreo se midió la presión arterial y se tomó solo una muestra de sangre, en tubo vacutainer (5 ml) sin anticoagulante para la determinación de los niveles de la ECA.

6.5. Fase de laboratorio

Ya con las muestras en el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud, de la Universidad del Quindío, se realizó la determinación de la actividad de la ECA en suero, y el polimorfismo I/D del gen de la misma, los análisis de resultados, presentación y publicación de los mismos.

6.6. Definición de las Variables

6.6.1. Presión sanguínea

La medición de dicho parámetro fue realizado por el médico ginecobstreta utilizando un Tensiómetro marca Welch Allyn y un fonendoscopio. La hipertensión fue definida de acuerdo al Colegio Americano de Obstetricia y Ginecología ⁽³⁸⁾, basándose en cualquiera de los siguientes aspectos:

Incremento mayor o igual a 30 mmHg en la presión arterial sistólica normal.

Incremento mayor o igual a 15 mmHg en la presión arterial diastólica normal.

Presión sistólica de 140 mmHg o mayor.

Presión diastólica de 90 mmHg o mayor.

Tensión arterial media mayor de 105 (sistólica + 2 diastólica / 3).

6.6.2. Diagnóstico de Preeclampsia

La presencia de preeclampsia fue establecida por el medico que lleva el control prenatal basándose en los aspectos establecidos por el Colegio Americano de Obstetricia y Ginecología, donde la hipertensión en el embarazo es clasificada en los siguientes grupos:

Hipertensión inducida por el embarazo:

Preeclampsia.

Eclampsia.

Preeclampsia y eclampsia sobreagregada a una hipertensión crónica.

Hipertensión transitoria.

Para el presente estudio solo se tuvo en cuenta las gestantes del primer grupo.

6.7. Actividad de la ECA en suero

La actividad de la ECA fue determinada en suero, usando el método de Simonetta Ronca – Testoni 1983 ⁽³⁹⁾ modificado por el laboratorio de Bioquímica y Genética de la Universidad del Quindío, que se basa en la hidrólisis enzimática del Furilacriloil – L – fenilalanil – glicil – glicina (FAPGG), por la ECA del suero, hasta Furilacriloil – L – fenil (FAP) y glicil – glicina (Gly – Gly). (Anexo 3.)

6.8. Determinación del polimorfismo I/D

6.8.1. Extracción ADN.

La extracción de ADN se realizó utilizando el kit Wizard Genomic DNA Purification en sangre total siguiendo las instrucciones de catálogo. (Anexo 3).

6.8.2. Reacción en cadena de la Polimerasa. (PCR)

El polimorfismo del gen de la ECA fue determinado utilizando la metodología de Rigat et al. 1990 ⁽⁵⁾, por medio de la técnica de PCR utilizando dos tipos de primers:

ACE1 = 5- CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3

ACE2 = 5- GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTCAGA T-3) (Anexo 5.).

6.8.3. Electroforesis.

Los productos amplificados fueron visualizados por electroforesis en geles de Agarosa al 2% y expuestos bajo luz ultravioleta con bromuro de etidio al 0.025%.

Para la interpretación de los resultados se definió que la presencia de una sola banda de 190 pb indica un individuo homocigoto para la delección y su genotipo es DD, la presencia de una sola banda de 490 pb indica un individuo homocigoto para la inserción y su genotipo es II, finalmente, la presencia de ambas bandas indica un individuo heterocigoto y su genotipo es ID (Figura 3.).

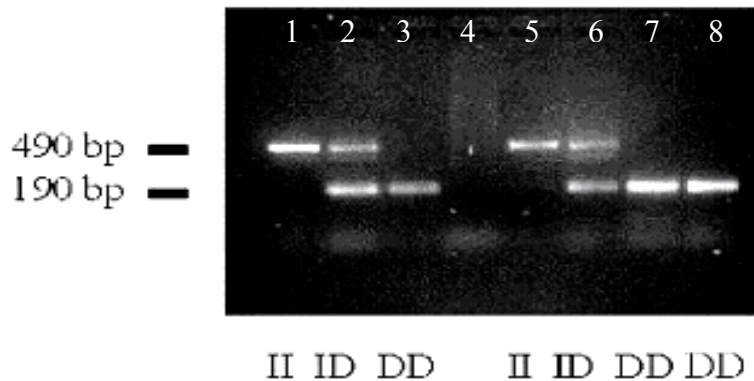


Figura 3. Fotografía polimorfismo I/D en gel de Agarosa al 2%.

En las columnas 1 y 5 se observan gestantes con homocigotos para la Inserción, en las columnas 2 y 6 gestantes heterocigotas, en las columnas 3,7 y 8 gestantes homocigotos para la deleción. La columna 4 es el control negativo.

6.9. Análisis de resultados

La información de las pacientes y los resultados de las pruebas de laboratorio realizados fueron almacenadas en una base de datos Excel 7.0. Los valores para las variables se expresaron como la Media aritmética \pm desviación estándar (DS).

Las características clínicas de las gestantes fueron analizadas de acuerdo a pruebas de T Student y a correlación de varianza ANOVA, utilizando el programa Epi Info versión 6.04; Se estableció el grado de significancia cuando $p < 0.05$. Además, se realizó una prueba de equilibrio de poblaciones de Hardy - Weinberg, para constatar que la distribución genotípica y alélica de nuestra población se encontraba o no en equilibrio y comparar su relación con otras poblaciones.

7. RESULTADOS

Se estudio una población de 120 mujeres gestantes de la ciudad de Armenia, que asistieron a control prenatal al Centro de Salud, La Milagrosa, y que se ajustaban a los parámetros de selección descritos en la metodología. De estas 120 mujeres, 112 participaron durante todo el proyecto y las 8 restantes solo participaron para el primer muestreo debido a que abortaron antes de la semana 20 de embarazo.

Además, en esta población se encontraron dos casos con preeclampsia, el primero se dio en la semana 35 de gestación y se debió inducir el parto para evitarle mayores complicaciones a la madre, de esta paciente solo se obtuvo una muestra de suero en la semana 17 y no se presentó para la toma de segunda muestra; no obstante, por medio de la historia clínica se obtuvo el valor de presión arterial al momento del desarrollo de la preeclampsia. El segundo caso fue el de una paciente al culminar su embarazo (semana 37), a la cual también se le indujo el parto, logrando salvar la vida del niño.

POBLACIÓN TOTAL (n = 120)			
Variable	Rango	Primer Muestra	Segunda Muestra
Tiempo Gestación (semanas)	5 - 39	< 20	20 ≥
Casos de Preeclampsia	*		2
Casos de Abortos	*	8	*
Edad (años)	12 - 42	22,3 ± 6,4	22,3 ± 6,4
Niveles de ECA (U/L)	22 - 205	81.5 ± 36,7	89,5 ± 37,1
Presión Sistólica (mmHg)	70 - 130	101,5 ± 10,7	104,3 ± 9,5
Presión Diastólica (mmHg)	40 - 80	62,6 ± 8,7	63,3 ± 7,9

Tabla 1. Variables de la población de estudio para los dos muestreos.

7.1. Actividad de la enzima convertidora de angiotensina

7.1.1. La edad con relación a la presión arterial y los niveles de enzima convertidora de angiotensina

Para relacionar la edad con la presión arterial y los niveles de actividad de la ECA se categorizó aleatoriamente la edad en intervalos de seis años; como lo describe la tabla 2.

Intervalos de Edad (años)	n	Primer Muestreo			Segundo Muestreo		
		Presión Sistólica (mmHg)	Presión Diastólica (mmHg)	Actividad ECA (U/L)	Presión Sistólica (mmHg)	Presión Diastólica (mmHg)	Actividad ECA (U/L)
12 a 17		101	62	90	105	64	95
18 a 23	51	101	62	79	104	62	86
24 a 30	24	102	62	72	103	63	91
31 a 36	7	109	69	100	106	63	97
37 a 42	7	97	63	78	106	68	68

Tabla 2. Distribución de la actividad de la ECA y la presión arterial con respecto a la edad para los dos muestreos.

