

**UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA**

**Influencia de los factores clásicos de riesgo vascular y factores genéticos sobre la aparición de complicaciones cardiovasculares postransplante renal**

**Autor: Linares Albertos, José Domingo**

**Directores: Domingo Hernández Marrero  
y Eduardo Salido Ruíz**

**Departamento de Medicina Interna, Dermatología y Psiquiatría**

**DON DOMINGO HERNÁNDEZ MARRERO, DOCTOR EN  
MEDICINA Y CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA.**

**CERTIFICA QUE:**

Los trabajos de investigación realizados por **D. José Domingo Linares Albertos**, Licenciado en Biología, relativos a:

***“Influencia de los factores clásicos de riesgo vascular y factores genéticos sobre la aparición de complicaciones cardiovasculares postrasplante renal”***

han sido llevados a cabo bajo su dirección en el Laboratorio de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Canarias y el Departamento de Medicina Interna, Dermatología y Psiquiatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de La Laguna.

Así hace constar que, una vez revisada la presente Memoria, la encuentra apta para su defensa ante tribunal.

La Laguna, a 16 de Mayo de 2002.

**Fdo. Dr. D. Domingo Hernández Marrero.**

**DON EDUARDO SALIDO RUÍZ, PROFESOR TITULAR DEL  
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DE LA  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA.**

**CERTIFICA QUE:**

Los trabajos de investigación realizados por **D. José Domingo Linares Albertos**, Licenciado en Biología, relativos a:

***“Influencia de los factores clásicos de riesgo vascular y factores genéticos sobre la aparición de complicaciones cardiovasculares postrasplante renal”***

han sido llevados a cabo bajo su dirección en el Laboratorio de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Canarias y el Departamento de Medicina Interna, Dermatología y Psiquiatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de La Laguna.

Así hace constar que, una vez revisada la presente Memoria, la encuentra apta para su defensa ante tribunal.

La Laguna, a 16 de Mayo de 2002.

**Fdo. Prof. Dr. D. Eduardo Salido Ruíz.**

**DON ARMANDO TORRES RAMÍREZ, CATEDRÁTICO DEL  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA, DERMATOLOGÍA Y  
PSIQUIATRÍA DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA.**

**CERTIFICA QUE:**

Los trabajos de investigación realizados por **D. José Domingo Linares Albertos**, Licenciado en Biología, relativos a:

***“Influencia de los factores clásicos de riesgo vascular y factores genéticos sobre la aparición de complicaciones cardiovasculares postrasplante renal”***

han sido llevados a cabo bajo su dirección en el Laboratorio de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Canarias y el Departamento de Medicina Interna, Dermatología y Psiquiatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de La Laguna.

Así hace constar que, una vez revisada la presente Memoria, la encuentra apta para su defensa ante tribunal.

La Laguna, a 16 de Mayo de 2002.

**Fdo. Prof. Dr. D. Armando Torres Ramírez.**

A mis padres, a los que debo todo, por vuestro amor, dedicación, honradez y trabajo en la vida.

A mis tíos, Ricardo y Carmita, por hacerme sentir un hijo más para vosotros.

## **AGRADECIMIENTOS**

En un trabajo de este tipo, se dan una serie de circunstancias que serían difíciles de afrontar sin la colaboración y el apoyo de otras personas. De esta forma, me siento en la obligación de dirigir mis agradecimientos:

Al Dr. D. Domingo Hernández Marrero, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo, por haberlo dirigido y ayudarme en su realización, y ceder parte de su tiempo hasta la finalización del mismo.

Al Prof. Dr. D. Eduardo Salido Ruíz, por acogerme en el laboratorio de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Canarias, por compartir sus apasionantes conocimientos de Biología Molecular, por enseñar y dirigirme pacientemente en las tareas realizadas en el laboratorio, sin las cuales este trabajo no hubiese visto la luz.

Al Prof. Dr. D. Armando Torres Ramírez, por su asesoramiento, su experiencia y sus cualidades de investigador aplicadas al presente trabajo.

A todos mis compañeros del Laboratorio de la Unidad de Investigación, porque me acogieron abiertamente y fueron pacientes conmigo siempre que hizo falta, y porque de cada uno aprendí algo necesario para este proyecto. En especial a Ysamar, por su supervisión en las técnicas de laboratorio; a Alexis, por sus consejos en los inicios del trabajo; a Asun, por su amistad y apoyo; a Nuria, por su sencillez y amistad, y por su acompañamiento durante el desarrollo de la mayoría del estudio.

A Carmen Montesinos, por su disponibilidad, cordialidad y eficacia, y por las veces que requerí de su preciado tiempo. A Lali, ahora auxiliar administrativo del Servicio de Nefrología del HUC, por las veces que me atendió amablemente en la recopilación de datos.

También a todo el personal del Servicio de Nefrología del Hospital Universitario de Canarias, desde el primer auxiliar clínico hasta el último médico, por acogerme como un integrante más. En particular a la Dra. Lourdes Pérez, por su colaboración en el seguimiento a los pacientes, por su simpatía, agrado y condición humana, que la hacen ser una persona especial. Así mismo, al Dr. Aurelio Rodríguez, por su inestimable, amable y desinteresada colaboración, y por soportar que le “invadiera” su *consulta* decenas de veces. A Antonio Rodríguez, a Luzma, Pilar y Juanma, por su colaboración en la toma de las muestras de sangre.

A mis hermanos Carlos, Carmen y Ana, por su comprensión en los días malos y estar siempre ahí.

A cada uno de los centenares de pacientes trasplantados de riñón, que han aportado su granito de arena para que este trabajo pudiera llevarse a cabo; y a todos aquellos pacientes en diálisis, que con esperanza esperan el gesto solidario de otro ser humano que, llegado su viaje hacia un *nuevo amanecer*, no olvidan antes donar parte de su ser para dar vida a otro *hermano*.

A todos ellos, mi más sincero agradecimiento.

**Universidad de La Laguna**

**Facultad de Medicina**

***“INFLUENCIA DE LOS FACTORES CLÁSICOS DE RIESGO  
VASCULAR Y FACTORES GENÉTICOS SOBRE LA APARICIÓN DE  
COMPLICACIONES CARDIOVASCULARES POSTRASPLANTE  
RENAL.”***

***José Domingo Linares Albertos***

***2002***



---

## ***ÍNDICE***

|  |          |
|--|----------|
| <b>- ABREVIATURAS.....</b>   | <b>7</b> |
| <b>- INTRODUCCIÓN.....</b>   | <b>9</b> |
| 1. Factores que contribuyen a esta elevada morbi-mortalidad CV.....  | 11       |
| 1.1. Alteraciones cardiovasculares en diálisis.....  | 12       |
| 1.2. Factores inherentes al trasplante renal.....  | 12       |
| 1.3. Factores clásicos de riesgo cardiovascular.....   | 14       |
| a) Diabetes mellitus e hiperlipemia.....   | 14       |
| b) Hipertensión arterial.....  | 15       |
| 1) Tratamiento inmunosupresor.....   | 15       |
| 2) Enfermedad parenquimatosa del injerto.....  | 15       |
| 3) Enfermedad vascular del injerto.....  | 16       |
| 4) Persistencia de secreción de renina por riñones<br>nativos.....   | 16       |
| 5) HTA esencial recurrente.....  | 17       |
| 6) Otra causa de HTA secundaria.....   | 17       |
| c) Tabaco.....   | 17       |
| d) Otros factores de riesgo.....   | 17       |
| 1.4. Factores genéticos.....   | 17       |
| 1.5. Métodos de estudio en el análisis de la influencia de la genética<br>en la enfermedad cardiovascular (ECV)..... | 19       |
| 1.5.1. Ventajas e inconvenientes de los estudios de asociación   | 19       |
| Posibles ventajas.....   | 20       |

|  |    |
|--|----|
| Posibles desventajas.....  | 20 |
| 1.6. Participación del sistema renina-angiotensina en la ECV.....                                | 21 |
| 1.6.1. Vías de síntesis de la angiotensina II. Cascada de<br>activación del SRA.....             | 22 |
| 1.6.2. Asociaciones fisiológicas del SRA.....  | 27 |
| 1.6.2.1. Estructura de los receptores.....   | 27 |
| 1.6.2.2. Distribución de los receptores.....   | 28 |
| 1.6.2.3. Transducción de la señal celular.....   | 29 |
| 1.7. Acciones mediadas a través de los receptores.....   | 31 |
| 1.7.1. Renales.....  | 31 |
| 1.7.2. Vasculares.....   | 32 |
| 1.7.3. Cardíacas.....  | 36 |
| 1.8. Bloqueo farmacológico del SRA.....  | 37 |
| 1.8.1. Acciones farmacológicas de los IECA y los antagonistas<br>del receptor AT1R.....          | 38 |
| 1.8.2. Influencia genética en la respuesta terapéutica a los IECA                                | 40 |
| 1.9. Genética del SRA.....   | 40 |
| 2. Descripción de los principales polimorfismos genéticos del SRA implicados<br>en las ECVs..... | 41 |
| 2.1. Polimorfismo del gen de la enzima de conversión de angiotensina<br>(ECA).....               | 41 |
| 2.1.1. Estudios de asociación.....   | 43 |
| 2.2. Polimorfismo del gen del receptor de angiotensina II de tipo 1<br>(AT1R).....               | 45 |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.2.1. Estudios de asociación.....  | 47        |
| 2.2.2. Efectos sinérgicos con otros alelos desfavorables<br>del SRA.....        | 48        |
| 2.3. Polimorfismo del gen del angiotensinógeno.....                             | 48        |
| 2.3.1. Estudios de asociación a diversas enfermedades.....                      | 51        |
| 2.3.2. Efectos sinérgicos con otros polimorfismos desfavorables<br>del SRA..... | 52        |
| 2.4. Polimorfismo del gen de la quimasa cardíaca.....                           | 52        |
| 3. Otros polimorfismos asociados a ECVs.....                                    | 53        |
| 3.1. Polimorfismo del gen $\beta$ -fibrinógeno.....                             | 53        |
| 3.2. Polimorfismo del gen de la glicoproteína plaquetaria IIIa.....             | 55        |
| 3.3. Polimorfismo del gen de la apolipoproteína E.....                          | 56        |
| 3.4. Polimorfismo del gen de la metilen-tetrahidrofolato reductasa.....         | 61        |
| 3.5. Polimorfismo del gen del inhibidor del activador del plasminógeno          | 62        |
| <b>- JUSTIFICACIÓN.....</b>   | <b>65</b> |
| <b>- OBJETIVOS.....</b>   | <b>67</b> |
| <b>- PACIENTES Y MÉTODOS.....</b>   | <b>69</b> |
| a) Selección de los pacientes.....  | 70        |
| b) Tratamiento inmunosupresor.....  | 70        |
| c) Características y datos clínicos analizados.....                             | 71        |
| c.1) Datos demográficos y clínicos.....   | 71        |
| c.2) Factores de riesgo cardiovascular pretrasplante.....                       | 72        |
| c.3) Estado cardiovascular pretrasplante.....                                   | 73        |
| d) Evaluación postrasplante.....  | 73        |

|  |     |
|--|-----|
| d.2) Evaluación de eventos cardiovasculares postrasplante y definición<br>de los mismos..... | 73  |
| d.3) Parámetros bioquímicos.....   | 75  |
| e) Determinaciones bioquímicas.....  | 75  |
| f) Diseño del estudio.....   | 76  |
| g) Definición de nefropatía crónica.....   | 76  |
| h) Estudios ecocardiográficos.....   | 77  |
| - TÉCNICAS MOLECULARES.....  | 77  |
| A) Extracción de DNA de sangre periférica.....   | 77  |
| B) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....  | 79  |
| Reactivos.....   | 82  |
| Protocolo de PCR.....  | 87  |
| Digestión con enzimas de restricción.....  | 89  |
| C) Electroforesis.....   | 92  |
| C.1) En gel de poliacrilamida.....   | 94  |
| C.2) En gel de agarosa.....  | 104 |
| - MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....  | 108 |
| - <b>RESULTADOS</b> .....  | 109 |
| - <b>DISCUSIÓN</b> .....   | 153 |
| - <b>CONCLUSIONES</b> .....  | 167 |
| - <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....  | 170 |

## ABREVIATURAS

**A:** adenina

**aa:** aminoácido/-s

**ACV:** accidente cerebrovascular

**AGT:** angiotensinógeno

**Ang I:** angiotensina I

**Ang II:** angiotensina II

**Ang III:** angiotensina III

**Ang IV:** angiotensina IV

**apo E:** apolipoproteína E

**AT1R:** receptor de Ang II de tipo 1

**AT2R:** receptor de Ang II de tipo 2

**C:** citosina

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**cDNA:** DNA complementario

**CV:** cardiovascular

**EAC:** enfermedad arterial coronaria

**ECA:** enzima de conversión de angiotensina

**ECC:** enfermedad cardíaca coronaria

**ECV:** enfermedad cardiovascular

**G:** guanina

**GPIIIa/IIb:** glicoproteína IIIa/IIb plaquetaria

**Heys:** homocisteína

**HDL:** lipoproteína de alta densidad

**HVI:** hipertrofia ventricular izquierda

**HTA:** hipertensión arterial

**IAM:** infarto agudo de miocardio

**IECA:** inhibidor de la enzima de conversión de angiotensina

**IM:** infarto de miocardio

**kDa:** kilodaltons

**LDL:** lipoproteína de baja densidad

**MTHFR:** metil tetrahidrofolato reductasa

**PAI-1:** inhibidor del activador del plasminógeno

**RNA<sub>m</sub>:** ácido ribonucleico mensajero o RNA mensajero

**SRA:** sistema renina-angiotensina

**T:** timina

**VLDL:** lipoproteína de muy baja densidad

---

# ***INTRODUCCIÓN***



## **INFLUENCIA DE LOS FACTORES CLÁSICOS DE RIESGO VASCULAR Y FACTORES GENÉTICOS SOBRE LA APARICIÓN DE COMPLICACIONES CARDIOVASCULARES POSTRASPLANTE RENAL.**