De las gestantes que participaron en el proyecto, el 26% eran menores de 18 años de edad y solo el 5.5% de esta población superaba los 36 años de edad. Los valores de presión tanto sistólica como diastólica se mantuvieron relativamente estables con respecto a la edad de las gestantes, registrando un ligero aumento en los rangos de edad superiores a 24 años (Figura 4.). La actividad de la ECA presentó su valor mas alto en el rango de edad de 30 a 36 años con 98.3 U/L; y los valores mas bajos fueron encontrados en el rango de edad mayor a 36 años (figura 4.). En general, no se presentó ninguna

relación entre la edad de las gestantes con los niveles de la enzima ni con la presión arterial (sistólica y diastólica), la cual fue estable hasta el rango de 24 a 30 años, luego mostró un ligero aumento, que no fue estadísticamente significativo.

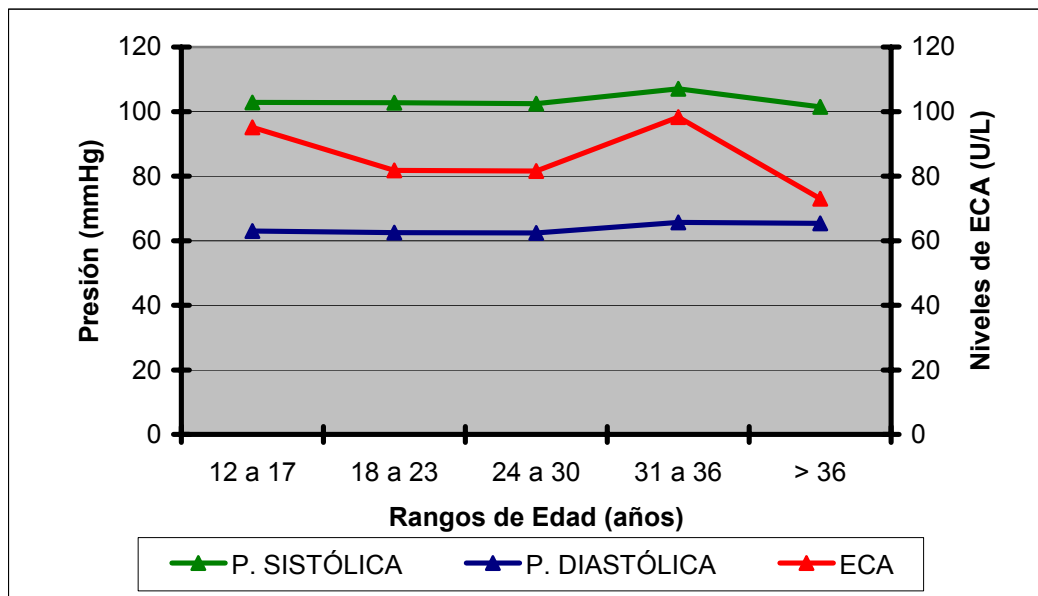


Figura 4. Relación de la edad con la presión arterial y la actividad de la ECA.

7.1.2. El tiempo de gestación con relación a la actividad de la ECA y a la presión arterial

Los niveles de la enzima ECA mostraron una relación estadísticamente significativa con el tiempo de gestación ($p = 0.02$), encontrando que tales valores aumentaban para el segundo muestreo (después de la semana 20 de embarazo), con una media para el primer muestreo de 81.5 U/L y de 89.5 U/L para el segundo muestreo (Figura 5.). Los valores mas altos para el primer y segundo muestreo fueron de 193 U/L y 205 U/L respectivamente, con unos mínimos de 22 U/L y 18 U/L para dichos muestreos.

Por otra parte, la presión arterial aunque sufrió un ligero aumento para el segundo muestreo, no presentó una relación significativa ($p > 0.05$), con respecto al tiempo de gestación (Figura 5.).

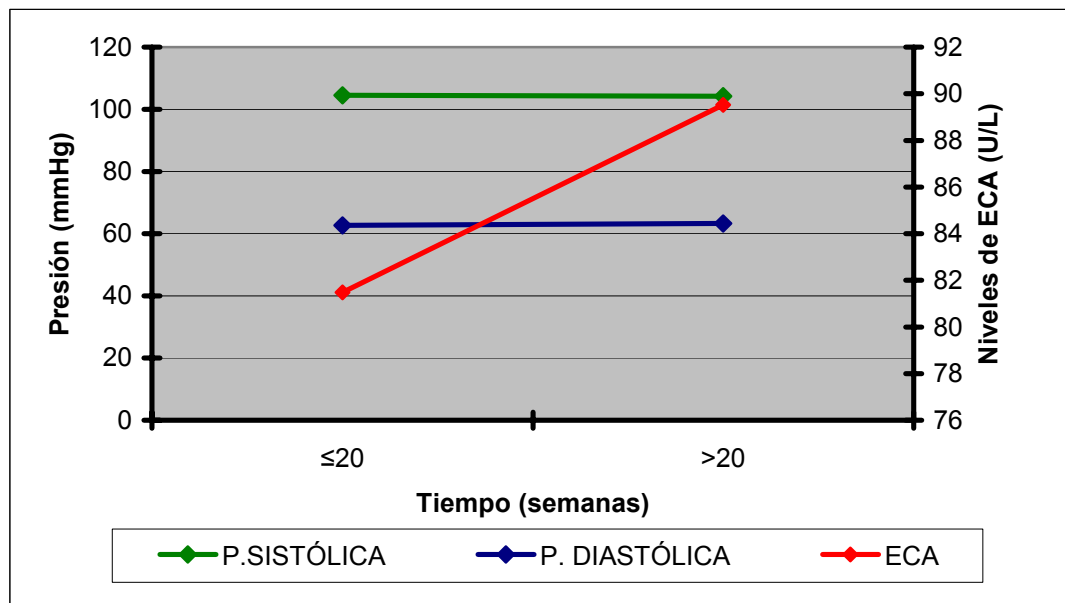


Figura 5. Relación del tiempo de gestación con la actividad de la ECA y la presión arterial.

7.1.3. La actividad de la ECA y presión arterial.

7.1.3.1. Presión arterial sistólica

La actividad de la enzima presenta un valor máximo para el primer periodo de medición de 105 U/L en el rango de presión sistólica de 70 mmHg a 89 mmHg, luego disminuye a medida que la presión aumenta (inversa), hasta el rango de 101 mmHg a 120 mmHg donde registra un valor de 74 U/L, luego aumenta proporcional a la presión hasta 87 U/L a 130 mmHg de presión sistólica (Figura 6.), el cual es valor de presión mas alto encontrado

(Tabla 1.). Para el segundo muestreo, el comportamiento de la actividad es todo lo contrario, inicia en 79 U/L para el rango de 70 mmHg a 89 mmHg y tiene una tendencia a aumentar directamente proporcional a la presión, terminando en 88.2 U/L para 120 mmHg de presión sistólica, la cual fue la mayor presión encontrada para este segundo periodo de medición (Figura 6.).

Al realizar en análisis estadístico se determinó que no existen relaciones estadísticamente significativas ($p > 0.05$), entre la actividad de la enzima y la presión arterial sistólica.