### **INTRODUCCIÓN**

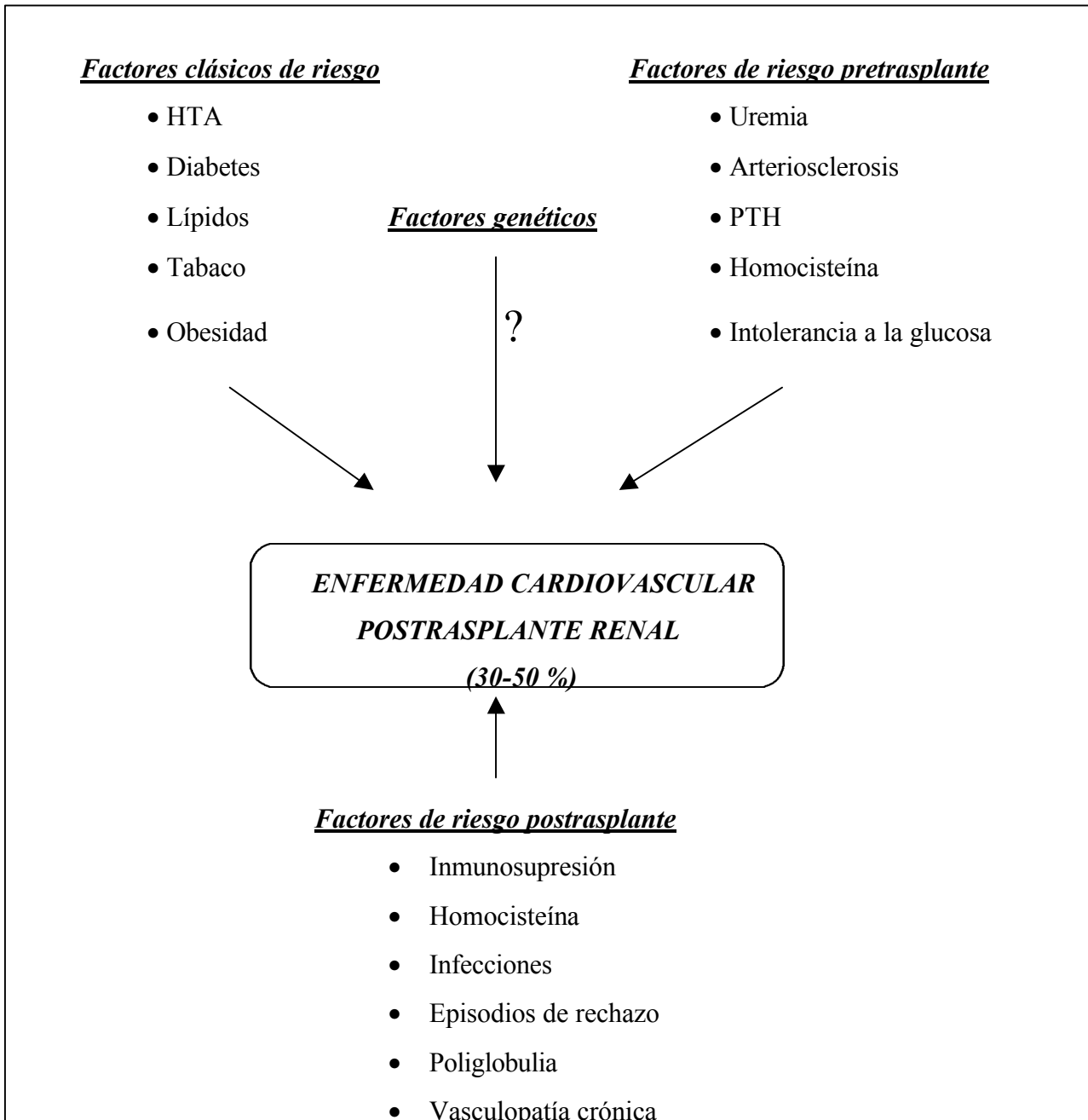
En la actualidad, el trasplante renal constituye la terapéutica sustitutiva de elección de la función renal en la gran mayoría de los pacientes con insuficiencia renal crónica terminal. Sin embargo, la mortalidad de origen cardiovascular (CV) está incrementada en esta población. Aproximadamente el 40% de estas muertes son debidas a eventos CV, lo que supone una incidencia de 3 a 6 veces mayor que la población general, ajustada para edad y sexo **(1-3)**.

Concretamente, la incidencia de enfermedad isquémica cardíaca postrasplante renal es de 4-8 veces más frecuente que la esperada para la población general europea. Así mismo, la hipertrofia ventricular izquierda (HVI), tan frecuente en los enfermos en diálisis (más del 60%) **(4-6)**, no siempre revierte después del trasplante renal y es un factor de riesgo cardiovascular independiente que puede provocar complicaciones isquémicas y arritmias en estos enfermos **(7,8)**.

Desde esta perspectiva, la población trasplantada constituye un buen modelo de estudio de la enfermedad cardiovascular (ECV). En estos pacientes, la interacción entre factores ambientales y genéticos, puede condicionar la aparición de ciertos fenotipos que permitirían el estudio de otros procesos cardiovasculares.

### 1. Factores que contribuyen a esta elevada morbi-mortalidad cardiovascular

En general, en estos enfermos coexisten los factores clásicos de riesgo vascular (obesidad, dislipemia, hipertensión arterial o HTA, etc.), con los factores inherentes al estado urémico previo y al de portador de un injerto renal (*figura 1*).



**Fig. 1.** Factores que contribuyen a la aparición de eventos cardiovasculares en el trasplante renal.

### 1.1. Alteraciones cardiovasculares en diálisis

- a) La HVI es frecuente en pacientes en hemodiálisis (54-100%), con el consiguiente riesgo de mortalidad **(4-6, 9)**. Esta HVI suele ser concéntrica y a su aparición contribuyen la anemia, la HTA, la sobrecarga volumétrica y probablemente el hiperparatiroidismo secundario **(10,11)**.
- b) Enfermedad isquémica arterial coronaria. La cardiopatía isquémica pretrasplante es un factor de riesgo muy importante en la predicción de eventos cardiovasculares después del trasplante **(2)**. Además, esto se incrementa notoriamente si se suman otros factores de riesgo vascular postrasplante como una edad avanzada, sexo masculino, diabetes, hipercolesterolemia o episodios de rechazos **(2, 12)**.
- c) Otros factores conocidos implicados en la ECV en pacientes en diálisis son la hiperlipemia, niveles altos de homocisteína y calcificaciones vasculares, así como el hiperparatiroidismo **(4)**.

### 1.2. Factores inherentes al trasplante renal

Los factores que contribuyen a la aparición de la ECV tras el trasplante renal son los siguientes:

- a) Fármacos inmunosupresores: corticosteroides, anticalcineurínicos y rapamicina.

Dada la importante prevalencia de complicaciones CV postrasplante, es posible que factores inherentes al mismo proceso, como los fármacos inmunosupresores sean los responsables de un peor perfil metabólico y vascular con respecto a la población general. Concretamente, los esteroides y la ciclosporina A se han asociado a una mayor prevalencia de HTA y dislipemia **(13,14)**. A similares niveles de tensión arterial, la masa ventricular es mayor en pacientes hipertensos que reciben ciclosporina A, que en

individuos con HTA esencial **(15)**. Asimismo, existen evidencias de que la ciclosporina A es responsable del estímulo del sistema renina-angiotensina (SRA) y de disfunción endotelial **(16,17)**. Los corticoides, por su parte, aumentan la expresión tisular de la enzima de conversión de angiotensina (ECA), favoreciendo el remodelado vascular y/o la hipertrofia ventricular **(18, 19)**. El tacrolimus se ha mostrado más diabetógeno que otros inmunosupresores, al mismo tiempo que no está exento de una acción lesiva sobre las estructuras vasculares. Finalmente, la rapamicina origina dislipemias severas, al menos en los primeros meses postrasplante, lo que pudiera contribuir al desarrollo de complicaciones CV **(12,20)**.

Recientemente se ha observado que la ciclosporina A pudiera frenar la hipertrofia del miocito **(21)**, pero esto no ha sido confirmado en la población trasplantada.

Con todo, se requieren estudios controlados para dilucidar el papel de los inmunosupresores sobre la ECV postrasplante.

#### b) Poliglobulia

La policitemia postrasplante (10-15%) puede contribuir al desarrollo de HTA y ésta a su vez a complicaciones cardiovasculares, especialmente con cifras de hematocrito mayores del 60%. El efecto depresor sobre la eritrocitosis de los inhibidores de la enzima de conversión de angiotensina (IECA) o por los antagonistas del receptor AT1 de la angiotensina II, hacen que sean los fármacos aconsejados cuando coexistan ambas alteraciones (HTA y poliglobulia) **(22)**.

#### c) Infecciones virales

Hay algunas evidencias de que las infecciones virales juegan un papel importante en la patogénesis de la ECV. En este sentido, recientemente se han

observado inclusiones virales (herpes simple) en placas ateromatosas y citomegalovirus en paredes vasculares de pacientes con enfermedad arterial coronaria. Si esto se confirma, la profilaxis antivírica con aciclovir o ganciclovir podría reducir el riesgo de estas complicaciones **(23)**.

d) Episodios de rechazo agudo y crónico

Los episodios repetidos de rechazo agudo conducen a un tratamiento inmunosupresor más enérgico y a una dosis acumulada mayor de esteroides, los cuales contribuyen a aumentar el riesgo cardiovascular y el de infecciones virales **(12-14)**. Por otra parte, la proteinuria que suele acompañar al rechazo crónico puede agravar la hiperlipemia postrasplante. Adicionalmente, la HTA en las situaciones de deterioro crónico de la función del injerto, puede jugar un papel importante **(24)**.

e) Homocisteína

La hiperhomocisteinemia es frecuente tras el trasplante renal, y es posible que esté asociada, como ocurre en la población general, con la aparición de ateromatosis prematura **(25)**.

### **1.3 Factores clásicos de riesgo cardiovascular**

a) Diabetes mellitus e hiperlipemia

La diabetes es un factor de riesgo de primera magnitud para el desarrollo de enfermedades CV e insuficiencia renal crónica terminal. Tras el trasplante su prevalencia oscila entre 3-18 % y es un factor de riesgo de cardiopatía isquémica más importante que en la población general **(26)**.

La dislipemia es también frecuente tras el trasplante (40-60 %) y está asociada al desarrollo de ECV. Aunque sus mecanismos patogénicos no están del todo aclarados, su

aparición parece estar en relación con los fármacos inmunosupresores. Además, la proteinuria que aparece en el rechazo crónico pudiera alterar el perfil lipídico en estos pacientes (20).

b) Hipertensión arterial (HTA)

La prevalencia actual de HTA en los pacientes trasplantados que reciben ciclosporina es del 60-70% y su tratamiento reduce, probablemente, la aparición de estas alteraciones cardiovasculares y la pérdida crónica de la función del injerto (27).

La etiología y la patogénesis de la HTA postrasplante es multifactorial, siendo las causas más importantes las siguientes:

1) Tratamiento inmunosupresor. Como se comentó previamente, los corticosteroides predisponen a la aparición de HTA postrasplante. Éstos pueden tener un efecto sinérgico con la ciclosporina en la producción de HTA postrasplante. Este fármaco es la causa más frecuente de HTA después del trasplante renal. Aunque sus efectos sobre el sistema renina-angiotensina (SRA) son controvertidos, parece evidente que el mecanismo desencadenante del aumento de la tensión arterial en estos pacientes descansa sobre una intensa vasoconstricción de las arteriolas aferentes del injerto.

Por otro lado, también se ha observado un efecto vasoconstrictor generalizado por la ciclosporina A sobre el músculo liso, aumentando la resistencia periférica total, independientemente de sus efectos sobre el parénquima renal (17,28).

2) Enfermedad parenquimatosa del injerto. Incluiríamos:

2a) Glomerulonefritis crónica y nefropatía diabética.

La glomerulonefritis recurrente o de novo, o la propia recurrencia de la nefropatía diabética se pueden asociar al desarrollo de hipertensión, si bien no son causas importantes de HTA postrasplante renal (29).

2b) Rechazo crónico.

Es una de las causas más frecuentes de HTA postrasplante. Concretamente, hasta un 70% de los pacientes con deterioro de la función renal por rechazo crónico sufren HTA, confirmado por el hallazgo de lesiones histológicas propias de dicho rechazo y por la ausencia de otras causas morfológicas o funcionales de HTA postrasplante **(30)**.

2c) Nefrotoxicidad por ciclosporina.

Los mecanismos hemodinámicos originados por este fármaco son los responsables de la aparición de HTA, aunque en ocasiones se deriva de la nefropatía crónica que provoca la ciclosporina **(28)**.

3) Enfermedad vascular del injerto

3a) Estenosis de la arteria renal.

Esta entidad es una causa frecuente de HTA postrasplante. Debe sospecharse en aquellos pacientes con desarrollo brusco de este cuadro o empeoramiento de su hipertensión previa, especialmente si se acompaña de deterioro de la función renal o soplo sobre el injerto, no detectado previamente **(12)**.

3b) Estenosis ateromatosa de pequeños vasos renales.

En ocasiones la arteriografía revela múltiples estenosis de los pequeños vasos intrarrenales **(12)**.

4) Persistencia de secreción de renina por riñones nativos

En algunos casos la persistencia de la HTA se debe a la hipersecreción de renina por los riñones nativos, confirmándose por el elevado cociente entre la renina de la vena renal del riñón nativo y la del injerto **(31)**.

5) HTA esencial recurrente

Se ha descrito una prevalencia mayor de hipertensión postrasplante en aquellos receptores de un injerto de cadáver obtenido de donantes con antecedentes de HTA esencial, aunque esto ha sido difícil demostrarlo, sospechándose en una posible transmisión de factores biológicos para el desarrollo de hipertensión esencial (12).

6) Otra causa de HTA secundaria es el hiperparatiroidismo secundario derivado de hipercalcemia persistente (32).

c) Tabaco

Estudios recientes han mostrado que el hábito de fumar es un factor independiente de riesgo de ECV y de pérdida del injerto (33).

d) Otros factores de riesgo

Otros factores clásicos de riesgo CV como la edad, o un índice de masa corporal elevado ( $\geq 27 \text{ Kg/m}^2$ ) han sido identificados también como factores de riesgo en la población trasplantada (26, 34).

#### 1.4. Factores genéticos

Cada vez se acepta más la influencia genética en las ECVs a partir de su agregación y recurrencia familiar. No obstante, como ocurre en otras enfermedades multifactoriales, la expresión fenotípica de las mismas puede estar influenciada por factores ambientales (35, 36). En este caso, el tratamiento inmunosupresor (esteroides, anticalcineurínicos y rapamicina) en la población trasplantada puede condicionar una mayor expresión de genes asociados a algunas ECVs, que en individuos sanos (portadores de alguno/s de estos genes), tal vez no ocurriría (18, 37, 38). En otras



palabras, el efecto deletéreo de los inmunosupresores pudiera incrementarse en pacientes predispuestos genéticamente.

Algunos sistemas fisiológicos implicados en la homeostasis cardiovascular y el crecimiento celular, pudieran jugar un papel importante en el desarrollo de las ECV. Concretamente, el sistema renina-angiotensina (SRA) puede desempeñar una acción decisiva en la progresión de la aterosclerosis o en la fisiopatología de las complicaciones cardiovasculares, a través de sus acciones sobre el remodelado vascular **(19)**. Así mismo, otras sustancias como el fibrinógeno, la glicoproteína IIIa/IIb plaquetaria (GPIIIa/IIb), la apolipoproteína E (apo E), el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), o la acción de la metil tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) sobre los niveles de homocisteína (Hcys) plasmáticos, se han asociado a la aparición de fenómenos trombóticos y un riesgo mayor de aterosclerosis **(39-43)**.

Actualmente, han sido clonados los genes que codifican las proteínas responsables de estos sistemas, lo que ha permitido detectar diferentes polimorfismos en cada uno de ellos. Un polimorfismo es aquella secuencia de DNA que se presenta en la población en forma de dos o más variantes o alelos (fenotipos), observándose cada uno de estos alelos con una frecuencia de al menos el 1% de la población.

Paralelamente a estos trabajos, ha surgido una ingente cantidad de estudios de asociación entre estos polimorfismos y la presencia de ECV, principalmente en población no trasplantada.

Algunos de los genes cuyos polimorfismos estudiados se han visto asociados a ECVs son:

1º) Genes del SRA

\* Gen de la enzima convertidora de angiotensina (ECA).

\* Gen del receptor de la angiotensina II de tipo 1 (AT1R).

\* Gen del angiotensinógeno (AGT).

\* Gen de la quimasa cardíaca.

2º) Gen del fibrinógeno.

3º) Gen de la glicoproteína plaquetaria IIIa (GPIIIa).

4º) Gen de la apolipoproteína E (apoE).

5º) Gen de la metil-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR).

6º) Gen del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1).

### **1.5. Métodos de estudio en el análisis de la influencia de la genética en la ECV**

El desarrollo de la epidemiología genética ha colaborado en el avance de los estudios sobre la base genética de la ECV, al desarrollar mejores técnicas de diseño de estos estudios y de análisis estadístico de los resultados.

Los dos principales tipos de diseño son los estudios de **asociación** (comparación casos versus controles) y los estudios de **acoplamiento**, en los que se evalúa la evolución fenotípica y genotípica de los diferentes miembros de una familia. Estos últimos, aunque más atractivos desde el punto de vista fisiológico, conlleva importantes dificultades logísticas. Los “pedigrees” humanos, generalmente pequeños, y el comienzo tardío de la ECV, dificultan la obtención de información multigeneracional. Por otro lado, la heterogeneidad genética de las ECVs hace difícil las técnicas estadísticas a realizar (44).

#### **1.5.1. Ventajas e inconvenientes de los estudios de asociación**

Los estudios de asociación investigan acerca de si un marcador, en el caso de la ECV un polimorfismo del DNA, aparece más frecuentemente en casos que en controles

(estudio casos-contróles). Si el resultado es positivo, sugiere que el polimorfismo por sí mismo o una mutación funcional con la cual el polimorfismo aparece en desequilibrio de ligamiento, contribuye en algunos de los casos a la aparición de la enfermedad que está siendo estudiada. Puesto que no postula ningún modelo genético, esta metodología está bien indicada en la detección de efectos genéticos modestos dentro de una enfermedad compleja y heterogénea (p.e. la HTA). El análisis estadístico es simple, basado en una tabla de contingencia comparando el alelo o las frecuencias genotípicas. La probabilidad de detectar una asociación entre un gen candidato y la enfermedad dependerá de la frecuencia alélica, la fuerza de su relación con la enfermedad, y la homogeneidad de la población estudiada. Un resultado positivo podría indicar un alelo causal (genotipo o alelo “desfavorable”) o un alelo en desequilibrio de ligamiento con la mutación causal. Un resultado negativo no tiene casi poder, ya que podría argumentarse que permanecen por ser descubiertos otros polimorfismos en el locus del gen. El principal peligro de este método es la posibilidad de resultados falsos-positivos, principalmente debidos a una mezcla de la población y al error de seleccionar cuidadosamente casos y controles muy bien caracterizados.

- Posibles ventajas

- a) Los estudios de asociación entre un gen y una enfermedad pone en alerta un problema de una determinada enfermedad que puede estar condicionada por una base genética.
- b) Ayudan a iniciar medidas profilácticas.
- c) Identifican polimorfismos “desfavorables” como posibles marcadores de una determinada enfermedad.

- Posibles desventajas.

- a) No dejan de ser estudios de asociación y en ningún caso demuestran en sí, una relación directa causa-efecto.
- b) Necesitan correcta metodología para que sean resultados fiables.

Con todo, los estudios de asociación entre estos polimorfismos y las ECVs han sido poco estudiados en la población portadora de un injerto renal.

### **1.6. Participación del sistema renina-angiotensina en la ECV**

En general, el SRA puede jugar un papel decisivo en el desarrollo de las ECVs, a través de sus acciones sobre los órganos diana. Este sistema es una cascada enzimática que genera el péptido vasoactivo angiotensina II (Ang II), participa en la homeostasis circulatoria e hidroelectrolítica (SRA circulante) y en la regulación del tono vascular y la tensión arterial. La hormona peptídica circulante Ang II es el resultado de la escisión de la prohormona angiotensinógeno (AGT) que se sintetiza básicamente en el hígado y se libera a la circulación. El primer paso proteolítico es catalizado por la enzima renina, secretada principalmente por el riñón. Su producto, angiotensina I (Ang I), se escinde posteriormente por la enzima de conversión de angiotensina (ECA) produciendo el octapéptido activo Ang II. Ésta entra en la circulación sistémica como hormona sistémica y es transportada a los órganos diana: vasos sanguíneos, riñones, glándulas suprarrenales y corazón. Este entramado enzimático es lo que conocemos como el SRA circulante (19,45).

Sin embargo, además de la Ang II circulante, se ha demostrado la síntesis local de Ang II en diversos tejidos por parte del llamado SRA local o tisular. La producción de Ang II local se debe a la existencia y acción de uno o más componentes del SRA en estos tejidos diana. Concretamente, la ECA se expresa ampliamente en el endotelio de

todos los vasos sanguíneos, y este enzima unido a la membrana endotelial puede potencialmente controlar la síntesis local de Ang II en lechos vasculares específicos. La Ang II local ejerce efectos autocrinos-paracrinos sobre las funciones tisulares locales y participa en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares (19,45).

El reconocimiento del papel que tiene la Ang II en la regulación del aparato cardiovascular ha llevado a la búsqueda de sustancias capaces de modular su actividad. De ellas, las que han alcanzado mayor aplicación clínica son los inhibidores de la ECA (IECA) y los antagonistas del receptor de angiotensina II de tipo 1 (ARA). Estos fármacos han desempeñado un importante papel en el tratamiento de la HTA e insuficiencia cardíaca, a la vez que constituyen herramientas de trabajo indispensables para conocer el papel fisiopatológico del SRA (46).

#### 1.6.1. Vías de síntesis de la angiotensina II. Cascada de activación del SRA (47).

El primer paso en la cascada enzimática del SRA incluye la formación de Ang I por acción de la renina sobre el precursor angiotensinógeno.

La renina es una aspartil-proteasa ácida de 340 aminoácidos (35-40 kDa) sintetizada y liberada por las células yuxtglomerulares renales localizadas en la pared de las arteriolas aferentes justo antes de su entrada al glomérulo y por otros muchos órganos (SRA local). En plasma y riñón existe una prorenina inactiva de mayor peso molecular (406 aa) que podría considerarse como un precursor de la renina; la prorenina se activa por diversas enzimas (tripsina, pepsina, catepsina) y se convierte en renina, que tiene una vida media plasmática de 15 minutos. La liberación de renina por las células yuxtglomerulares se regula por:

- a) Barorreceptores de la arteriola aferente. La secreción de renina aumenta en

respuesta a una reducción de la presión de perfusión renal secundaria a hipovolemia, disminución del volumen minuto (insuficiencia cardíaca), estenosis de la arteria renal o administración de fármacos vasodilatadores.

b) Quimiorreceptores sensibles a las concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  a nivel de la mácula densa. Un aumento de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en el líquido tubular reduce la secreción de renina y viceversa.

c) El tono simpático, de tal forma que la estimulación de los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos aumenta la secreción de renina, mientras que su bloqueo y los simpaticolíticos centrales la disminuyen.

d) Factores humorales: Ang II, vasopresina y potasio reducen la liberación de renina.

La renina presenta una alta afinidad por el angiotensinógeno, una alfa2-globulina de 452 aa (61-61.5 kDa), que se sintetiza como preangiotensinógeno y que contiene entre 24 y 33 aa más. El AGT se sintetiza fundamentalmente en el hígado (también en riñón, tejido adiposo y sistema nervioso) y su liberación es estimulada por glucocorticoides, hormonas tiroideas, estrógenos y por la propia Ang II. La renina rompe el enlace entre Leucina<sup>10</sup>- Valina<sup>11</sup> del AGT, liberando un decapeptido inactivo, la Ang I. Ésta, a su vez, sufre la acción de la enzima de conversión de angiotensina (ECA), que separa el dipéptido N-terminal His<sup>9</sup>- Leu<sup>10</sup> de la Ang I, formándose un octapéptido activo, la Ang II. La ECA humana está ampliamente distribuída por el organismo, pero alcanza concentraciones máximas en pulmón, endotelio y adventicia vascular, células tubulares proximales renales, corteza suprarrenal, células de borde en cepillo intestinales, útero y testículo. La ECA está compuesta de 2 dominios homólogos, cada uno con un lugar catalítico y otro de unión de un átomo de zinc. Entre otras

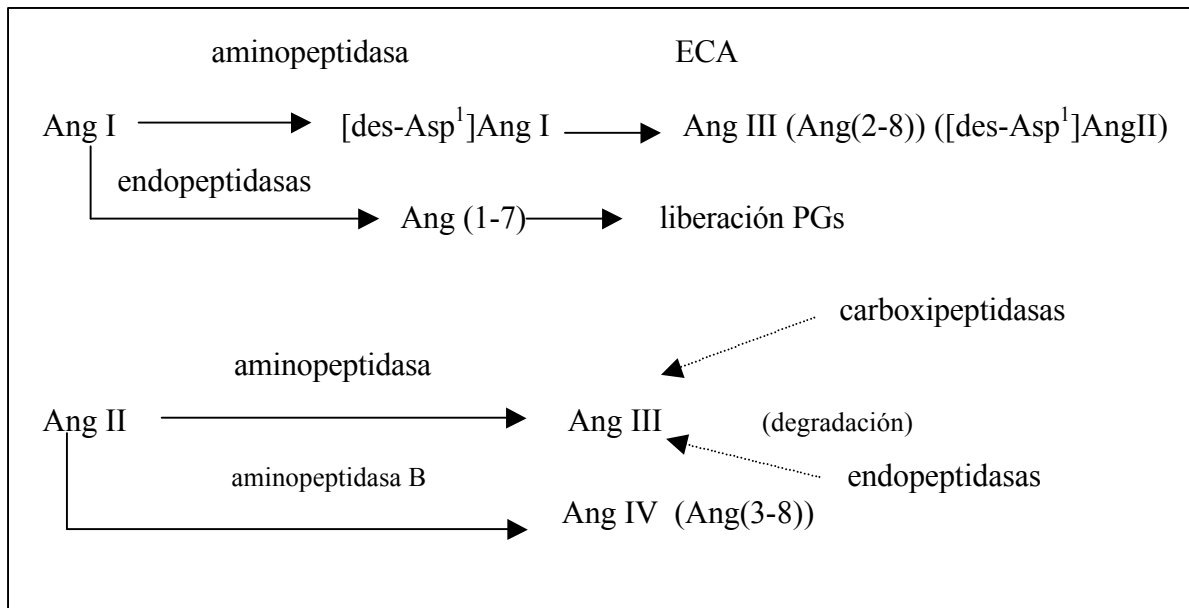
acciones, cataliza la conversión de angiotensina I a Ang II y la rotura de la bradiquinina hasta sus productos de degradación. Es también una enzima inespecífica que inactiva también las quininas, met- y leucina-encefalinas, neurotensina, hormona liberadora de la hormona luteinizante y la sustancia P. Tanto la Ang II como la bradiquinina son poderosas moléculas vasoactivas con múltiples efectos agudos y crónicos contrapuestos sobre el sistema cardiovascular. De esta forma, con su papel pivote en dos importantes sistemas hormonales de regulación cardiovascular, el sistema renina-angiotensina y el sistema kalicreína-quinina, la ECA tiene un impacto importante sobre la estructura y función cardiovascular (48).

La Ang I puede sufrir además la acción de una aminopeptidasa y se convierte en [des-Asp<sup>1</sup>]Ang I, o de una endopeptidasa transformándose en Angiotensina-(1-7). La Ang I, y en menor grado la Ang II, pueden biotransformarse también en Angiotensina-(1-7) por acción de diversas endopeptidasas (24.11, 24.15 y 24.26). La Angiotensina-(1-7) puede funcionar como una hormona antihipertensiva en virtud de sus potentes efectos natriuréticos y diuréticos y efectos vasodepresores en los lechos vasculares coronarios y mesentéricos (49). Así mismo, esta Angiotensina-(1-7) es inactivada por la ECA, de donde se deduce la importancia del tratamiento con IECA en pacientes con HTA (49). La Ang III, también denominada Ang-(2-8) o [des-Asp<sup>1</sup>]Ang II, se forma a partir de la Ang II por acción de una aminopeptidasa o a partir de la [des-Asp<sup>1</sup>]Ang I por acción de la ECA. La Ang III es un heptapéptido que actúa sobre los receptores de la Ang II produciendo vasoconstricción y liberación de aldosterona y que, por acción de endopeptidasas y carboxipeptidasas se convierte finalmente en fragmentos inactivos. La Ang II puede convertirse por acción de la aminopeptidasa B en Ang IV [Ang-(3-8)]. Estas múltiples vías metabólicas explican por qué la vida media de la Ang II es tan sólo

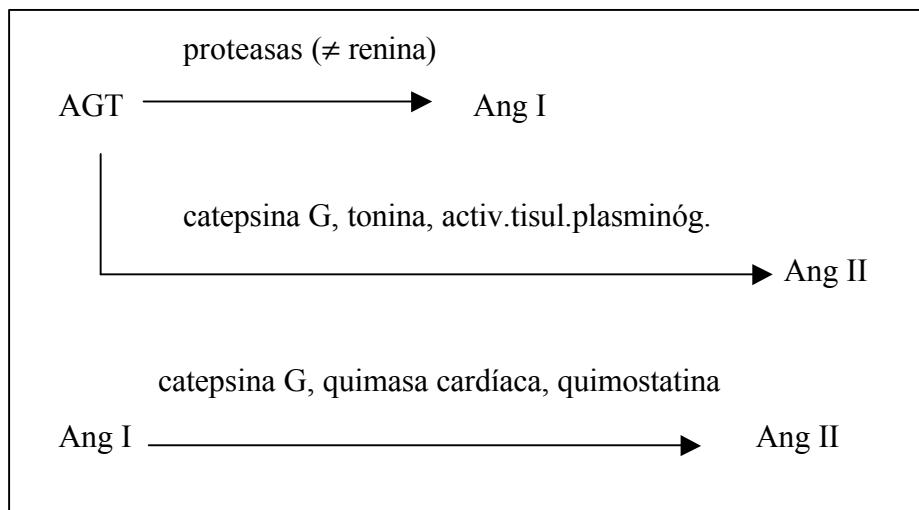
de 15-60 seg. Además, la Ang I puede convertirse por acción de una proil endopeptidasa en Angiotensina-(1-7) que facilita la liberación de prostaglandinas (*figura 2*).

En los últimos años se ha demostrado en algunos tejidos la existencia de varias vías enzimáticas que convierten el AGT en Ang I (proteasas independientes de la renina) o directamente en Ang II (catepsina G, tonina, activador tisular del plasminógeno) y enzimas independientes de la ECA que convierten la Ang I en Ang II (catepsina G, quimasa cardíaca, quimostatina) (*figura 3*).





**Figura 2.** Otras vías metabólicas del SRA



**Figura 3.** Vías alternativas de formación de la Ang II

La quimasa cardíaca es una serín proteasa (39 kDa) que se localiza como proenzima en las células endoteliales coronarias, en los miocitos, en los fibroblastos y en la matriz extracelular y se activa por acción de una dipeptidilaminopeptidasa. Esta

enzima es unas 20 veces más eficiente que la ECA para convertir la Ang I en Ang II, lo que unido a que su expresión aumenta tras la proliferación neointimal producida en respuesta a la lesión coronaria con un catéter-balón **(50)**, sugiere que podría desempeñar un cierto papel en la regulación del SRA cardíaco. Aún así, desconocemos en parte la importancia fisiopatológica de estas vías enzimáticas alternativas en el hombre.

#### 1.6.2. Acciones fisiológicas del SRA

Las acciones de la Ang II son consecuencia de su interacción con receptores específicos localizados en la membrana de las células diana, denominados receptores de tipo 1 (AT1R) y de tipo 2 (AT2R).

##### 1.6.2.1. Estructura de los receptores (47,51)

El AT1R presenta siete dominios transmembrana y pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G, localizándose el grupo carboxi-terminal a nivel citoplasmático y el grupo amino-terminal glucosilado a nivel extracelular. La Ang II se une a la superficie externa de los dominios 2 y 3 y parecen importantes determinadas cisteínas que representan puntos potenciales para la formación de puentes disulfuro. El bucle intracelular que une los dominios 5 y 6 y la porción carboxi-terminal constituyen la zona que se acopla y regula una determinada proteína G. El AT1R consta de 359 aa y presenta un 93.9 % de homología con el receptor AT1R de roedores (del cual se conocen dos tipos: el AT1a y el AT1b). Muchas son las funciones que se le atribuyen al AT1R, entre ellas la vasoconstricción, modulación de procesos de crecimiento, interacción con procesos endocrinos y nervioso central, liberación de catecolaminas, control de la síntesis de aldosterona y control de la sed **(52)**. En cuanto a la distribución del AT1R, es particularmente prominente en células del músculo vascular liso y en el miocardio.