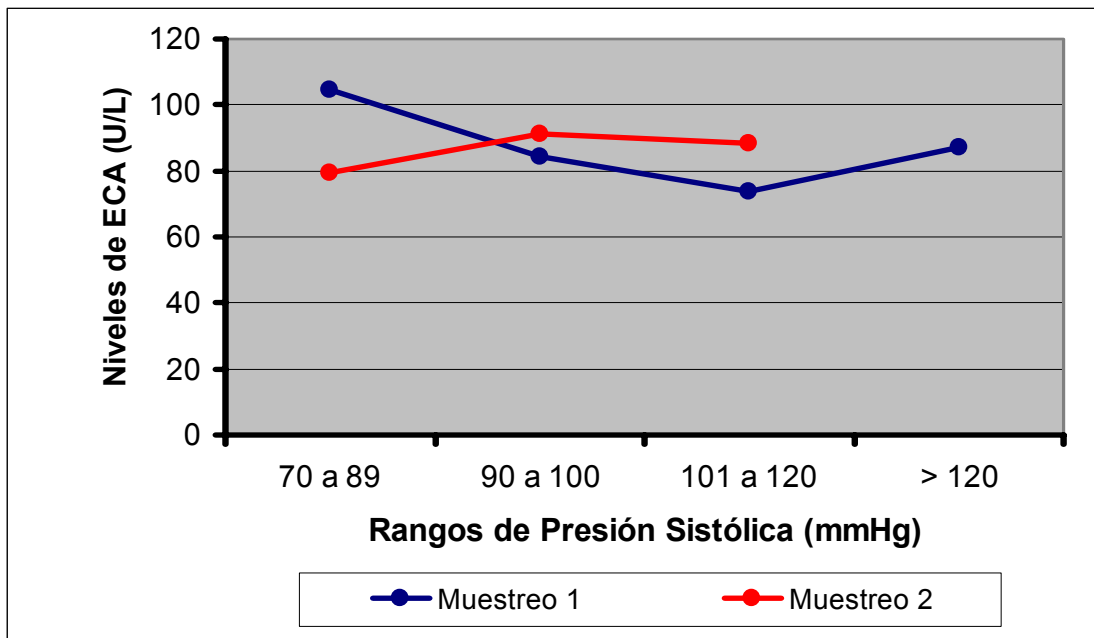


Figura 6. Relación entre la actividad de la ECA y la presión arterial sistólica.

7.1.3.2. Presión arterial diastólica

La actividad de la ECA con respecto a la presión arterial diastólica presentó una relación significativa inversamente proporcional con una $p = 0.014$, aunque esta relación fue más marcada para el segundo muestreo que para el primero.

La mayor actividad para el primer muestreo se dio en el rango de 50 a 59 mmHg con 101 U/L, disminuyendo a medida que aumentaba el rango de presión hasta llegar a 78 U/L para ≥ 80 mmHg que fue el rango mayor de presión diastólica (Figura 7.), sin embargo, esta relación inversa no fue significativa. Para el segundo muestreo la mayor actividad se registró en el rango de presión diastólica de 40 a 49 mmHg con 125 U/L, mostrando un comportamiento de actividad inversamente proporcional a la presión diastólica hasta disminuir a 71 U/L en el máximo rango de presión (Figura 7.).

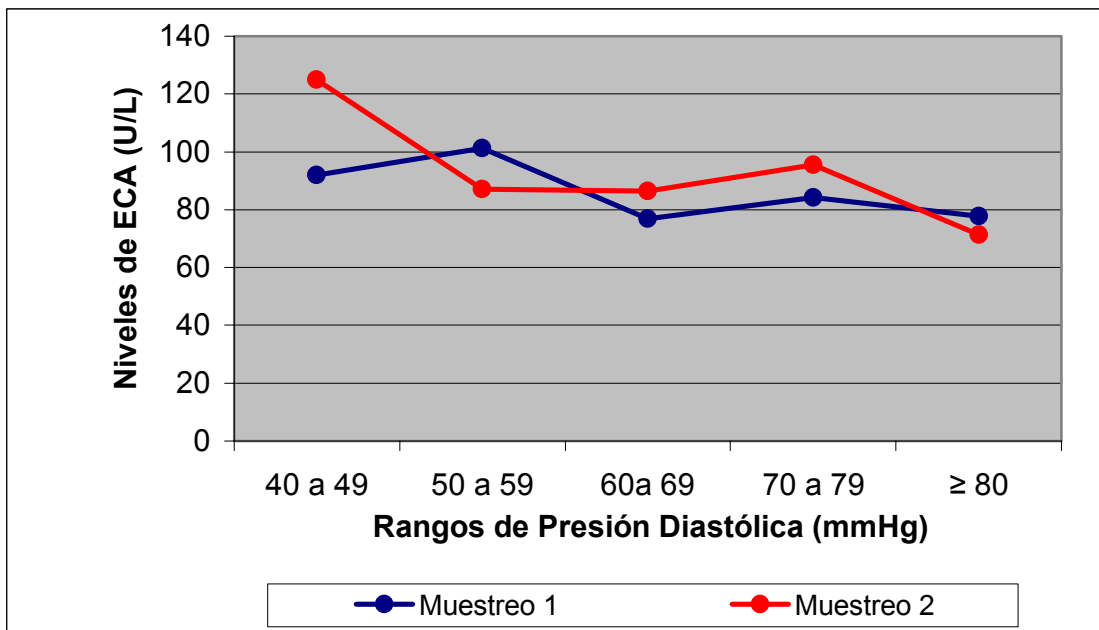


Figura 7. Relación de la actividad de la ECA con la presión arterial diastólica.

7.1.4. Actividad de la ECA y preeclampsia.

En la población de estudio se reportaron dos casos con preeclampsia, de los cuales para el primer caso solo se obtuvo la actividad de la ECA para el primer muestreo; para ambas gestantes, los niveles de actividad de ECA fueron altos, comparados con el valor promedio de las gestantes que no presentaron dicho desorden, así mismo, la presión arterial para ambos casos fue elevada al momento de presentarse la preeclampsia. En cuanto al polimorfismo I/D, el genotipo de ambas pacientes fue ID (Tabla 3.).

PREECLAMPSIA							
Muestra	Semana de Gestación	Edad (Años)	Muestreo 1 (U/L)	Muestreo 2 (U/L)	Presión Arterial (mmHg)	Presión Arterial en Preeclampsia	POLI I/D
61	35	22	110	*	90/60	180/100	ID
73	37	24	56	126	100/60	130/80	ID

Tabla 3. Variables de las gestantes con preeclampsia.

7.2. Polimorfismo inserción / deleción (I/D) del gen de la ECA

7.2.1. Frecuencias alélicas y genotípicas

En la población de estudio se encontraron 32 individuos para el genotipo DD, 60 individuos para el ID y 28 individuos para genotipo II (Tabla 4.).

La población de estudio se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg para el polimorfismo I/D al someterlo a la prueba de Chi cuadrado, donde $X^2 = 4,0$; valor que nos enmarca la población en el rango de aceptación.

Además, la distribución genética del polimorfismo I/D de nuestra población se asemejó a las encontradas en poblaciones blancas ^(9,18).

Distribución Genética		
Alelos	Nº de Alelos	Frecuencia alélica
I	116	48,33%
D	124	51,67%
Genotipos	Nº de Individuos	Frecuencia Genotípica
II	28	23,33%
ID	60	50,00%
DD	32	26,67%
TOTAL	120	100%

Tabla 4. Distribución alélica y genotípica de la población.

7.2.2. Polimorfismo I/D y la actividad de la enzima ECA

La actividad de la enzima se encuentra estrechamente relacionada con el genotipo del polimorfismo I/D, ya que al hacer el ANOVA arrojó una $p = 0.0003$, encontrando niveles altos para el genotipo DD en los dos muestreos, 88.6 U/L y 106.4 U/L respectivamente, así como niveles intermedios para el genotipo ID con 84.4 U/L y 90.2 U/L; y niveles bajos

para el genotipo II con 67.1 U/L y 68.1U/L correspondientes a los dos muestreos; se nota claramente la elevación en los niveles para el segundo periodo (Figura 8.)