El AT2R presenta 363 aa que adoptan también una estructura con 7 dominios transmembrana, pero exhibe sólo un 34% de homología con el receptor AT1 principalmente en las regiones transmembrana. En el AT2R la transducción de la señal generalmente no parece implicar la activación de proteínas G.

#### 1.6.2.2. Distribución de los receptores

La distribución de estos receptores se ha estudiado más extensamente en la rata (51), observándose los AT1R en todos los órganos diana para la Ang II. Se expresa exclusivamente en los pulmones, hígado, tracto urinario, placenta y pituitaria y es el principal receptor expresado en vasos, riñón, córtex adrenal y corazón. Los AT1R y AT2R son detectados en aproximadamente igual proporción en el útero y cerebro, mientras el AT2R se expresa exclusivamente en el ovario y predomina en la médula adrenal y páncreas. Algunos AT2R también se detectan en el córtex adrenal, riñón, aorta, corazón e intestino.

En el cerebro, los AT1R y AT2R se detectan en áreas discretas y distintas. El AT1R es expresado exclusivamente en las áreas del cerebro implicadas en la regulación de la presión sanguínea y la liberación de vasopresina. Éstas incluyen el hipotálamo, órgano subfornical, órgano vasculoso de la lámina terminal, área postrema, núcleo del tracto solitario, núcleos peri- y paraventricular y en los núcleos supraóptico y supraquiasmático. Los AT2R se expresan exclusivamente en el córtex cerebelar y en algunos núcleos talámicos y subtalámicos. De esta forma, los receptores AT2 predominan en el cerebro medio, mientras que los AT1R predominan en el tronco encefálico e hipotálamo. En la eminencia media, hipotálamo y sustancia nigra coexisten ambos receptores (47).

### 1.6.2.3. Transducción de la señal celular (53,54)

La Ang II se une al receptor AT1 y activa la proteína Gq $\alpha$  y, posteriormente, la fosfolipasa C- $\beta$ 1, una enzima ligada a la membrana que hidroliza el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (IP<sub>2</sub>) en inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol. El IP<sub>3</sub> actúa sobre receptores específicos localizados en el retículo sarcoplásmico y facilita la liberación de calcio allí almacenado y la posterior entrada de calcio extracelular a través de canales de Ca (este efecto está mediado por el IP<sub>3</sub> y/o su derivado 1,3,4,5-tetrafosfato o IP<sub>4</sub>). El resultado final es un aumento de la concentración intracelular de Ca, que a nivel muscular cardíaco aumenta la contractilidad y frecuencia cardíaca, a nivel vascular aumenta el tono arterio-venoso y a nivel adrenal aumenta la síntesis de aldosterona. El diacilglicerol activa la proteína quinasa C, que fosforila diversas proteínas (cadenas pesada y ligera de la miosina, caldesmona, calponina), alcaliniza el medio intracelular al estimular el intercambiador Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> y activa la vía de la quinasa de la proteína quinasa activada por mitógenos. Esto a su vez, aumenta la expresión de los genes de respuesta temprana (erg-1, hsp, c-fos, c-jun, c-myc), que aumentan la síntesis de proteínas y DNA, y estimulan la migración, el crecimiento y la división celular.

Las proteínas codificadas por los proto-oncogenes c-jun y c-fos se combinan constituyendo un heterodímero, el factor de transcripción AP-1, que aumenta la transcripción de diversos genes que codifican factores de crecimiento implicados en los fenómenos de hipertrofia e hiperplasia celular (factor de crecimiento fibroblástico básico, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento transformante tipo b) y proteínas de la matriz extracelular (colágeno, fibronectina, laminina).

Por otro lado, la Ang II activa también otros factores del núcleo de las células diana, que intervienen en la regulación de genes asociados con la progresión de la

enfermedad renal. En concreto, activan miembros de la familia de factores nucleares de transcripción  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), los cuales, a su vez, estimulan la expresión de muchos genes asociados con la inflamación, producción de citoquinas y proliferación fibroblástica. Todos estos factores llevan a la fibrosis del tejido.

El NF- $\kappa$ B se describió inicialmente como un factor con actividad de unión al DNA que aumentaba la transcripción génica de la cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulinas. Hoy se sabe que el NF- $\kappa$ B participa en la regulación génica de un número de genes asociados a la respuesta inflamatoria y el crecimiento celular, al unirse a dianas presentes en los promotores de dichos genes.

Hay dos rutas autocrinas en las cuales la activación del NF- $\kappa$ B estimula la síntesis de factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y de angiotensinógeno. El TNF- $\alpha$  directamente estimula la activación de NF- $\kappa$ B a través de su propio receptor, mientras que la síntesis del angiotensinógeno alimenta la síntesis de Ang I, lo que amplifica la formación de Ang II. Las maniobras farmacológicas que intrínsecamente reducen la Ang II (inhibidores de la ECA) o interfieren con su acción (antagonistas de los AT1R y AT2R) disminuyen la activación del NF- $\kappa$ B y enlentecen la progresión de la enfermedad renal **(53)**.

Por su parte, la estimulación de los receptores AT2:

a) Disminuye la actividad guanilato ciclasa particulada, efecto que parece estar mediado a través de la activación de una fosfotirosina fosfatasa que regularía la unión del ATP al dominio quinasa de la enzima, y

b) Aumenta la conductancia al potasio en cultivos neuronales humanos **(47)**.

## 1.7. Acciones mediadas a través de los receptores AT1

La Ang II no es sólo un poderoso vasoconstrictor sino también un potente factor promotor del crecimiento de las células del músculo liso vascular y otros tipos celulares, actuando sobre los receptores AT1 en los órganos diana (corazón, vasos y riñón) (52). La mayoría de las acciones características de la Ang II parecen estar mediadas a través de la estimulación de receptores AT1.

### 1.7.1. Renales (47,55)

La estimulación de los receptores AT1 produce:

a) Vasoconstricción y reducción del flujo sanguíneo renal, sin modificación de la fracción de filtración glomerular. La vasoconstricción es más marcada sobre la arteriola glomerular eferente que sobre la aferente, incrementando la presión capilar glomerular; por tanto, la Ang II mantiene la presión hidrostática glomerular cuando la presión de perfusión glomerular desciende por debajo de un punto crítico, tal como sucede en pacientes con estenosis bilateral de la arteria renal, nefrosclerosis severa, riñón trasplantado o estenosis de la arteria renal con riñón único.

b) Contracción de las células mesangiales, reduciendo la superficie de filtración glomerular y el coeficiente de ultrafiltración, a la vez que incrementa el paso transglomerular de macromoléculas. Con ello se facilita la aparición de microalbuminuria y posteriormente de proteinuria; ésta podría deberse a un aumento de la permeabilidad capilar glomerular, quizá porque la vasoconstricción de la arteriola eferente aumenta la presión intracapilar glomerular.

c) Disminución de la excreción renal de sodio y agua, y aumento de la de potasio. Ello es el resultado de una acción renal directa de la Ang II y de su capacidad para:

- 1) Liberar aldosterona desde las células de la zona glomerulosa del córtex adrenal.
- 2) Redistribuir el flujo renal hacia las nefronas yuxtaglomerulares que tienen asas de Henle largas.
- 3) Disminuir el flujo medular renal y la excreción de Na.

La Ang II actúa directamente sobre la porción basolateral del túbulo proximal donde estimula el intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y aumenta la reabsorción de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y bicarbonato. La aldosterona actúa sobre los túbulos distal y colector reteniendo  $\text{Na}^+$  y aumentando la excreción de  $\text{K}^+$  e  $\text{H}^+$ . La retención de  $\text{Na}^+$  y agua puede producir edemas que comprimen la pared vascular y aumentan las resistencias extravasculares.

La aldosterona estimula también receptores específicos localizados en los fibroblastos. Esto aumenta su proliferación y la síntesis de la matriz extracelular, por lo que desempeña un importante papel en la génesis de la fibrosis cardíaca que aparece en pacientes con HTA e insuficiencia cardíaca **(56)**.

d) Inhibición de la liberación de renina, lo que constituye un sistema de retroalimentación negativo que tiende a equilibrar el SRA.

### 1.7.2. Vasculares **(19, 55, 57)**

La Ang II produce una potente vasoconstricción, fundamentalmente arteriolar, que aumenta las resistencias sistémicas y la tensión arterial y, en menor grado, venosa. La vasoconstricción es más marcada a niveles esplácnico, coronario, cutáneo y renal, y de menor intensidad a nivel pulmonar y muscular esquelético.

La vasoconstricción sería la resultante de:

- a) Estimulación de receptores AT1 de la fibra muscular lisa arterio-venosa. Ello aumenta tanto la entrada de  $\text{Ca}^+$  a través de canales tipo L y T de la membrana como

la liberación del  $\text{Ca}^+$  almacenado en el retículo sarcoplásmico; el resultado de ambas acciones es un aumento de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^+$  ( $[\text{Ca}^+]_i$ ) que aumenta el tono vascular.

- b) Aumento de la reabsorción de  $\text{Na}^+$ , producido por una acción tubular directa o a través de la liberación de aldosterona desde el córtex adrenal. La retención de  $\text{Na}^+$  incrementa su concentración intracelular, lo que a su vez activa el intercambio  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^+$  y aumenta la  $[\text{Ca}^+]_i$ , que sería responsable de la vasoconstricción.
- c) Liberación de vasopresina por el núcleo paraventricular hipotalámico.
- d) Aumento del tono simpático vasoconstrictor. La Ang II facilita la liberación presináptica de noradrenalina desde los terminales nerviosos simpáticos y de adrenalina desde la médula adrenal, disminuye su reincorporación en los terminales nerviosos desde los que se liberan, estimula la transmisión ganglionar simpática, aumenta la síntesis de catecolaminas (activa la hidroxilación de la tirosina) y aumenta la reactividad vascular a la acción vasoconstrictora de la noradrenalina. Por último, a nivel central (área postrema, órgano subfornical, eminencia media, órgano vasculoso de la lámina terminal, núcleo paraventricular), la Ang II estimula el tono simpático y aumenta las resistencias vasculares sistémicas.
- e) Inhibición del tono parasimpático periférico y central.

La Ang II además de ser un poderoso vasoconstrictor, estimula la hipertrofia vascular. Se ha demostrado que la Ang II (sobre todo la local) está implicada en la activación de tres factores de crecimiento autocrinos-paracrinos en células del músculo vascular liso (58):

- Factor de crecimiento de fibroblastos.
- Factor de crecimiento transformante  $\beta$ .



- Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

Una clave determinante en la regulación de la hipertrofia inducida por Ang II parece ser el TGF- $\beta$ . Datos sobre células musculares lisas indican que el factor de crecimiento transformante  $\beta$  es antiproliferativo y conduce a hipertrofia celular. En ausencia o inhibición del factor de crecimiento transformante  $\beta$ , el principal efecto de la Ang II es la mitogénesis o hiperplasia resultante de la activación del factor de crecimiento derivado de fibroblastos y del factor de crecimiento derivado de plaquetas (59). La activación simultánea del factor de crecimiento transformante  $\beta$  supera la actividad proliferativa de otros factores de crecimiento y produce hipertrofia de miocitos cardíacos, aunque el papel de dicho factor en la hipertrofia cardíaca inducida por la Ang II no ha sido estudiada.

La Ang II también aumenta el grosor de la capa media arterial (aumenta el cociente pared/ luz vascular) y la matriz extracelular. Estos cambios disminuyen la elasticidad arterial (capacidad de las arterias de gran calibre para cambiar el volumen en respuesta a cambios de presión) y la reserva coronaria y cerebral. La disminución de la elasticidad arterial facilita a su vez la aparición o mantenimiento de hipertrofia cardíaca al aumentar desproporcionadamente la tensión sistólica y la presión pulsátil, dos determinantes del trabajo cardíaco (47).

La Ang II ha demostrado estimular el crecimiento y la migración celular vascular, dos importantes procesos en la arteriosclerosis y la reestenosis (58,59). Además de las lesiones del músculo liso intimal, los macrófagos lipídicos contribuyen de forma importante a la formación de la placa arteriosclerótica. La Ang II puede estimular la transformación de monocitos a macrófagos en presencia del colesterol de lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL), y éstos, de forma simultánea, estimulan

la expresión celular de la ECA y presumiblemente la síntesis de Ang II. Por tanto, un posible proceso de feed-back positivo local lleva a aumentos de los niveles de la ECA y la Ang II en la lesión arteriosclerótica. Además, la Ang II puede participar en la fisiopatología de síndromes isquémicos agudos **(19)**.

Pruebas recientes en humanos y en cultivos celulares han demostrado además la estimulación de la síntesis de inhibidor del activador del plasminógeno (PAI) en respuesta a la Ang II. Por tanto, la Ang II puede atenuar la trombolisis mediante la estimulación del PAI y la inhibición de la fibronectina, aumentando la incidencia de oclusiones venosas, isquemia periférica y necrosis **(60)**. Además, la Ang II parece estar implicada en la activación y agregación plaquetaria.

La Ang II también promueve el crecimiento microvascular, estando implicada en los procesos de angiogénesis y en el desarrollo de circulación colateral **(61)**.

Un papel importante de la ECA es su acción sobre el metabolismo de la bradiquinina. La ECA es una quininasa que degrada bradiquinina y otros péptidos. De este modo, los IECA aumentarán los niveles de bradiquinina tisular, reduciendo la producción de Ang II. La bradiquinina actúa sobre el endotelio activando la cascada del ácido araquidónico, produciendo prostaciclina y estimulando la liberación del factor relajante derivado del endotelio u óxido nítrico. Al disminuir la Ang II y aumentar el óxido nítrico, los IECA pueden inhibir el proceso de remodelación vascular. El óxido nítrico, a su vez, inhibe la agregación y la adhesión plaquetaria, bloquea la proliferación de células musculares lisas vasculares e inhibe la adherencia de macrófagos a la pared vascular. Por tanto, los IECA pueden tener un efecto protector de la aterogénesis debido a la acción combinada de una menor producción de Ang II y mayor síntesis de NO **(62, 63)**.

### 1.7.3. Cardíacas (64-67)

Existen pruebas in vivo e in vitro de la producción local de Ang II y los efectos sobre el corazón. Además, existe una segunda enzima miocárdica, la quimasa cardíaca humana, que puede convertir Ang I en Ang II.

La Ang II aumenta la contractilidad, la frecuencia cardíaca y las demandas miocárdicas de O<sub>2</sub> y produce una intensa vasoconstricción coronaria; estos efectos se deben a una acción directa cardíaca (activa los canales de Ca tipo-L de las células cardíacas) y al aumento del tono simpático. Por tanto, la Ang II potencia los efectos deletéreos de la isquemia (deprime el ST del electrocardiograma y aumenta el área de infarto y la incidencia de arritmias ventriculares). De hecho, 48 horas después de un infarto de miocardio se observa un aumento de los niveles plasmáticos y cardíacos de Ang II como consecuencia de la estimulación del tono simpático y la reducción del flujo renal secundario. En estos pacientes, la Ang II al aumentar la postcarga y las demandas miocárdicas de O<sub>2</sub> contribuye a un deterioro más rápido de la contractilidad cardíaca y a la posterior progresión hacia la dilatación ventricular y la insuficiencia cardíaca (47).

La Ang II puede producir también efectos proarritmogénicos ya que aumenta la postcarga, el tono simpático y las demandas miocárdicas de O<sub>2</sub> a la vez que disminuye el flujo coronario y los niveles plasmáticos de potasio.

La Ang II contribuye al fallo cardíaco congestivo aumentando la retención de sodio y agua, secundario a la liberación de aldosterona por la glándula adrenal (60).

La Ang II parece desempeñar un papel en los distintos procesos implicados en la remodelación cardíaca (19). Los cardiomiocitos y los fibroblastos de ventrículos de corazones de rata expresan Ang I, Ang II, ATR y ECA y aumentan de tamaño. Esta

hipertrofia se produce sin presión arterial aumentada, lo cual indica un papel de la Ang II en la estimulación del crecimiento.

En la hipertrofia del ventrículo izquierdo (HVI) con sobrecarga de presión producida por estrechamiento aórtico de ratas, la expresión del RNAm de la ECA aumentó tres veces comparado con ratas control operadas. En otros estudios, se observó que la expresión génica de la ECA local también se estimula en respuesta a la tensión de la pared ventricular, lo que origina la remodelación cardíaca (19).

### **1.8. Bloqueo farmacológico del SRA (47)**

En la actualidad disponemos de diversos grupos farmacológicos que bloquean la síntesis y/o las acciones de la Ang II.

1. Fármacos que bloquean la síntesis o antagonizan las acciones de la renina. Ésta es un área de investigación en la que ya se han obtenido fármacos efectivos (enalkiram, remalkirem) por vía oral que aún se encuentran en fase de investigación clínica.

Los bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos inhiben la liberación de la renina por las células yuxtaglomerulares, siendo éste un mecanismo que participa en su acción antihipertensiva. Así mismo, son muy útiles en la cardiopatía isquémica y en evitar el reinfarto.

2. Antagonistas de los receptores de la Ang II. Permiten bloquear las acciones de la Ang II, sea cual sea su vía de síntesis. El losartán, un bloqueador selectivo de los AT1R, es el primer fármaco de esta familia, si bien ya existen otros con similar actividad sobre los receptores AT1R (valsartán, ibersartán, condesartán, telmisartán, etc.).

3. Anticuerpos monoclonales contra los distintos componentes del SRA. Constituyen importantes herramientas de trabajo, pero no parecen tener interés terapéutico en la actualidad.
4. Inhibidores de la enzima de conversión de Ang (IECA) **(68)**. Este grupo de fármacos ha pasado a ocupar en los últimos años un lugar destacado en el tratamiento de la HTA y de la insuficiencia cardíaca. Los IECA producen un bloqueo competitivo de la ECA. Ello explica por qué sus acciones vasodilatadoras se potencian en pacientes en los que el SRA está activado (con depleción de volumen o en tratamiento con diuréticos tiazídicos o de asa).

El hallazgo de que, en tratamientos crónicos su acción vasodilatadora no se correlaciona con la actividad de la renina plasmática y el que persista en hipertensos hiporreninémicos y en pacientes anéfricos, indica que los IECA podrían actuar por otros mecanismos entre los que se incluyen:

- a) Un aumento en los niveles de quininas y prostaglandinas vasodilatadoras.
- b) Una inhibición del aumento del tono simpático que la Ang II produce.
- c) Una reducción en los niveles plasmáticos de vasopresina, si bien no hay una correlación directa entre este efecto, que tarda de tres a cuatro semanas en aparecer y la acción antihipertensiva de los IECA que es inmediata.
- d) Una inhibición central de las acciones de la Ang II y del tono simpático.

#### 1.8.1. Acciones farmacológicas de los IECA y los antagonistas del receptor AT1R **(68)**

1) A nivel cardíaco. La hipertrofia cardíaca es la respuesta del ventrículo a la sobrecarga de presión o de volumen. Aunque pretende mejorar el volumen minuto, la

hipertrofia cardíaca del hipertenso representa un factor de alto riesgo independiente del proceso que la produce, aumentando la incidencia de complicaciones cardíacas.

Los IECA revierten la hipertrofia cardíaca del paciente hipertenso, siendo este efecto independiente de su acción hemodinámica-antihipertensiva, ya que aparece incluso en dosis que no modifican la tensión arterial. Esta regresión se acompaña de una reducción en la síntesis de proteínas y DNA, más una inhibición de la expresión de los genes de respuesta inmediata (c-myc, c-jun, c-fos, erb-1) y tardía. Reducen la fibrosis intersticial y perivascular cardíaca, aumentando por ende la reserva coronaria. También mejora la función sistólica, así como la diastólica, reduciendo las arritmias y los signos de isquemia cardíaca.

Un efecto similar sobre la regresión de la HVI y sus consecuencias secundarias lo ejercen también los antagonistas de los receptores de Ang II de tipo 1 (69-71).

2) A nivel vascular. Los IECA producen vasodilatación arteriovenosa, reducen la fibrosis y la hipertrofia de la capa media arterial. Además, disminuyen el cociente pared/luz vascular, así como los diámetros externo e interno arteriales. Como consecuencia, aumentan la distensibilidad de las grandes arterias y la reserva vascular coronaria y cerebral. Es posible que los IECA, y probablemente los antagonistas de los receptores de Ang II de tipo 1, sean los fármacos que mayor regresión del remodelado vascular producen en el paciente hipertenso.

3) A nivel renal. Los IECA y los antagonistas de los receptores de Ang II de tipo 1, inhiben los efectos renales de la Ang II, especialmente la vasoconstricción de la arteriola eferente. Así, en pacientes hipertensos incrementan el flujo sanguíneo renal pero no modifican la velocidad de filtración glomerular o la fracción de filtración.

También producen diuresis y natriuresis, por reducción de la secreción de aldosterona, inhibición del tono simpático renal y, posiblemente, por una acción tubular directa.

#### 1.8.2. Influencia genética en la respuesta terapéutica a los IECA

Actualmente hay escasa información sobre la influencia genética en la respuesta terapéutica del bloqueo del SRA. Trabajos previos han mostrado un mayor efecto antiproteinúrico de los IECA en pacientes con genotipo “desfavorable” de la ECA y enfermedad glomerular (72,73). El bloqueo de la mayor síntesis de Ang II en pacientes con genotipo “desfavorable” ha sido el mecanismo aducido. Un efecto similar ha sido observado en la HVI. Sasaki y col. (74) y nuestro propio grupo (75) hemos observado una mayor regresión de la HVI tras tratamiento con IECA en pacientes con genotipo “desfavorable” de la ECA. Por el contrario, en pacientes diabéticos el efecto beneficioso de los IECA parece estar más acentuado en enfermos con genotipos más “favorables” (76,77). El peso de determinados factores ambientales o la interacción de otros polimorfismos en enfermedades poligénicas como la diabetes, pudieran justificar tal controversia. Estos hechos demandan estudios controlados a más largo plazo, con el propósito de que en un futuro, el conocimiento de los distintos genotipos ayude a predecir la respuesta terapéutica del bloqueo del SRA.

### 1.9. Genética del SRA

a) En los últimos años se han ido identificando los diferentes genes que codifican las proteínas responsables del SRA. En estos estudios han sido incluidos los clonajes de dichos genes, lo que ha permitido detectar diferentes polimorfismos en cada uno de ellos.

b) Paralelamente a estos trabajos, han ido surgiendo un sinfín de estudios de asociación entre esos polimorfismos genéticos del SRA y las ECVs, concretamente la de genotipos “desfavorables” y la presencia de enfermedad cardiovascular.

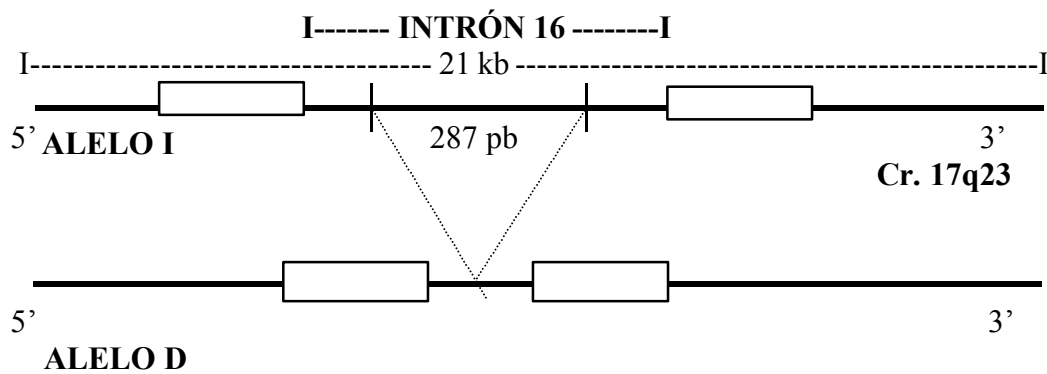
## **2. Descripción de los principales polimorfismos genéticos del SRA implicados en las ECVs.**

### **2.1. Polimorfismo del gen de la enzima de conversión de angiotensina (ECA)**

- La ECA (o kininasa II) es una carboxipeptidasa (dependiente de zinc) ampliamente distribuída por la superficie de las células endoteliales y epiteliales. El gen de la ECA está localizado en el cromosoma 17q23, abarca 21 kb e incluye 26 exones. Su secuencia codificable es de 4.3 kb de longitud y codifica una proteína de 1306 aminoácidos, incluyendo un péptido señal de 29 residuos. Los niveles de ECA en plasma son estables en el tiempo en los individuos, pero hay una marcada variabilidad interindividual. Aproximadamente, el 50% de esta variabilidad se debe a un efecto genético (78).

- El clonaje del gen de la ECA ha permitido detectar un polimorfismo basado en la presencia (inserción= I) o ausencia (delección= D) de 287 pb en el intrón 16 de dicho gen (79,80) (Fig. 4). El polimorfismo sigue características mendelianas y en una población en equilibrio la fórmula de Hardy-Weinberg estima la frecuencia de aparición del alelo I y D.





**Fig. 4.** Presentación esquemática de los alelos I (inserción) y D (delección) del locus del gen de la ECA humana

Un análisis de la secuencia de DNA tanto del alelo I como del D reveló una pareja de secuencias idénticas de 14 bases, con la primera en un extremo del inserto y la otra flanqueando el otro extremo opuesto del inserto (**81**). El reordenamiento de estas dos repeticiones sugiere un posible origen del alelo D. Durante la meiosis, una de estas dos repeticiones podría alinearse con la complementaria de la otra, produciendo un bucle (“loop-out”) con el fragmento de 287 pb. Este patrón polimórfico sugiere que la naturaleza del suceso podría haber sido la delección y no la inserción. La posterior síntesis del DNA tendría entonces lugar sobre la cadena templada más corta.

- El polimorfismo de la ECA se caracteriza por la existencia de tres posibles genotipos en la población general: homocigotos II y DD, y heterocigotos ID. La prevalencia de los diferentes genotipos varía según las características étnicas y geográficas. Así, en Japón el 20% de la población presenta el genotipo DD (**82**), mientras que en Italia es el 40% (**83**), algo similar a la encontrada por nuestro grupo en población canaria, entre un 40-42% (**84**).

- Los individuos DD presentan niveles circulantes y celulares más elevados de ECA y mayor riesgo de enfermedad cardiovascular **(80)**. En relación a esto, el polimorfismo I/D se ha encontrado que está en fuerte desequilibrio de ligamiento con el locus del gen que más controla la ECA en plasma, observándose niveles medios de ECA en sujetos DD aproximadamente el doble que el de sujetos II, teniendo los individuos ID valores intermedios **(80, 85)**. Esto indica que el polimorfismo es codominante, es decir, los efectos de ambos alelos son detectables en los heterocigotos. El polimorfismo de la ECA tiene una asociación significativa no sólo con el nivel en plasma de la ECA, sino también con el intracelular, como se midió por la actividad ECA en linfocitos T **(86)**.

#### 2.1.1 Estudios de asociación.

Las principales ECVs de nuestro interés a las que el alelo “desfavorable” D se ha asociado son:

a) Cardiopatía isquémica/ Infarto de miocardio (IM), sobre todo en pacientes sin los factores de riesgo tradicionales para la enfermedad cardíaca coronaria (bajo nivel de apolipoproteína B e índice de masa corporal y ausencia de farmacoterapia hipolipemiente) **(87-91)**. Hay también trabajos en los que no se ha encontrado dicha asociación **(92-94)**. Un meta-análisis de Samani y col. **(95)**, en el que incluyó 15 estudios y datos de 3394 pacientes con IM, concluyó que el riesgo de IM era 1.26 (95% CI 1.15-1.39,  $P < 0.0001$ ) veces más elevado para el genotipo DD frente a los ID/II. Este trabajo demostró que el genotipo de la ECA podría estar asociado con el IM, pero el impacto del alelo D probablemente sea pequeño.

- b) HVI (84,96-99). Una revisión reciente de Schunkert (100) mostró que la mayoría de los trabajos encuentran una asociación entre la presencia de HVI y el genotipo DD. No obstante, otros grupos no han encontrado tal asociación (101,102).
- c) HTA. El alelo D se ha asociado a algunas complicaciones cardiovasculares derivadas de la HTA, tales como la microalbuminuria (103,104) o la HVI (104). Sin embargo, la hipertensión *per se* no parece estar asociada al polimorfismo del gen de la ECA. Aunque se ha encontrado dicha asociación en varones en algún trabajo previo (105), la mayoría de los mismos son estudios negativos. Esto ha sido observado en varios estudios en humanos de diferentes regiones del mundo (106-109).
- d) Estenosis de arteria renal. Missouri y col. (110) encontraron una asociación positiva con el alelo D en un grupo de pacientes de Inglaterra.
- e) Accidente cerebrovascular (ACV). El genotipo DD se ha observado que es un factor de riesgo independiente para el ACV (111, 112). Otros trabajos, sin embargo niegan la existencia de asociación (113).
- f) Poliquistosis renal. Hay estudios que sugieren que en pacientes con poliquistosis renal y homocigóticos para el alelo D del gen de la ECA, tienen un riesgo mayor de desarrollar una progresión de la insuficiencia renal hacia estadios finales a edades tempranas (114).
- g) Diabetes y progresión de la enfermedad renal. Hay trabajos recientes que demuestran que la principal asociación entre el genotipo DD y la progresión de la nefropatía diabética se observa en enfermos asiáticos con diabetes tipo II (115-118).
- h) Otras entidades con las que se ha asociado la presencia del DD son la progresión de la enfermedad renal en la nefropatía IgA (72), glomerulosclerosis segmentaria focal

(119), y nefroangiosclerosis con HTA (120). Asimismo, también en pacientes con trasplante renal, se ha observado que aquellos con el genotipo DD tienen una peor supervivencia del injerto (121).

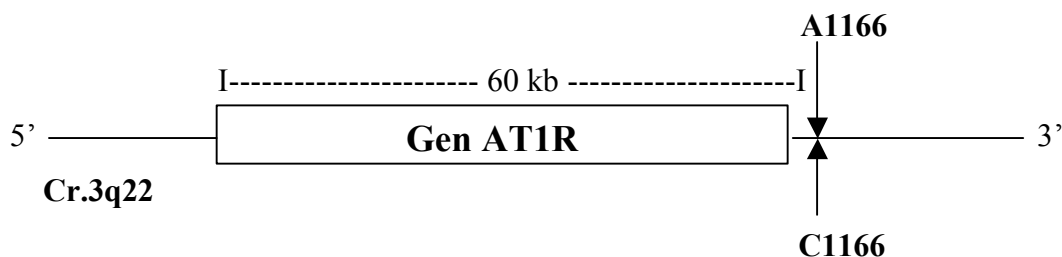
La falta de asociación entre este polimorfismo y la ECV observado por otros autores, lejos de restarle importancia, apuntan la posibilidad de que dicho polimorfismo represente un marcador genético de una mutación permisiva para la aparición de ECV, en otra zona cercana del gen de la ECA. Por otra parte, es posible que para el desarrollo de ECV se requiera la interacción con otros genes del SRA u otros sistemas fisiológicos.