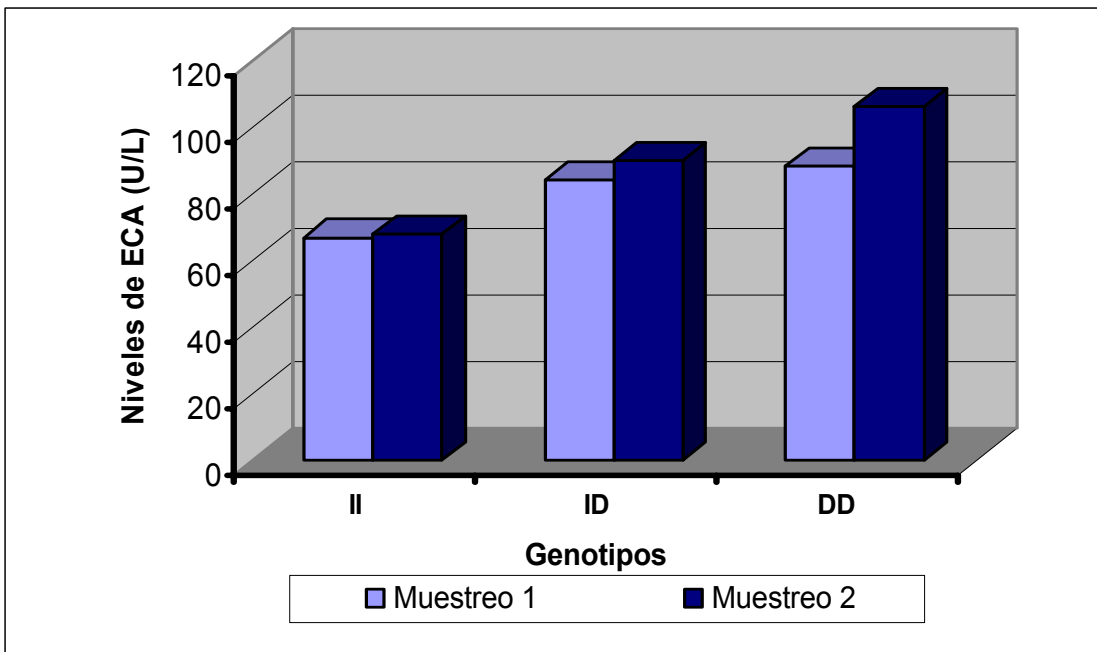


Figura 8. Relación del polimorfismo I/D y la actividad de la ECA en gestantes.

7.2.3. Polimorfismo I/D y presión arterial sistólica

El polimorfismo I/D del gen de la ECA no mostró una relación estadísticamente significativa con la presión arterial sistólica, aunque el valor de la prueba estadística fue casi aceptable ($p = 0.05$), igualmente, no se presentó relación entre la presión arterial diastólica y el polimorfismo I/D.

Los valores mas altos tanto para la presión sistólica como para la diastólica se presentaron en el genotipo II con 105 mmHg y 65 mmHg respectivamente. Los valores

mas bajos se dieron para el genotipo DD con 103 mmHg y 62 mmHg para ambas presiones. Para el genotipo ID se presentaron valores intermedios de 101 mmHg para sistólica y 63 mmHg para diastólica (Figura 9).

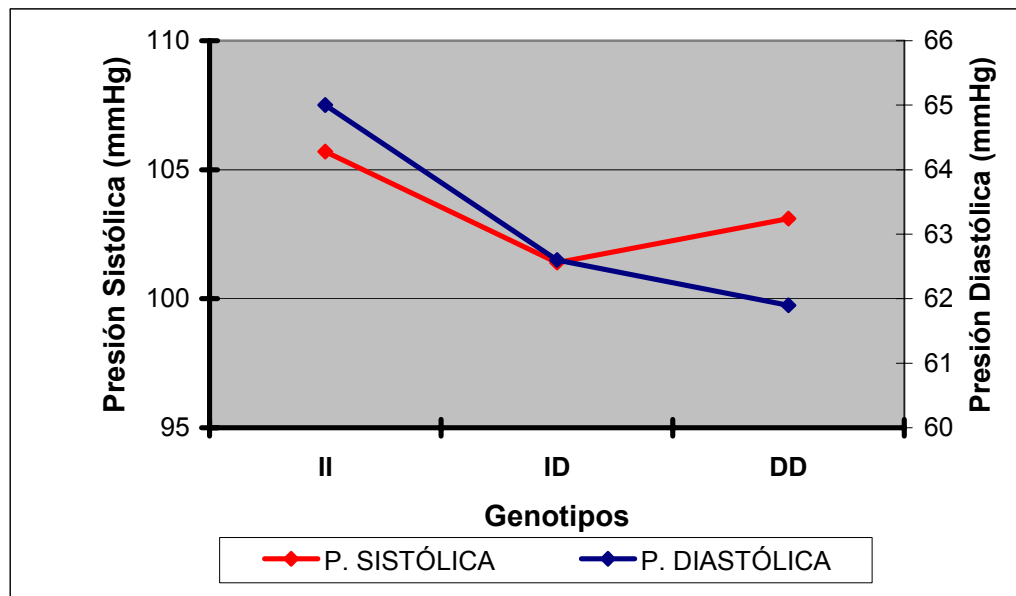


Figura 9. Relación entre el polimorfismo I/D y la presión arterial.

8. DISCUSION

Desde que se iniciaron los estudios sobre la actividad de la ECA, se ha tratado de relacionar ésta, con el desarrollo de varias enfermedades, de las cuales las más investigadas han sido la Sarcoidosis y la hipertensión arterial.

La literatura para la actividad de la ECA reporta que para los rangos de edad en los cuales se encuentra distribuida nuestra población de estudio se presentan niveles de enzima entre 16 y 68 U/L, pero estos valores son en poblaciones de mujeres normotensas no gestantes ⁽⁴⁰⁾; ya que no se encontraron reportes de actividad de la ECA en gestantes donde se haya utilizado la misma metodología que nosotros aplicamos.

Los niveles plasmáticos de ECA tienen una variabilidad intraindividual baja que contrasta con una interindividual elevada; el valor de referencia debe tener un rango lo suficientemente amplio, que cubra tal variabilidad. Además, se ha demostrado que presentan una concordancia intrafamiliar importante y que están determinados genéticamente.

Los estudios sobre los niveles de actividad han sido relacionados especialmente con variables tales como la edad y el sexo ^(8,9,45); encontrando una relación inversamente proporcional entre los niveles de la enzima y la edad de los sujetos de estudio; donde en la infancia y la adolescencia se encontraron valores relativamente altos que van disminuyendo a medida que el sujeto se acerca a su adultez.

En nuestros resultados, aunque se trabajó con gestantes menores de 18 años de edad (26%) y adultas, no se encontró ninguna relación estadísticamente significativa entre los niveles de enzima y la edad de las gestantes; sin embargo, se observó, una tendencia de comportamiento similar a lo reportado en algunos estudios ^(8,9,22,45) para los dos primeros rangos de edad (de 12 a 17 años y de 18 a 24 años); luego el comportamiento de la actividad, ya no se acopla a lo reportado, lo cual puede deberse a que en dichos estudios no se tiene en cuenta el estado de gestación ni el polimorfismo I/D, que tiene mucha influencia sobre los niveles de la enzima, siendo éste una variable independiente de la edad.

Por otra parte, para el rango de edad entre 31 y 36 años se registró un aumento en los niveles de la ECA; tal aumento puede deberse a dos situaciones: la primera es que en este rango de edad se genera una serie de cambios hormonales en la mujer ⁽²²⁾ y con esto se eleva el riesgo de complicaciones en el embarazo, teniendo en cuenta que se ha demostrado que la ECA es regulada por las hormonas luteinizante y progesterona que para esta edad ya se encuentran disminuidas. Y la segunda es porque la frecuencia del alelo D fue del 57% para este rango de edad, situación que generaría un aumento en los niveles de la enzima, como lo reportan la mayoría de los estudios y lo soportan nuestros resultados.

Contrario a lo anterior, para el siguiente rango de edad (>36 años) se presentó una disminución de los niveles de la enzima, donde según lo sugerido anteriormente deberían

seguir aumentando, pero este comportamiento se puede explicar si se tiene en cuenta que en este rango de edad las frecuencias alélicas encontradas cambiaron, con un 57% para el alelo I, el cual se relaciona con niveles de ECA bajos, dando así respuesta a las oscilaciones observadas para estas variables.