## **2.2. Polimorfismo del gen del receptor de angiotensina II de tipo 1 (AT1R)**

- El cDNA humano del AT1R fue clonado en 1992 (122,123). El gen AT1R humano está presente en una copia sencilla (124), en el cromosoma 3q22 (125), comprendiendo al menos cuatro (126) o cinco (127) exones, y abarca alrededor de 60.000 pares de bases. La secuencia codificante entera está localizada dentro del último exón (126-128). Se han descrito diferentes splicing del cDNA humano del AT1R (128). Debido a la omisión de uno de los exones 5' no traducibles, existen variantes del splicing que se expresan en varios órganos del sistema cardiovascular (126-128). Los exones 2, 3 y 4 sufren splicing alternativo y resulta en la producción de al menos ocho especies diferentes de RNAm. El análisis por transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) ha demostrado que los RNAm que contienen los exones 1 y 5, ó 1, 2 y 5 son los más abundantes en todos los tejidos examinados. El papel de estas diferentes variantes del splicing aún no ha sido explicado. Cada una de ellas incluye el mismo primer exón y de esta forma es conducido por el mismo promotor.

Varios grupos han investigado la secuencia codificante del AT1R para describir polimorfismos y mutaciones puntuales en la secuencia, que interaccionaran con enfermedades cardiovasculares (129-132). Así, en algunas formas de hipertensión, la respuesta funcional a la infusión de Ang II está alterada (133) y se ha sugerido que determinados defectos genéticos en el ATR son responsables de tal alteración. Varios polimorfismos han sido descritos en la región codificante y en la 3' no codificante: T<sup>573</sup>-C, A<sup>1062</sup>-G, A<sup>1166</sup>-C, G<sup>1517</sup>-T y A<sup>1878</sup>-G. Éstos no alteran la secuencia aminoacídica del receptor (129,132). También se ha descrito un polimorfismo de repetición CA en torno a 15 kb “corriente abajo” del final 3' de la secuencia codificante (125).

De estos polimorfismos, el más estudiado es la transversión A→C en la posición 1166 del gen, localizado en la región 3' no codificante. Por ello, cuando aparece el nucleótido adenina se denomina alelo A, y para la presencia de la citosina, alelo C (Fig 5).



**Fig. 5.** Presentación esquemática del polimorfismo A/C1166 del gen AT1R

- Esto hace que se encuentren en la población tres genotipos diferentes con respecto a este polimorfismo: individuos homocigóticos para el alelo A (individuos AA), heterocigóticos (AC) y homocigóticos para el alelo C (CC). La frecuencia alélica

del alelo A en población Europea y Australiana es del 0.70, mientras que para el alelo C está en torno a un 0.30. El porcentaje de individuos AA alcanza valores aproximados entre 50-60% y para los homocigóticos CC está entre el 4-10% de la población **(129, 134,135)**.

- La variante A<sup>1166</sup>→C está localizada en el final 5' de la región 3' no traducible y no se ha demostrado que afecte a la estabilidad del RNAm o su poliadenilación. El polimorfismo no parece ser funcional por sí mismo. Sin embargo, se han descrito asociaciones del alelo C con ECVs. Por ello, se postula que podría estar en desequilibrio de ligamiento con una variante no identificada aún **(129)**.

#### 2.2.1. Estudios de asociación con algunas enfermedades.

- a) HTA. El cambio A<sup>1166</sup>-C mostró un aumento significativo en la frecuencia alélica del C<sup>1166</sup> en sujetos hipertensos **(129,134)**.
- b) Cardiopatía isquémica/ IM. Berge KE y col. **(135)** encontraron que el alelo “desfavorable” C<sup>1166</sup> estaba asociado al riesgo de sufrir infarto de miocardio, pero esto lo observó en sujetos varones con ausencia de factores tradicionales CV. En apoyo a esto, Amant y col. **(136)** asociaron este polimorfismo del AT1R a la vasoconstricción arterial coronaria en sujetos con arterias coronarias normales, algo que puede jugar un papel en la expresión clínica de la arterioesclerosis coronaria, y por ende, en el infarto de miocardio. Nakauchi y col. anteriormente ya habían observado relación entre el alelo AT1R C y la estenosis arterial coronaria **(137)**.

### 2.2.2. Efectos sinérgicos con otros alelos desfavorables del SRA.

- a) Infarto de miocardio. Se ha visto que la interacción entre el polimorfismo DD de la ECA y la variante C<sup>1166</sup> del AT1R aumenta significativamente el riesgo de infarto de miocardio **(138)**. El mecanismo biológico por el cual el genotipo CC, en unión con el DD de la ECA, aumenta el riesgo de sufrir IAM se desconoce. Mientras es bien conocida la asociación del alelo D con la expresión aumentada de ECA, no se ha identificado aún ningún fenotipo intermediario asociado con el alelo AT1R C.
- b) HVI. Hamon y col. **(139)** no encontraron ningún efecto epistático entre el gen AT1R C y el ECA D en la HVI de pacientes con arterias coronarias normales, en población francesa.

### 2.3. Polimorfismo del gen del angiotensinógeno

- El angiotensinógeno (AGT) es el sustrato de la renina y el precursor del péptido angiotensina, la prohormona de la Ang II. Es una proteína sintetizada principalmente en el hígado y su concentración es un factor de grado limitante en la generación de la Ang II **(140)**. El AGT tiene una función reguladora activa tanto a nivel de sangre circulante como local en tejidos, bajo condiciones fisiológicas y patológicas **(54,141-143)**. El análisis de la cinética de la reacción de la renina ha demostrado que la producción de Ang II plasmática es sensible a pequeños cambios tanto en la concentración de renina como de AGT en la circulación **(143)**. Aunque el AGT es principalmente producido en el hígado, el análisis de la distribución de su RNAm ha demostrado que el gen del AGT se expresa en muchos tejidos, incluyendo al cerebro, espina dorsal, aorta, riñón, glándula adrenal, atrio, bazo y tejido adiposo. Como en el plasma, el AGT parece jugar un papel en la regulación local de la producción de Ang II. Un estudio de la cinética de

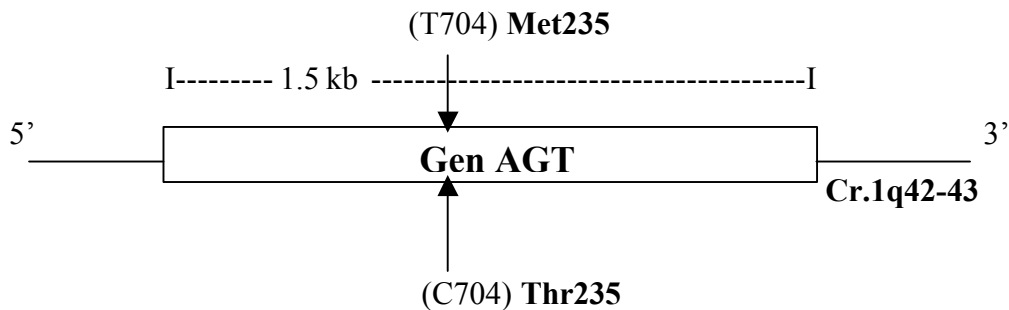
la reacción de la renina en extractos de tejido presentó que la síntesis de Ang II dependía de la disponibilidad local de AGT **(144)**. En un modelo in vivo de hipertrofia cardíaca por sobrepresión, se observó que el nivel de RNAm del AGT era extremadamente bajo en ventrículos de corazones normales, mientras el RNAm aumentó significativamente en los ventrículos izquierdos hipertrofiados **(145)**. Así mismo, en modelos de fallo cardíaco, los niveles de RNAm de AGT estaban especialmente aumentados en corazón y riñón **(146, 147)**. Por otro lado, sus niveles circulantes han sido relacionados positivamente a la presión sanguínea **(148,149)**. Todos estos resultados sugieren que el AGT está implicado en las enfermedades cardiovasculares.

El cDNA del AGT humano tiene 1.455 nucleótidos de largo y codifica para una proteína de 485 aa. El primer exón (37 pb) codifica la región 5' no traducible del RNAm. Hay dos sitios de inicio de transducción (ATG) potenciales, y el segundo exón codifica un péptido señal de 24 ó 33 residuos y los primeros 252 aa (59%) de la proteína madura. El AGT maduro contiene 452 aa; los primeros 10 aa corresponden a la Ang I, y la otra porción más larga corresponde al des(Ang I)AGT. El exón 3 codifica 90 aa y el exón 4 codifica para 48 residuos. El exón 5 contiene una pequeña secuencia codificante (62 aa), seguida de una secuencia 3' no traducible con dos señales de poliadenilación, siendo responsable de la existencia de especies de RNAm diferentes en una longitud de 200 nucleótidos **(150)**.

En un estudio de poblaciones de Francia y Utah (USA) se identificaron 15 polimorfismos de diferente frecuencia del gen del AGT en el cromosoma 1q42-43 **(151)**. Dos de ellos están localizados en el exón 2, consistiendo uno en una transición timina-citosina (T→C) en el nucleótido 704, el cual origina una mutación con sentido



erróneo en la posición 235 de la proteína, de una metionina por treonina (M235T), y el otro provoca una sustitución aminoacídica de una treonina por metionina en la posición 174 (T174M). Ambas mutaciones están en completo desequilibrio de ligamiento. De ellas, el que más interés ha suscitado es el M235T, que demuestra una asociación entre la hipertensión y el AGT plasmático, y ha sido sujeto de muchos estudios de casos-controles (150) (Fig. 6).



**Fig. 6.** Presentación esquemática del polimorfismo M/T235 del gen AGT

- Esta variante génica provoca que hayan tres clases de genotipos en la población: individuos MM (homocigóticos M), individuos MT (heterocigóticos) y otros como TT (homocigóticos T). La frecuencia del alelo M está en torno a 0.50-0.65 en la población blanca, dependiendo de la zona geográfica (152,153). En el caso del alelo T, la frecuencia en población asiática alcanza el 0.75 (154), mientras que en población negra africana alcanza hasta el 0.80-0.85 (155).
- Parece ser que el alelo T235 (desfavorable) se ha asociado a niveles circulantes elevados de AGT (151,154,156), aunque también hay estudios negativos, en alguno de

los cuales se da más importancia a la diferencia en la expresión de AGT en tejidos que la concentración plasmática, como un determinante funcional **(157)**.

### 2.3.1. Estudios de asociación a diversas enfermedades

- a) HTA. Tanto el polimorfismo T174M como el M235T han sido asociados significativamente a la hipertensión arterial **(151,152, 158-160)**. Así mismo, el polimorfismo M235T se ha asociado a esta entidad en diferentes poblaciones, de Japón **(161,162)** y del continente africano **(155)**.
- b) Enfermedad cardíaca coronaria (ECC). Se ha observado que el genotipo “desfavorable” T235 aumenta al doble el riesgo de desarrollar ECC **(153)**. Es improbable que esta asociación esté mediada a través del efecto del locus del AGT sobre el riesgo de hipertensión. Se demostró que dicho efecto era independiente de la presión sanguínea y de la frecuencia del tratamiento antihipertensivo. Es tentador sugerir que el gen del AGT podría por sí mismo tener un papel causal en el desarrollo de la ECC, por estar el alelo T235 asociado con un aumento de las concentraciones de AGT circulante **(151,154,156)**. En este sentido, un reciente estudio de Winkelmann y col. **(163)**, tomando como muestra de estudio pacientes con ECC y un subgrupo de supervivientes de IM, observó una relación entre este polimorfismo, niveles de AGT y la ECC. Este marcador, por tanto, parece identificar individuos con dos veces más probabilidad de desarrollar una ECC que aquellos con valores similares establecidos como de riesgo de ECC **(153)**.

### 2.3.2. Efectos sinérgicos con otros polimorfismos desfavorables del SRA

- a) Nefropatía diabética. En un amplio estudio **(164)** se ha encontrado una interacción entre el polimorfismo ECA I/D y el AGT M235T. Como el AGT M235T puede determinar parcialmente el nivel del AGT, esta interacción sugiere que el nivel del AGT, el precursor de la Ang I, puede también afectar la circulación glomerular de pacientes diabéticos insulino-dependientes, y que este efecto podría sólo ser aparente en sujetos en los que la conversión de Ang I no está fuertemente limitada por la baja disponibilidad de la ECA.
- b) ECC/ IM. Ludwig y col. **(88)** encontraron que los alelos ECA D y AGT 235T estaban estadísticamente asociados con la ECC y el IM, y había una interacción sinérgica entre los dos alelos en pacientes con factores de bajo riesgo para dichas enfermedades.

### 2.4. Polimorfismo del gen de la quimasa cardíaca

Todos los componentes del SRA parecen estar presentes en el corazón humano, indicando que éste no es sólo una diana, sino también un órgano endocrino y paracrino para la Ang II. Se ha visto que a nivel de ventrículos cardíacos, la formación de angiotensina II dependiente de la ECA es menor ( $\approx 10\%$ ) que la síntesis dependiente de quimasa ( $\approx 80\%$ ) **(165)**. Esta observación podría sugerir que la formación de Ang II dependiente de quimasa no está acoplada a la inactivación simultánea de péptidos vasodilatadores, como ha sido demostrado con la ECA, un papel por tanto más consistente con la regulación de la función del miocito que con la regulación de la presión sanguínea **(166,167)**. La quimasa cardíaca es la enzima más eficiente y

específica formadora de angiotensina II descrita (166,167) y el primer miembro caracterizado estructuralmente del grupo de las enzimas denominadas quimasas.

El clonaje del gen de la quimasa cardíaca y de su cDNA ha permitido describir dos regiones polimórficas a las que se han denominado CMA/A y CMA/B. El mecanismo funcional de estos polimorfismos se desconoce por el momento.

### Estudios de asociación

- a) Cardiomiopatía hipertrófica. Pfeufer y col. (168) encontraron una asociación sinérgica entre el polimorfismo ECA I/D y el CMA/B en la cardiomiopatía hipertrófica.
- b) IAM/ Tamaño del corazón /presión sanguínea. Pfeufer y col. (169), siguiendo con los estudios de este polimorfismo, fueron incapaces de identificar alguna asociación entre el mismo y el IAM, ni tampoco demostraron ligamiento entre el locus de la quimasa cardíaca y el tamaño del corazón. Sin embargo, en la misma población sí encontraron asociación entre el polimorfismo de la ECA y el IAM.

## **3. Otros polimorfismos asociados a ECVs**

### **3.1. Polimorfismo del gen b-fibrinógeno**

El fibrinógeno es una glicoproteína de fase aguda y constituye uno de los pilares fundamentales del proceso de la coagulación. Tanto en hombres como en mujeres, la concentración de fibrinógeno aumenta con la edad, la obesidad, el fumar y es más alta en diabéticos que en no diabéticos (170-172). Diversos estudios han establecido una relación entre niveles altos de fibrinógeno y la formación y extensión de la placa de ateroma (39,173). Se ha demostrado que el aumento en sangre de moléculas grandes y

asimétricas como el fibrinógeno, incrementan la viscosidad sanguínea, aumentando el riesgo de formación de trombos (40,174). Sin embargo, si el fibrinógeno es un factor causal o secundario en el desarrollo de la arterioesclerosis y sus complicaciones, todavía es objeto de debate.

La molécula de fibrinógeno está formada por tres cadenas codificadas por diferentes genes, denotados como  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (175). Se han identificado varios polimorfismos en el gen del  $\beta$ -fibrinógeno. Uno de estos es una sustitución de guanina a adenina en la posición -455 (G/A<sup>-455</sup>) (176,177).

El G/A<sup>-455</sup> se ha asociado a variaciones de la concentración de fibrinógeno en plasma (176,178-180), aunque otros autores no lo corroboran (181).

#### Estudios de asociación

- a) Niveles plasmáticos de fibrinógeno / Tabaquismo. Thomas y col. (179) demostraron una interacción entre edad, tabaquismo y frecuencia del polimorfismo G/A<sup>-455</sup>. Por su parte, Behague y col. (176) también observaron una asociación entre algunos polimorfismos del gen  $\beta$ -fibrinógeno (incluido el G/A<sup>-455</sup>) y niveles plasmáticos de la proteína sólo en individuos fumadores.
- b) Enfermedad arterial coronaria (EAC) / IM. Behague y col. (176) encontraron asociación con el grado de EAC evaluada por angiografía coronaria en pacientes con IM y el polimorfismo del gen  $\beta$ -fibrinógeno. En otro estudio, Tybjærg-Hansen y col. (180) no hallaron asociación con la enfermedad isquémica cardíaca y el polimorfismo G/A<sup>-455</sup> en un estudio de 9127 individuos basados en The Copenhagen City Heart Study, aunque sí encontraron asociación con un aumento en los niveles de fibrinógeno en la población general.

### 3.2. Polimorfismo del gen de la glicoproteína plaquetaria IIIa (GPIIIa)

Algunos trabajos indican que el infarto de miocardio y la angina inestable resultan de la formación de un agregado plaquetario en el sitio de ruptura de una placa arteriosclerótica coronaria **(182)**. La formación de tales agregados requiere la unión del fibrinógeno y el factor de von Willebrand a la glicoproteína IIb/IIIa, un receptor de la superficie plaquetaria. Se ha demostrado el beneficio de los inhibidores de la función plaquetaria tanto en la prevención como en la reducción de la mortalidad y morbilidad asociadas con los síndromes coronarios inestables **(183,184)**. Por ello, hay fuertes evidencias de que las plaquetas, y la GPIIb/IIIa en particular, tienen un papel importante en la patogénesis de los síndromes agudos coronarios.

Las glicoproteínas de membrana plaquetaria son altamente polimórficas y pueden ser reconocidas como aloantígenos o autoantígenos. Uno de los sitios polimórficos en la proteína GPIIIa que afectan al sistema de aloantígenos es la Leu 33 **(185)**. El polimorfismo Leu33Pro, resultado de la sustitución de una citosina por timidina **(186)**, se postula que conlleva a un aumento de la unión del fibrinógeno al receptor GPIIb/IIIa, con el consiguiente aumento de la agregación plaquetaria y formación de trombos **(41,187)**.

#### Estudios de asociación

a) Trombosis coronaria / IM. Weiss y col. en 1996 **(188)**, encontraron una alta frecuencia de miembros familiares homocigóticos para la proteína Pro33, en parientes con una prevalencia alta de sucesos coronarios agudos a una edad relativamente joven (antes de los 60 años). Carter y col. **(189)** el mismo año, asoció también el polimorfismo Leu33Pro al IM en un pequeño grupo de hombres jóvenes

(<47 años) que habían sufrido su primer infarto. Así mismo, en otro estudio de Anderson y col. (190) se asoció modestamente esta variante al IM no fatídico.

- b) Rechazo agudo en el trasplante renal. Nuestro grupo ha identificado una asociación del polimorfismo Leu33Pro con el rechazo agudo en población trasplantada de riñón, de tal forma que los pacientes con Pro33 presentan una tasa mayor de rechazos que el resto (191).

### 3.3. Polimorfismo del gen de la apolipoproteína E

La formación y el desarrollo de una lesión arteriosclerótica depende de la presencia de varias condiciones fisiológicas o factores de riesgo, pero es crucial un perfil anormal de partículas lipoproteicas transportadoras de lípidos. Específicamente, se ha demostrado que los altos niveles de lipoproteína de baja densidad (LDL) están asociados con un aumento del riesgo de desarrollo de arteriosclerosis (42). El mecanismo por el cual los niveles anormales de lipoproteínas inducen o aumentan la formación de la lesión arteriosclerótica se desconoce. Sin embargo, se pueden describir algunos de los eventos claves en la formación de la lesión. El suceso que lleva a la formación de una lesión se cree que es algún daño en la capa de células endoteliales que revisten el interior de las arterias. Este daño inicia una respuesta reparadora caracterizada por la infiltración de monocitos y linfocitos T en el espacio bajo la capa de células endoteliales. En presencia de altos niveles de LDL, este proceso de reparación es acompañado por una infiltración de partículas lipoproteicas ricas en colesterol. La cantidad de lípidos que se acumula en el espacio subendotelial está relacionado con la cantidad de LDL en la circulación. Algunas fracciones de estas lipoproteínas pueden llegar a ser dañadas o modificadas por oxidación parcial. La LDL oxidada parece servir

de sustancia quimiotáctil para monocitos y linfocitos adicionales al espacio subendotelial. Esto prolonga y acentúa la respuesta inicial a la pared del vaso dañada **(42)**.

Las condiciones fisiológicas que aumentan el nivel de oxidación de las LDL probablemente aceleran el desarrollo de la lesión. La diabetes, un conocido factor de riesgo para la arteriosclerosis, podría tener su efecto por aumento del daño oxidativo de las LDL.

Las lipoproteínas son partículas esféricas compuestas de una superficie polar de proteína, fosfolípidos y colesterol libre, más una cubierta apolar que contiene ésteres de colesterol y triglicéridos. La función primaria de estas partículas es transportar lípidos, principalmente colesterol y triglicéridos, entre órganos y tejidos. Hay varios tipos de lipoproteínas, caracterizadas por distintas funciones y que contienen grupos específicos de proteínas especializadas llamadas apolipoproteínas. Las partículas LDL son retiradas de la circulación por el receptor de LDL, el cual se encuentra sobre la superficie de todas las células del organismo y particularmente en los hepatocitos. El receptor de LDL se une fuertemente a las partículas de LDL por reconocimiento específico de apolipoproteínas (la apolipoproteína B o en algunos casos la apolipoproteína E) que están presentes sobre la superficie de la partícula de LDL **(42)**.

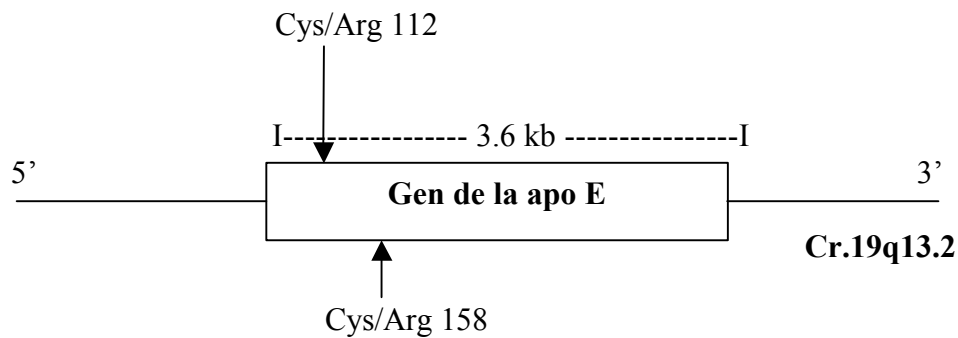
Como ya se describió anteriormente, uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de la arteriosclerosis es el nivel de LDL en la circulación. Por esta razón, algunos de los primeros estudios sobre las anomalías genéticas que afectan a la arteriosclerosis fueron enfocadas hacia los genes que codifican el receptor de LDL y los ligandos de apolipoproteínas para el receptor de LDL, entre los que se encuentran la apolipoproteína E (apo E).



La apo E es un constituyente importante de varias clases de lipoproteínas del plasma, predominantemente lipoproteínas de alta (HDL) y muy baja densidad (VLDL) y quilomicrones (lipoproteínas ricas en triglicéridos). La apoE se expresa notablemente en el hígado y en muchos tejidos periféricos (cerebro, riñón, glándula adrenal, macrófagos, bazo y ovario), donde parece que participa en la redistribución de los lípidos. En el sistema nervioso, la apoE está implicada en el crecimiento y reparación de neuronas dañadas (192,193).

- Los 3.6 kb de largo del gen apo E (cromosoma 19q13.2) produce un RNAm de 1.1 kb, el cuál se encuentra en los tejidos antes mencionados. Codifica para una preproteína de 317 residuos con un péptido señal de 18 residuos. La secuencia entre los residuos 140 y 160 de la proteína madura de 299 aa están implicados en la unión al receptor de LDL. La mayoría de la apo E de la circulación es sintetizada en el hígado. De los 5 mg/dl presentes, el 50% están en las HDL, 10% en las LDL, 20% en las IDL (lipoproteínas de densidad intermedia) y el otro 20% en las VLDL. Es una glicoproteína con una cadena sencilla de carbohidratos unida en posición O en la treonina 194. Estos carbohidratos contienen uno o más residuos de ácido siálico.

- Hay tres isoformas de apoE humana: apoE2, E3 y E4, codificadas por tres alelos diferentes ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$ ) del gen apoE, cuya proporción en individuos de raza blanca es 8, 80 y 12 % respectivamente. Las isoformas difieren en los residuos 112 y 158: la E2 posee Cys 112/Cys 158, la E3 es Cys 112/Arg 158 y la E4 sería Arg 112/Arg 158 (42). Por ello, en la población nos podemos encontrar con seis genotipos: E2/2, E2/3, E2/4, E3/3, E3/4 y E4/4 (Fig. 7), de los cuales los alelos  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$  forman parte del 90 % de los mismos.



**Fig. 7.** Presentación esquemática del polimorfismo E2/E3/E4 del gen de la apo E.

- La variación genética en este locus parece ser que contribuye de una forma marcada a las variaciones interindividuales de colesterol total y niveles de partículas LDL (194-196). El polimorfismo apo E implica la región codificante del gen apo E y resulta en alteraciones del producto génico, el cual, tanto directa como secundariamente, afecta el destino metabólico de las partículas lipoproteicas. La apo E2 tiene una afinidad más baja por el receptor, lo cual resulta en un retraso del aclaramiento plasmático de las partículas lipoproteicas E2. La apo E4 está distribuida de diferente forma que la E3 entre las VLDL y HDL, es degradada más rápidamente que la apo E3 y podría aumentar el catabolismo de las partículas E4, llevando a otras alteraciones en el metabolismo lipoproteico que resultaría en los niveles elevados de LDL (194).

#### Estudios de asociación

a) Enfermedad arterial coronaria (EAC) / IM. Stengard JH (197) observó que el alelo apo E4 (“desfavorable”) era un predictor de muerte por EAC en una muestra de más de 500 hombres finlandeses, a los que siguió durante cinco años. Otro estudio

(198) mostró que la frecuencia del alelo E4 aumentaba linealmente con la gravedad angiográfica de la EAC en ambos sexos (relacionado con el número de vasos dañados). Por otro lado, Nakata y col. (199) aportaron que el alelo E4 era un factor de riesgo genético independiente para la isquemia miocárdica en población japonesa.

- b) Arteriosclerosis. Varios estudios han asociado el polimorfismo E4 con la aparición de arteriosclerosis, entre ellos los trabajos de Davignon y col. (194) y Cattin y col. (200).
- c) ACV. Se ha observado una asociación entre el alelo apo E4 y el ACV (201), aunque otros autores no encuentran tal asociación (202).
- d) En pacientes en hemodiálisis, el alelo  $\epsilon 4$  se ha asociado al desarrollo de dislipemia (203). Así mismo, población portadora de un injerto renal ha mostrado una mayor prevalencia del alelo  $\epsilon 4$ , lo que se ha relacionado con una progresión más acelerada de la insuficiencia renal (204). En estos pacientes, el proceso evolutivo de la nefropatía crónica del injerto se asemeja a los cambios observados en la ateromatosis. De ahí que podría existir una conexión entre el polimorfismo de la Apo E, particularmente el alelo  $\epsilon 4$ , y el desarrollo de nefropatía crónica del injerto. Sin embargo, en la actualidad no existen estudios que demuestren tal asociación.

- Se han llevado a cabo estudios de tratamientos farmacológicos de regulación de los niveles lipídicos plasmáticos y su respuesta teniendo en cuenta el polimorfismo de la apo E. De Knijff y col. (205) en un estudio de 120 pacientes con hipercolesterolemia familiar (HF), observaron que las mujeres con HF y genotipo E3/3 respondían mejor al tratamiento con simvastatina con respecto al colesterol LDL que en hombres con genotipo E3/3. El mismo efecto sobre la HF, pero en varones, fue observado por

Carmena y col. (206). Este grupo encontró que los portadores del alelo E4 respondían peor al tratamiento con lovastatina (inhibidor de la hidroximetil glutaril coenzima A reductasa hepática) para disminuir el colesterol total y los niveles de LDL, pero respondían mejor con respecto a los niveles de HDL. Los varones portadores del alelo E3 ó E2, o mujeres con cualquiera de los genotipos apo E, respondían mejor al tratamiento. Por su parte, Yamada (207) describió que los pacientes dislipémicos con algún alelo E4 respondían menos efectivamente al tratamiento con bezafibrato con respecto al colesterol total y niveles LDL, comparados con los grupos E3 y E2. Sin embargo, en un estudio reciente de Sanllehy y col. (208), no encontró diferencias de respuestas por genotipos apo E en pacientes con HF al tratamiento con lovastatina o gemfibrozil (derivado del ácido fibrico).

### **3.4. Polimorfismo del gen de la metilen-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR)**

La homocistinuria es un error congénito del metabolismo, que cursa con hiperhomocisteinemia ( $\uparrow$ Hcys) y cuya principal característica es producir enfermedad vascular prematura (43,209). Estas observaciones dieron origen a la idea de que la homocisteína (Hcys) podía estar implicada en los mecanismos de la arteriosclerosis. Existen evidencias de que la Hcys podría alterar los mecanismos de la coagulación y la resistencia del endotelio a la trombosis, pudiendo interferir con las funciones vasodilatadoras y antitrombóticas del óxido nítrico (210).

La Hcys es un aminoácido sulfurado, resultante de la intersección de dos vías metabólicas (211), en las que actúan las enzimas metiltetrahidrofolato reductasa o MTHFR y la cistationin- $\beta$ -sintetasa.

Las dos vías metabólicas de la Hcys se pueden interrumpir por defectos genéticos en las dos enzimas, cistationín- $\beta$ -sintetasa y MTHFR (212, 213). Los casos más severos de  $\uparrow$ Hcys se deben a defectos en los genes que codifican las enzimas cistationín- $\beta$ -sintetasa y MTHFR. Goyette y col. (214) mostraron que la mutación C677T en el gen de la MTHFR humana produce una enzima termolábil que puede causar  $\uparrow$ Hcys.

#### Estudios de asociación

Soo-Sang y col. (215) encuentran que la prevalencia de MTHFR termolábil es mayor en pacientes con enfermedad coronaria severa diagnosticada por coronariografía. Fodinger y col. (216) también observaron un aumento de las concentraciones de homocisteína total en pacientes con injerto renal y homocigóticos para la mutación C677 del gen MTHFR.