La presión arterial se mantuvo constante para todos los rangos de edad, aunque se entiende que la presión arterial tiende a aumentar con la edad debido a la pérdida elasticidad (aumento de resistencia) de las células cardiacas y al desgaste cardiaco en general ⁽³⁴⁾, en nuestros resultados no se mostró esta relación posiblemente a que la mayoría de las sujetos de estudio eran relativamente jóvenes y estos cambios de presión se notan después de una avanzada edad.

Contrario a lo reportado por Gurdol y colaboradores en el 2004 ⁽¹⁷⁾, quienes plantean que el embarazo como tal no tiene ninguna influencia sobre la actividad de la enzima. En nuestros resultados, los niveles de la ECA aumentaron significativamente a medida que aumentaba el periodo de gestación sugiriendo así, que la gestación si genera efectos sobre la actividad de la ECA en la población estudiada; no obstante, ésta relación puede deberse a los cambios fisiológicos generados por el propio embarazo.

Es muy probable que el aumento en los niveles de la actividad de la ECA que presentaron nuestros resultados, donde se determinó una media de actividad de la enzima para la población en general de 81.5 U/L y 89.5 U/L para el primer y segundo muestreo, respectivamente; sobre el rango de referencia para mujeres no gestantes reportados en la

literatura los cuales son de 12 – 68 U/L; se deba a que la población de estudio es mujeres gestantes, lo que corroboraría que el embarazo efectivamente genera un efecto sobre la actividad de la ECA. En la comprensión de estos resultados no se debe despreciar los resultados reportados por Hsueh y colaboradores ⁽²²⁾ en 1982, quienes encontraron elevaciones de los niveles tanto de renina como de angiotensina I en gestantes, situación que ofrece una mayor cantidad de sustrato para la ECA.

Al realizar la revisión literaria no se encontraron reportes de estudios sobre mujeres gestantes donde se utilice la metodología adoptada en este proyecto. Sin embargo se obtuvieron datos de estudios donde se determinó la actividad de la ECA en gestantes utilizando un método colorimétrico y ácido hipúrico como sustrato; en dichos estudios observaron resultados similares a los del presente trabajo, donde la actividad de la ECA era más elevada en gestantes con preeclampsia que en normotensas. Este es otro aporte del trabajo, ya que reporta resultados con metodologías actualizadas y mas específicas comparadas con los reportes encontrados.

Tanto teóricamente ^(3,34,36) como en los resultados obtenidos, la presión arterial registra un aumento normal durante el embarazo, generalmente dicho aumento es muy leve y por tanto no es significativo, se produce después de la semana 12 de gestación y se mantiene durante todo el embarazo. Tal aumento es debido al aumento del volumen de líquidos y electrolitos propios del embarazo.

En los estudios en donde se relaciona la presión arterial con los niveles de actividad de la enzima ^(9,13,41) se ha determinado que dichas variables presentan una relación estadística, directamente proporcional; lo que se debe a que a medida que la actividad de la enzima aumenta se produce más Ang II, sustancia que estimula en las células de los vasos sanguíneos una respuesta de constricción, aumentando de esta forma la resistencia al paso de la sangre. No obstante, en nuestros resultados solo se obtuvo valores estadísticamente significativos entre la actividad de la ECA y la presión arterial diastólica, Sin embargo, se observó que la presión arterial sistólica también aumentaba a medida que aumentaban los niveles de la enzima, siendo una relación no muy marcada;

Circunstancias afines se reportan en varios estudios sobre el tamaño de poblaciones similares, en las cuales para un estudio de 500 sujetos no se encontraron asociaciones entre la actividad de la ECA y la presión arterial ⁽¹²⁾, mientras que estudios con más de 1000 sujetos han demostrado asociación tanto del polimorfismo I/D como de la actividad de esta enzima ^(42,43).

La preeclampsia es un desorden hipertensivo con una alta tasa de morbilidad y mortalidad, que en los países subdesarrollados se considera como la complicación más común durante el embarazo. Se ha relacionado con problemas renales o hipertensivos previos, pero su etiología aun es muy confusa. Varios estudios de caso - control la han relacionado con el polimorfismo I/D del gen de la ECA, pero es poco lo que se conoce o se ha estudiado con relación al efecto que puede producir la actividad de esta enzima en su desarrollo.

En la población estudiada se encontraron dos casos de preeclampsia, en los cuales ambos casos presentaron valores elevados de actividad de la ECA (110U/L y 126U/L) comparados con el valor de la media poblacional (85.5 U/L), que en nuestro estudio se podría tomar este valor, como referencia para gestantes normotensas; siendo este resultado de gran importancia, ya que sugiere que los niveles de la ECA si tienen efecto sobre la presión sanguínea y que el aumento de dichos niveles en suero pueden ser una marcador predictivo de riesgo de preeclampsia, cumpliendo así con el objetivo del trabajo.

Según esto, y los resultados encontrados en otros estudios donde relacionan al genotipo DD con el riesgo de desarrollar preeclampsia ^(15,16,17,19), es probable que tanto una elevada actividad de la ECA como presentar el genotipo DD del polimorfismo I/D del gen de esta misma enzima, pueden ser marcadores de diagnóstico paraclínico en la determinación temprana de preeclampsia. Sin embargo, como todas las complicaciones médicas, este suceso no se puede interpretar aisladamente; se debe tener en cuenta el comportamiento de los parámetros diagnósticos que se tienen ya establecidos para este desorden (hipertensión, proteinuria y Edema).

El polimorfismo I/D del gen de la ECA, según la Ley de Hardy-Weinberg se encuentra en equilibrio, es decir, que la segregación hereditaria de dicho polimorfismo se transmite de acuerdo a las leyes de la herencia postuladas por Mendel y que la población presenta características de reproducción de poblaciones panmíticas, es decir, su apareamiento es al azar.

Al analizar la distribución tanto alélica como genotípica se llegó a la conclusión que nuestra población se asemeja más a la distribución genética para este polimorfismo reportada para poblaciones blancas ⁽⁹⁾, seguida de la población brasileña ⁽¹⁸⁾ pero bastante alejada de otra población mestiza, como lo es la población peruana ⁽⁶⁾. Esta semejanza con poblaciones blancas puede ser debida a que nuestra población por ser mestiza presenta caracteres heredados de varios grupos étnicos y posiblemente este polimorfismo fue heredado de antecesores de etnia blanca.

En este estudio, se encontró que el polimorfismo I/D tiene una alta relación con la actividad de la ECA, resultados similares fueron reportados por algunos estudios ^(7,8,9) entre los cuales se destaca el estudio realizado por Rigat y colaboradores en 1990 ⁽⁷⁾, en donde reportan niveles de actividad altos para el genotipo DD y niveles intermedios y bajos para el genotipo ID e II respectivamente; esto indica que la delección de este fragmento de ADN va a generar una sobre-expresión de la enzima ECA, por tanto un aumento en la hidrólisis del sustrato, que traería como consecuencia el aumento de la presión arterial.

Los resultados reportados en los estudios en los cuales se asocia la hipertensión inducida por el embarazo y el polimorfismo I/D del gen de la ECA son muy contradictorios, ya que algunos plantean que efectivamente se produce una relación significativa entre estas variables ^(15,17,41,43), mientras que otros rechazan tal afirmación ^(12,42,44).

Para nuestro estudio, los resultados obtenidos muestran que no se presenta una relación estadísticamente significativa entre el polimorfismo I/D y la hipertensión inducida por el embarazo; sin embargo, se observan dos situaciones particulares: primero la presión arterial tanto sistólica como diastólica arrojaron valores en la prueba estadística ($p = 0.057$) muy cercanos al valor de aceptación ($p < 0.05$), lo que sugiere que al igual que como con la relación entre la actividad de la ECA y la presión arterial sistólica, los valores de las pruebas no son representativos debido al tamaño reducido de la muestra. Por otra parte, los valores más altos tanto en presión arterial sistólica como diastólica se presentaron en el genotipo II; resultados similares fueron reportados por Seremak y colaboradores en el 2003 ⁽¹³⁾, quienes en un estudio con mujeres con hipertensión inducida por el embarazo y normotensas australianas encontraron una sobre-expresión del alelo I para los casos, es decir, los mayores niveles de presión tanto sistólica como diastólica fueron encontrados para el genotipo II. Estos resultados son totalmente contrarios a la mayoría de estudios que aceptan la relación entre el polimorfismo y la hipertensión inducida por el embarazo, pero presentando una presión arterial (sistólica y diastólica) elevada para el alelo D.

Para explicar esta situación hay que tener en cuenta varios aspectos como: en la mayoría de los estudios en donde se asocia el polimorfismo I/D con la hipertensión ^(12,42,44), se ha demostrado que el genotipo DD si presenta asociación con ésta, así mismo, que esta asociación es mas frecuente en hombres, como es el caso del estudio realizado por Christopher y colaboradores ⁽⁴¹⁾ en 1998, donde incluía una gran población de hombres y mujeres con hipertensión, encontrando una relación entre el genotipo DD y el aumento en

la presión arterial diastólica, pero esta relación solo era estadísticamente significativa para varones, sugiriendo así que el gen de la ECA tiene una expresión influenciada por el sexo.

Asimismo, para establecer este tipo de relación no se deben despreciar aspectos ambientales entre los que se destacan la dieta, el índice de masa corporal, diabetes, consumo de alcohol y cigarrillo entre otros.

Por otra parte, se han encontrado varias discrepancias en cuanto a los resultados dependiendo del grupo racial al cual pertenezca la población de estudio ^(18,42,43); ya que se ha demostrado que se presentan diferencias de expresión entre las diferentes etnias. Tal como lo expone Laura Bloem y colaboradores ⁽⁹⁾ en 1996, quienes encontraron que la asociación entre el polimorfismo I/D y la hipertensión era positiva para sujetos blancos pero no en sujetos negros. Esta situación resalta la importancia de nuestro estudio, ya que no se conoce mucho sobre poblaciones mestizas.

Se debe tener en cuenta que es muy probable que el polimorfismo I/D de la ECA, localizado en el intrón 16 del gen, no sea causante de enfermedad en sí misma. Por el contrario, puede confundirse o solaparse con otro gen candidato de la hipertensión que se encuentre cercano.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente y siguiendo una secuencia lógica que nos brindan nuestros resultados, tenemos que la actividad de la ECA presentó una relación significativa con la presión arterial diastólica; que el genotipo DD presentó los niveles más elevados de actividad; que somos genéticamente parecidos (en cuanto al polimorfismo) a

poblaciones blancas y la presión arterial con respecto al polimorfismo I/D presentó un valor de $p = 0.057$, que se acerca al valor de aceptación. En este orden de ideas, se podría sugerir que el polimorfismo I/D se relaciona con la presión arterial.

Por ultimo, los casos de preeclampsia encontrados en la población de estudio fueron ambos de genotipo ID, a pesar de que los estudios de asociación entre el Polimorfismo I/D y preeclampsia reportan que se exhibe tal relación con el genotipo DD ^(17,19,43). Esta diferencia se puede deber a que la muestra de los casos encontrados fue muy pequeña, con solo dos individuos y a que la población de estudio se encuentra en equilibrio. No obstante, encontrar dos casos de preeclampsia en una muestra de 120 gestantes, es una proporción muy alta, que denota una situación de alarma para la seccional de salud, ya que los resultados encontrados indican que nuestra población se encuentra muy por encima de los datos reportados para Colombia (1:4500) ⁽¹⁾, para la ciudad de Bogota en el 2001 con 4:1200 ⁽⁴⁶⁾.

No obstante, en un estudio realizado en el departamento de Caldas por León E ⁽⁴⁷⁾, en 1997, donde reporta una prevalencia de preeclampsia de 1 en 70, que es muy similar a la encontrada. Además, para el año 2000 en un estudio sobre preeclampsia y presión arterial diastólica ⁽²⁾, realizado por la Universidad del Valle, en la región occidental del país donde se incluyeron cinco departamentos (Caldas, Tolima, Quindio, Risaralda y Valle del Cauca), encontraron una prevalencia para la preeclampsia de 8 en 100; resultados que superan ampliamente los obtenidos en este trabajo, y que por su ubicación geográfica tienen más relación con nuestra población.

9. CONCLUSIONES

Se determinó que la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y la presión arterial, no presentaron relaciones estadísticamente significativas con respecto a la edad de las gestantes.

La actividad de la enzima presentó una relación directamente proporcional y estadísticamente significativa con respecto al tiempo de gestación.

La presión arterial tanto sistólica como diastólica no exhibió cambios significativos con relación a los dos tiempos de gestación muestreados.

Se estableció que no existen relaciones estadísticamente significativas entre la presión arterial sistólica y los niveles de la ECA.

La actividad de la enzima ECA presentó una asociación significativa con respecto a la presión diastólica, siendo ésta más notoria para el segundo periodo de medición.

La proporción de preeclampsia en la población de estudio fue de 2:120, superando los valores reportados para el país en el 2000.

Según la Ley de Hardy-Weinberg se determinó que nuestra población de estudio se encuentra en equilibrio poblacional con respecto al polimorfismo I/D del gen de la ECA.

La distribución de frecuencias tanto alélicas como genotípicas de esta población se asemeja a la reportada para poblaciones blancas.

La relación de los diferentes genotipos con la actividad de la ECA fue altamente significativa, demostrando así que existe una asociación entre el polimorfismo ID y la actividad de dicha enzima.

Similar a lo reportado en la literatura, el genotipo DD es el que presenta valores de actividad enzimática más elevados.

No se encontraron asociaciones entre los genotipos del polimorfismo I/D y la presión arterial (sistólica y diastólica).

BIBLIOGRAFIA

1. Jimenez I. E. Londoño N. Perfil Epidemiológico, Quindío año 2000. Instituto seccional de salud del Quindío.
2. Herrera J, Moreno C. Comportamiento gráfico de la presión arterial diastólica durante el embarazo en gestantes con riesgo de preeclampsia. Colombia Médica. 2000. Vol. 31 N° 8.
3. Cunningham M, Gant L, Gilstrap H, Clark W. Hypertensive disorders in pregnancy, in *Obstetrics*. edition. 20. 1997; 693-744.
4. Zee R., Lou Y., Griffiths L., Morris BJ. Association of a polymorphism of the angiotensin I Converting gen with essential hypertension. *Biochem Biophys res. Commun* 1992; 181:9-15.
5. Giner V, Poch E, Bragulat E, Oriola J, González D, Coca A, de la Sierra A. Renin-angiotensin system gene polymorphisms and salt sensitivity in essential hypertension. *Hypertension* 2000; 35:512.
6. Langer B, Grima M, Coquard C, Bader A, Schlacder G. Plasma active renin, angiotensina I, and angiotensina II during pregnancy and in preeclampsia. *Obstetrics and Gynecology*. 1998. Vol 91 N° 2 (196-202).
7. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, et al. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*. 1990. 86:1343-46.
8. Li J, Hu HY, Zhao YN. Serum angiotensin-converting enzyme activity in pregnancy-induced hypertension. *Gynecol Obstet Invest*. 1992; 33(3):138-41.
9. Bloem L, Manatunga A, Pratt J. Racial difference in the relationship of an angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism to serum angiotensin I-converting enzyme activity. *Hypertension*. 1996;27:62-66.
10. Morgan L, Foster F, Hayman R, Crawshaw S, Baker P, Broughton P, Kalsheker N. Angiotensin-converting enzyme insertion-deletion polymorphism in normotensive and preeclamptic pregnancies. *J Hypertens*. 1999 Jun;17(6):765-8.
11. Zhou N, Yu P, Chen J, Huang H, Jiang S.. Detection of insertion/deletion polymorphism of angiotensin converting enzyme gene in preeclampsia. *Zhonghua*. 1999 Feb 10; 16(1):29-31.
12. Natogowska K, Ucka B, Zychma M, Szczechowska E, Michalski B, Kniayewski B. Angiotensin II type 1 receptor gene A1166C polymorphism is associated with the increased risk of pregnancy induced hypertension. *Med Sci Monit*, 2000; 6(3): 523-529.
13. Seremak M, Drews K, Chamara E, Mrozikiewicz A. Polymorphism of gene angiotensin converting enzyme in pregnancy induced hipertensión. *Ginekol Pol*. 2001 Aug; 72(8):605-10.
14. Heiskanen J, Pirskanen M, Hiltunen M, Mannermaa A, Punnonen K and Heinonen S. Insertion-deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is associated with obstetric cholestasis but not with preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Vol 185, Issue 3 , September 2001, Pages 600-603.
15. Zhu M, Xia Y, Cheng W. Study on a deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene in pregnancy induced hipertensión. *Zhonghua* . 2001 Mar; 33(2):83-5.

16. Mello G, Parretti E, Gensini F, Sticchi E, Mecacci F, Scarselli G, Genuardi M, Abate R, Fatini C. Maternal fetal flow, negative events, and preeclampsia role of ACE I/D polymorphism. *Hypertension* April 2002.Vol 12(4)
17. Gurdol F, Isbilen E, Yilmaz H, Isbir T, Dirican A. The association between preeclampsia and angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism. *Clin Chim Acta.* 2004 Mar;34 (4). 127-31.
18. Galao A, de Souza L, da Costa B, Scheibe R, de Figueiredo C. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism in preeclampsia and normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2004 Sep; 191(3):821-4.
19. Hyunah C, Kang J, Hong S, Seung S, Chang, Hyunho S, Jeong B. Association of angiotensin converting enzyme and angiotensinogen gene polymorphisms with preeclampsia. *J Korean Med Sci* 2004; 19:253-7.
20. Van den Eijnden, Saris J, de Bruin R, de Wit E, Sluiter W, Reudelhuber T, Schalekamp M, Derkx F, Danser A. Prorenin accumulation and activation in human endothelial cells. Importance of mannose 6-phosphate receptors. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*; 2001. 21:911-16
21. Gomez Ponce R, Martínez R, Coviello A, De Vito E. Prorenin concentration in the hypertensive disorders in pregnancy. *Hypertens Pregnancy*; 2001. 20:157-168.
22. Hsueh W, Luetscher J, Carlson E, Grislis F, Frazee E, McHargue A.. Changes in active and inactive renin throughout pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*; 1982. 54:1010-1016.
23. Katz SA, Malvin RI, Renin secretion, control, pathways and glycosylation. In: Nicholls M.G., Robertson J.I.S. (Eds.), *The Renin angiotensin system*, edited by. London: Gower Medical Publishing. 1993.
24. Boucher R, Kurihara H, Grise C, Genest J. Measurement of plasma angiotensin I converting enzyme activity. *Circ Res* 1970; 26, 27 : 183.
25. Deddish PA, Wang L, Jackman HL, Michel B, Wang J, Skidgel RA, Erdös EG. Single domain angiotensin I converting enzyme (kininase II): characteristics and properties. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996. 279:1582–89.
26. Lieberman J. Elevation of serum angiotensin converting enzyme (ACE) levels in sarcoidosis. *Am J Med* 1975; 59: 365 – 72.
27. Ueda S, Elliot HL, Morton JJ. Enhanced pressor response to angiotensin I in normotensive men with the deletion genotype (DD) for angiotensin-converting enzyme. *Hypertension.* 1995;25:1266–1269.
28. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Richard 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.* 1992;359:641-644.
29. Feng Y, Niu T, Xu X, Chen C, Li Q, Qian R, Wang G, Xu X. 2002. Insertion/deletion polymorphism of the ACE gene is associated with type 2 diabetes. *Diabetes Jun*; 51(6):1986-8.
30. Laine J . Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism modulates the human in vivo metabolism of bradykinin. *Circulation.* 2000. 102:829-32.
31. McLaughlin KJ, Harden PN, Ueda S, Boulton-Jones J, Connell J, Jardine AG. The role of genetic polymorphisms of angiotensin converting enzyme in the progression of renal diseases *Hypertension.* 1996; 28: 912-915.

32. Raynol M, Bristow M, Bush E, Abraham W, Lowes B, Zisman L, Taft C, Perryman B. Angiotensin converting enzyme DD genotype in patients with ischaemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Lancet*. 1993;342: 1073-75.
33. Bedir A, Arik N, Adam B, Kilinc K, Gumust and Gruner E. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and activity in Turkish patients with essential hypertension. *American journal of hypertension* 1999;12: 1038-1043.
34. Burrow GM. Complicaciones médicas durante el embarazo. 4ª ed, México, McGraw-Hill panamericana: 1996: 1-25.
35. Wilson MI, Goodwin TM, Pan VI. Molecular epidemiology of preeclampsia. *Obstet and Gynecol Survey* 2003; 58(1):39-66.
36. La presión arterial. American Heart Association. Learn and live. Marzo 16 de 2005. www.americanheart.org
37. Dekker GA, Sibai BM. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: Current concepts. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 1359-75.
38. American Collage of Obstetricians and Gynecologicistic. Guidelines for perinatal. 3º Edición. Washington. 1992.
39. Ronca Testoni S. 1983. Direct spectrophotometric assay for angiotensin converting enzyme in serum. *Clim Chem* 1983.Vol 29. Pag 1093 – 1096.
40. Pagana, Kathleen Deska. *Mosby's Manual of Diagnostic and Laboratory Tests*. Nivels of angiotensin converting enzyme in serum. St. Louis: Mosby, Inc., 1998.
41. O'Donnell C, Lindpaintner K, Larson M, Rao V, Ordovas J, Schaefer E, Myers R, Levy D, Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the framingham heart study. *Circulation*. 1998; 97:1766-1772.
42. Nakamura Y, Tsujita Y, Nozaki A, Amamoto K, Kadowaki T, kita Y, Okamura T, Naoharu I, Kinoshita M, and Ueshima H. Polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and blood pressure in a japanese general population. *Hypertens*. 2002. vol. 25, no. 6.
43. Agachan B, Isbir T, Yilmaz H and Akoğ E. Angiotensin converting enzyme I/D, angiotensinógeno T174M-M235T and angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphisms in Turkish hypertensive patients. *Experimental and Molecular Medicine*, 2003.Vol. 35, No. 6, 545-549.
44. Kiema T, Kauma H, Rantala A, Lilja M, Reunanen A, Kesaniemi Y, Savolainen M. Variation at the angiotensin converting enzyme gene and angiotensinogen gene loci in relation to blood pressure. *Hypertension*. 1996; 28:1070-1075.
45. Cambien F, Alhenc-Gelas F, Herbeth B, Andre JL, Rokotovao R, Gonzales MF, Allegrini J, Bloch C. Familial resemblance of plasma angiotensin I-converting enzyme level: the Nancy study. *J Hum Genet*. 1988;43:774–780.
46. Martinez F, Zapata S, Quintero S. Síndrome de HELLP: descripción de 100 casos en Bogota – Colombia. *Rev Colomb Obstect Ginecol*. 2001. Vol 52 N° 4.
47. León Eduardo. Morbimortalidad materna en el hospital de caldas, Manizales. *Colombia Medica*. 1997. Vol 28 (77-84).

ANEXO 1.

UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE MEDICINA
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

INFLUENCIA DE LA VARIACIÓN GENÉTICA DEL ANGIOTENSINÓGENO Y EL GEN DE
LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA DURANTE EL EMBARAZO Y EL
DESARROLLO DE PREECLAMPSIA

INFORME DE CONSENTIMIENTO (Paciente)

Yo, _____ identificado con la
cédula de ciudadanía N° _____ de _____ manifiesto que he
recibido la siguiente información:

La Universidad del Quindío Facultad de Ciencias de la Salud, Centro de Investigaciones
Biomédicas, pretenden determinar la relación entre los componentes genéticos y
bioquímicos del sistema renina –angiotensina durante el embarazo en las pacientes que
acudan a la consulta en el Centro de Salud La Milagrosa.

Se me ha informado que el presente estudio permitirá:

- ◆ Determinar variaciones genéticas del sistema renina – angiotensina
- ◆ Medir la progresión de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina
- ◆ Establecer si alguno de los parámetros anteriores tiene influencia en el desarrollo
de la hipertensión del embarazo o la Preeclampsia y puede ser usado como
predicador de riesgo.

Por lo tanto mi participación consiste en suministrar la información solicitada, proporcionar
2 muestras de sangre (una en la primera mitad del embarazo y la otra en la segunda
mitad), y en ellas se determinarán los parámetros mencionados. Igualmente se me
informó que el estudio no tendrá costo alguno para mí y que no se mencionará mi nombre
en ninguna publicación generada de este estudio.

También se me informó que mi negativa a participar no afectará la relación médico
paciente. Una vez clara la información anterior acepto participar en el. También se me
pidió consentimiento para usar mis muestras en estudios futuros, siempre y cuando no
afecten mi individualidad.

Nombre de la paciente (letra imprenta) _____

Firma _____ CC _____

Testigo 1 _____ CC _____

ANEXO 2.

UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE MEDICINA
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

INFLUENCIA DE LA VARIACIÓN GENÉTICA DEL ANGIOTENSINÓGENO Y EL GEN DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA DURANTE EL EMBARAZO Y EL DESARROLLO DE PREECLAMPSIA

Encuesta N° _____ Fecha _____ (dd/mm/aa) Historia Clínica N° _____
 Nombre _____ Edad _____
 Lugar de residencia _____ TI _____
 Extracto _____ Institución de Salud _____
 Escolaridad: primaria _____ secundaria _____ universitaria _____
 Ocupación _____
 Raza negra _____ blanca _____ mulata _____ indígena _____
 Antecedentes Gineco – Obstétrico
 FUM _____ (dd/mm/aa) FPP _____ (dd/mm/aa)
 Edad gestacional (semanas) _____ # gestaciones anteriores _____
 # partos naturales _____ abortos _____ mortinatos _____ Embarazos
 múltiples _____ peso _____ talla _____

Para uso exclusivo de los investigadores

Control de visitas

N° visita	Presión Sanguínea		Sangre		Orina		Edema	
	Sistólica	Diastólica	Si	No	Si	No	Si	No
1								
2								
3								

Trimestre	1	2	3
Proteínas			
ECA			
Polimorfismo AGT			
Polimorfismo ECA			

ANEXO 3.

METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ECA.

Procedimiento:

Muestra: En un tubo de ensayo:

Se adicionaron 450 μ l de agua destilada.

Se agregó 50 μ l del suero de la muestra.

Se adicionaron 500 μ l de Buffer (0.8 mM FAPGG, 400mM NaCl, 50 mM de HEPES, pH 8.25).

Se incubó a 37 °C durante 20 minutos

Luego se disminuyó la temperatura a 24°C, para parar la reacción enzimática.

Por ultimo se midió la absorbancia a 345nm utilizando un espectrofotómetro Milton Roy Genesis 5.

Blanco: En un tubo de ensayo:

Se adicionaron 450 μ l de agua destilada.

Se agregó 50 μ l del suero de la muestra.

Se agregó 5 μ l de EDTA 3.5 mM, como inhibidor de la actividad de la enzima, por ser un quelante que sustrae el átomo de Zinc.

Se procedió con las mismas condiciones que con las muestras.

Las muestras se procesarán por triplicado.

La actividad de la enzima se calculará mediante la siguiente ecuación:

$(\Delta A \times V_t \times 1000/t) / (0.5 \times V_s)$, donde ΔA es la diferencia de absorbancia entre el buffer con las muestras y el buffer con el blanco, V_t el volumen final del ensayo (1 ml), 1000 convierte Unidades /ml en Unidades /litro, t es el tiempo de incubación (20 minutos), 0.5 es la absorbancia de la hidrólisis de 1mM de FAPGG bajo condiciones del ensayo, y V_s es el volumen de la muestra de suero (0.05 ml).

Una unidad (1U) de ECA es la cantidad de la enzima que convierte 1 μmol de FAPGG en FAP y Gly – Gly por minuto a 37°C.

ANEXO 4.

METODOLOGIA DE EXTRACCIÓN DE ADN.

Kit Wizard Genomic DNA Purification Kit. (Catalogo N° A 1120 Promega).

Materiales.

Tubos de micro centrifuga de 1.5 ml estériles Eppendorf.

Baño Maria

Isopropanol T° Ambiente.

Etanol al 70% a T° Ambiente.

Preparación.

Tomar 100 μ L de la muestra de sangre total y adicionar 300 μ L de la solución de lisis celular.

Mezcle por inversión, cinco a seis veces.

Incube la muestra durante 10 minutos a T° ambiente (Invierta 2 a 3 veces mientras la incubación). Hasta lisis de las células rojas. Centrifugue a 13000 rpm durante 20 minutos.

Remueva y descarte el sobrenadante cuidando de no alterar el pellet blanco visible.

Aproximadamente entre 10 y 20 μ L quedaran en el tubo de 1.5 ml. Si la muestra a sido congelada repita los pasos 1 al 4 hasta que el pellet este blanco.

Aplique vortex vigorosamente hasta que las células blancas se resuspendan de 10 15 segundos.

Adicione 100 μ L de la solución de lisis nuclear al tubo que contiene las células resuspendidas. Mezcle por pipeteo (5 a 6 veces). La solución podría tornarse muy

viscosa. Si observa un exceso de células después de la mezcla, incube la solución a 37°C hasta que estas desaparezcan, si las células aun son visibles luego de una hora de incubación, adicione nuevamente 33.3 μ L de la solución de lisis nuclear. Y repita la incubación.

Adicione 33.0 μ L de la solución de precipitación proteica al lisado nuclear y aplique vortex vigorosamente durante 10 a 20 segundos.

Centrifugue a 13000 rpm durante 3 minutos un pellet café debe ser visible.

Opcional. Nota: si no observa el pellet café enfríe la muestra a T° ambiente por lo menos durante 5 minutos o coloque la en hielo durante 5 minutos. Aplique vortex durante 20 segundos y centrifugue a 13000 rpm por 3 minutos.

Transfiera el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 ml que contienen 100 μ L de Isopropanol a T° ambiente.

Mezcle la solución por inversión hasta que observe filamentos de ADN.

Centrifugue a 13000 rpm durante 1 minuto, observe el pellet blanco.

Decante el sobrenadante y adicione 100 μ L de Etanol al 70% a T° ambiente.

Mezcle por inversión varias veces para lavar el pellet de ADN. Centrifugue a 13000 rpm por 1 minuto.

Remueva cuidadosamente el etanol con la micropipeta y coloque el tubo boca abajo sobre un papel toalla, hasta que el etanol este totalmente seco.

Adicione 50 μ L de la solución de rehidratación. Incube a 65° C por 20 minutos.

Almacene el ADN entre 2 y 8° C.

ANEXO 5.

METODOLOGIA PARA PCR DEL POLIMORFISMO I/D

Se tomó un muestra ADN genómico previamente aislado. Cantidad 100- 200 ng.

Mezcla de reacción para PCR.

Un volumen total de 25 μ l conteniendo 0.5 mM de dATP, dGTP, dCTP y dTTP (dNTP`s), 2.5 mM MgCl₂, 1 concentración de 1X buffer libre de Mg, 10 pmol de cada uno de los siguientes oligonucleotidos: (ACE1) 5- CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3 (ACE2) 5- GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTCAGA T-3). y 2.0 U Taq DNA polimerasa (GIBCO USA),

Amplificación del ADN en termociclador : MJ Research PTC-100

Desnaturalización inicial T= 94°C durante 1 minuto

Seguida por 31 ciclos, con el siguiente programa:

Desnaturalización	T= 94°C durante 1 minuto
Alineamiento	T= 63°C durante 1 minuto
Extensión	T= 72°C durante 2 minuto
Y una extensión final	T=72°C durante 10 minutos