### **3.5. Polimorfismo del gen del inhibidor del activador del plasminógeno**

El proceso de la fibrinólisis destruye la fibrina formada durante la coagulación. Se caracteriza por la producción de plasmina a partir de un precursor inactivo del plasma, el plasminógeno. La activación de éste se efectúa a través de un activador tisular. Entre los inhibidores de la fibrinólisis se distinguen las antiplasminas (inhibidores de la acción de la plasmina sobre la fibrina) y los inhibidores del activador que cataliza la conversión del plasminógeno en plasmina (217).

Entre los antiactivadores del plasminógeno hay que distinguir el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) (217).

En los últimos años, algunos estudios epidemiológicos han demostrado la

presencia de anormalidades en varios parámetros hemostáticos que podrían ayudar a predecir el riesgo de sucesos isquémicos. La baja actividad fibrinolítica está relacionada con niveles plasmáticos aumentados de PAI-1 y se ha documentado en sujetos que desarrollarían IM **(218)**.

El aumento de los niveles plasmáticos de PAI-1 están relacionados a varios factores antropométricos y metabólicos, de los cuales la constitución corporal, los niveles plasmáticos de triglicéridos y los de insulina parecen ser los más importantes **(219)**. Junto a estas características ambientales hay datos que sugieren que los niveles de PAI-1 podrían estar influenciados por polimorfismos genéticos. El más estudiado es el 4G/5G, con los homocigóticos para el alelo de delección (4G/4G) portando los niveles plasmáticos más altos de este inhibidor **(219,220)**.

#### Estudios de asociación

Enfermedad arterial coronaria (EAC)/ IM. Margaglione y col. **(218)** investigaron un grupo de 1179 individuos sanos y la ocurrencia de EAC en sus familiares de primer grado. Encontraron que en el grupo con familiares con antecedentes de EAC había un número más alto de homocigotos para el alelo 4G del gen PAI-1 comparada con los sujetos sin una historia familiar de EAC.

Por otro lado, en un pequeño estudio de casos-control de infarto de miocardio en sujetos Suecos de menos de 45 años, el alelo 4G se encontró que estaba asociado con un aumento de dos veces el riesgo de trombosis coronaria **(221)**.

#### Efecto sinérgico con otros polimorfismos

Kimura y col. **(222)** observaron que el genotipo DD de la ECA y el genotipo

4G/4G del PAI-1 interaccionan para ser factores de riesgo independientes para la macroangiopatía, pero no para la progresión de la nefropatía diabética, en pacientes diabéticos no insulino dependientes.

Con todo, la influencia del SRA sobre la ECV ha sido la más estudiada en la literatura. Sin embargo, el efecto de los polimorfismos de este sistema y el de la apo E, sobre la aparición de ECVs postrasplante y la nefropatía crónica del injerto, ha sido poco investigada.

---

## ***JUSTIFICACIÓN***



Las complicaciones CV constituyen la causa más importante de morbi-mortalidad (30-40 %) tras el trasplante renal, y es posible que la interacción de factores ambientales y genéticos sea determinante en su aparición.

En estudios previos se ha observado una mayor prevalencia de factores clásicos de riesgo en estos pacientes con respecto a la población general, pero es poco conocido el impacto de factores genéticos sobre la ECV tras el trasplante renal.

El SRA juega un importante papel en el desarrollo de la ECV por las acciones de la angiotensina II sobre las estructuras vasculares. Los genotipos “desfavorables” de los diferentes polimorfismos de este sistema se han asociado con complicaciones CV en diferentes poblaciones. No obstante, si dichos polimorfismos confieren un papel permisivo sobre estas complicaciones en la población trasplantada es poco conocido.

Por otro lado, el polimorfismo de la apo E se ha relacionado a la aparición de ateromatosis. Los pacientes con trasplante renal presentan una alta prevalencia de dislipemia y la nefropatía crónica del injerto remeda el proceso de la ateromatosis. Por ello, es atractivo pensar que este polimorfismo puede ser crucial en la aparición de estas complicaciones.

Con las reservas de los estudios de asociación, identificar una interacción entre factores de riesgo ambientales y genéticos, podría ayudar a confeccionar estrategias preventivas que mitiguen las complicaciones CV en esta población.

---

## ***OBJETIVOS***

1. Analizar la influencia de factores clásicos de riesgo vascular sobre la aparición de primeros eventos CV (IAM, ACV y enfermedad vascular periférica de miembros inferiores) en pacientes con trasplante renal con más de 12 meses de seguimiento.
2. Conocer mediante estudios de asociación el papel de los polimorfismos genéticos del SRA sobre la aparición de primeros eventos CV postrasplante. Los polimorfismos genéticos a estudiar son:
  - Enzima de conversión de la angiotensina (ECA): I/D
  - Receptor de angiotensina II de tipo 1 (AT1R): A<sup>1116</sup>→C
  - Angiotensinógeno (AGT): M235T
3. Averiguar el peso independiente de los factores de riesgo (clínicos y genéticos) sobre la aparición de eventos CV, en función del tiempo de seguimiento postrasplante (con más y con menos de 5 años) y en pacientes sin diabetes antes del implante.
4. Esclarecer la influencia del polimorfismo de la apo E (E3; E4) sobre la aparición de estos eventos CV. Se valorará también secundariamente el papel sobre la dislipemia y la nefropatía crónica del injerto.

---

## ***PACIENTES Y MÉTODOS***

## **PACIENTES**

### **a) Selección de los pacientes**

De los 900 trasplantes renales realizados en el Hospital Universitario de Canarias entre febrero de 1981 y enero de 1998, se seleccionaron en un corte transversal, 207 pacientes consecutivos que recibieron un injerto renal de cadáver y que fueron seguidos en la consulta externa del servicio de Nefrología del Hospital Universitario de Canarias.

Los criterios de inclusión fueron:

- 1) Haber recibido ciclosporina como base del tratamiento inmunosupresor y
- 2) Un injerto funcionante durante al menos 12 meses ( $X: 5.5 \pm 3.3$  años).

Así mismo, se excluyeron todos aquellos pacientes que sufrieron un evento CV mayor (IAM, ACV o arteriopatía severa de miembros inferiores) previo al trasplante. No obstante, los pacientes con datos de enfermedad ateromatosa (soplo o calcificaciones vasculares) pretrasplante fueron incluidos.

### **b) Tratamiento inmunosupresor**

En todos los enfermos se utilizó una pauta de inmunosupresión similar. Ésta consistió en terapia cuádruple secuencial, realizándose la inducción con anticuerpos policlonales equinos (ATGAM, Lab. Pharmacia & Upjohn) seguidos de prednisona, ciclosporina y azatioprina (**223**). En los pacientes de alto riesgo inmunológico (tasa de anticuerpos antilinfocitos >50%) se emplearon anticuerpos monoclonales murinos antiCD3 (OKT3) como tratamiento inmunosupresor de inducción.

La dosis inicial de prednisona fue de 20 mg/día, reduciéndose a 15 mg/día a los tres meses, a 12.5 mg/día a los 6 meses y a 10 mg/día a partir del año del trasplante. La

ciclosporina se administró inicialmente a dosis de 8 mg/kg/día, ajustándose posteriormente según niveles de acuerdo a la práctica clínica habitual.

Los pacientes con rechazo agudo fueron tratados inicialmente con 3 bolus de 500 mg de 6-metil-prednisolona, administrados en días consecutivos. Ante la falta de respuesta clínica o la presencia de un rechazo histológico severo (IIb ó III de la clasificación de Banff-93) (224) se administraba posteriormente OKT3 durante 7 días o se iniciaba una pauta de plasmaféresis.

Se consideró toxicidad aguda por ciclosporina aquella disfunción renal, que una vez descartadas otras causas, respondía a la reducción de la dosis de ciclosporina.

### **c) Características y datos clínicos analizados**

#### ***c.1) Datos demográficos y clínicos***

Tras la revisión de las historias clínicas se recogieron los datos demográficos, antecedentes personales y familiares, y hábitos más comunes de los enfermos. Al mismo tiempo se obtuvieron todas las características clínicas más relevantes de los mismos. Toda esta información se recopiló durante el período comprendido entre enero y diciembre de 1998.

Así, se analizaron los siguientes datos:

- Edad y sexo.
- Enfermedad que le condicionó la insuficiencia renal terminal y tiempo de diálisis.
- Antecedentes de historia familiar y personal de enfermedad cardiovascular.
- Antecedentes de historia familiar y personal de dislipemia.
- Peso, talla e índice de masa corporal (calculado como peso/talla<sup>2</sup>).

- Datos del donante: edad, sexo, origen de la muerte y función renal.
- Datos inmunológicos: compatibilidades e incompatibilidades A-B-DR, número de rechazos e inmunosupresión acumulada, aparición de rechazo crónico o toxicidad crónica por inmunosupresores anticalcineurínicos.

### ***c.2) Factores de riesgo cardiovascular pretrasplante.***

En todos los pacientes se recogieron también todos aquellos factores clásicos de riesgo cardiovascular pretrasplante que incluyeron:

- Hábitos tóxicos: alcohol y tabaco.
- Presencia de diabetes.
- Presencia de dislipemia o historia de ingesta de hipolipemiantes.
- Antecedentes de hipertensión arterial (HTA) o ingesta de medicación antihipertensiva.
- Índice de masa corporal ( $\geq 27 \text{ Kg/m}^2$ ).

Así mismo, se definió:

- Hipertensión arterial como cifras  $\geq 140/90$  mmHg en reposo o uso de medicación hipotensora **(225)**.
- Diabetes: cifras de glucemia en ayuno o tras la ingesta de  $\geq 140$  mg/dl ó  $\geq 200$  mg/dl, respectivamente, o el uso de insulina o antidiabéticos orales **(226)**.
- Dislipemia: estar recibiendo fármacos hipolipemiantes, o una cifra de colesterol  $>240$  mg/dl (hipercolesterolemia), o de triglicéridos  $>175$  mg/dl (hipertrigliceridemia).

**c. 3) Estado cardiovascular pretrasplante.**

En todos los pacientes se evaluó el estado cardiovascular pretrasplante, es decir:

- Antecedentes de cardiopatía isquémica..
- Antecedentes de accidente cerebrovascular (ACV).
- Datos de arteriopatía en miembros inferiores (EEII):
  - Amputación de EEII.
  - Arteriográficos con lesiones estenosantes.
  - Claudicación intermitente.
  - Cirugía de revascularización.
  - Presencia de calcificaciones u otros datos de ateromatosis, como soplos vasculares o ausencia de pulsos periféricos.

**d) Evaluación postrasplante.****d.1) Factores clínicos tradicionales de riesgo cardiovascular.**

Se analizaron también aquellos factores clásicos de riesgo vascular durante la evolución postrasplante, así como la duración del injerto funcionante. Éstos incluyen:

- Hábitos tóxicos: tabaco, alcohol.
- HTA.
- Dislipemia o ingesta de hipolipemiantes.
- Diabetes esteroidea.
- Índice de Masa Corporal (IMC).
- Hipertrofia de ventrículo izquierdo (HVI).
- Tratamiento inmunosupresor acumulado: ciclosporina A y esteroides.



***d.2) Evaluación de eventos cardiovasculares postrasplante y definición de los mismos.***

Al mismo tiempo, se recopiló la aparición de primeros eventos cardiovasculares postrasplante, así como de otros ocurridos durante el seguimiento. Estas complicaciones cardiovasculares fueron definidas acorde a los siguientes criterios (222):

- Enfermedad coronaria cardíaca. Fue definida a su vez como:
  1. Síndrome anginoso: dolor precordial, atribuible a la isquemia miocárdica transitoria, que aparece durante un esfuerzo, estados emotivos o en reposo, generalmente asociado a trastornos electrocardiográficos y que desaparece con la ingesta de nitratos o el propio reposo.
  2. Infarto agudo de miocardio (IAM): necrosis miocárdica definida por criterios clínicos y/o electrocardiográficos.
  3. Necesidad de angioplastia o cirugía de revascularización miocárdica..
- Enfermedad vascular isquémica cerebral. Fue definida como:

Déficit agudo de la función cerebral ( $\geq 24$  horas) de origen isquémico (con o sin secuelas neurológicas), documentado con Tomografía Axial Computarizada (TAC), o pérdida transitoria ( $< 24$  horas) de las funciones cerebrales (isquemia cerebral transitoria).
- Enfermedad vascular periférica de EEII. Definida como:

Historia típica de claudicación intermitente más alguna exploración complementaria confirmatoria, amputaciones de origen isquémico, lesiones arteriográficas estenosantes significativas ( $>50\%$ ), o necesidad de procedimientos de revascularización (endarterectomía, angioplastia o by-

pass).

Así mismo, se registraron las muertes de origen cardiovascular, esto es, aquellas comprobadas por autopsia o acaecidas en las horas siguientes al evento cardiovascular.

#### ***d.3) Parámetros bioquímicos.***

En el análisis de los factores predictores de nuevos eventos cardiovasculares, se empleó el valor medio de los parámetros bioquímicos determinados a los 3, 6 y 12 meses postrasplante. Los parámetros bioquímicos analizados fueron:

- Niveles de hemoglobina y hematocrito.
- Lípidos plasmáticos: colesterol total, HDL-colesterol, triglicéridos, apo A y apo B.
- Ácido úrico plasmático.
- Niveles de glucemia.
- Función renal: creatinina plasmática y niveles de BUN.
- Niveles de ciclosporina.
- Proteinuria en orina de 24 horas.
- Hormona paratiroidea (PTH).

#### **e) Determinaciones bioquímicas**

Las determinaciones plasmáticas generales (creatinina, colesterol, HDL-colesterol, triglicéridos, ácido úrico y glucemia) se realizaron por autoanalizador Hitachi®.

Los niveles de ciclosporina se midieron mediante técnicas inmunométricas utilizando anticuerpos TDX policlonales hasta enero de 1992. Posterior a esa fecha se han venido utilizando anticuerpos TDX monoclonales (Abbot Científica S.A. Barcelona).

Los niveles de apo A y apo B se determinaron mediante el método inmunoturbidimétrico (Roche Diagnostics; Indianapolis, USA).

Los niveles de PTH-intacta se determinaron mediante ensayo inmunoradiométrico (IRMA; Nichols Institute, San Juan Capistrano, California, rango normal 10-65 pg/ml).

#### **f) Diseño del estudio**

El diseño del estudio fue un análisis de casos y controles. Así y acorde a la aparición de las complicaciones cardiovasculares (enfermedad coronaria, vascular cerebral y arteriopatía periférica) durante el seguimiento, los pacientes fueron divididos en dos grandes grupos: aquellos que padecían algún evento cardiovascular y los enfermos que nunca sufrieron estas complicaciones postrasplante renal.

Asimismo, y dada la importante influencia del tiempo postrasplante en la aparición de estas complicaciones, se realizó un análisis pormenorizado de los distintos factores de riesgo en función del tiempo transcurrido tras el trasplante renal:

- a) Pacientes con tiempo de evolución de 1-5 años.
- b) Tiempo postrasplante de más de 5 años.

#### **g) Definición de nefropatía crónica**

Se analizó la aparición de nefropatía crónica en el seguimiento de los pacientes,

definiéndose ésta como la aparición de lesiones histológicas características de la misma (224), asociadas o no a disfunción renal. Estas lesiones histológicas incluyen la presencia de fibrosis intersticial, engrosamiento intimal de arterias de mediano calibre y signos de glomerulopatía del trasplante (asas capilares en doble contorno y ensanchamiento mesangial (224).

#### **h) Estudios ecocardiográficos**

En 139 pacientes se recopiló la información de los parámetros morfológicos y funcionales de los estudios ecocardiográficos realizados en el primer año de seguimiento postrasplante. Estos estudios se realizaron según las recomendaciones de la Sociedad Americana de Ecocardiografía. La masa ventricular fue calculada por la ecuación de Devereux y Reichek (227), referida a la superficie corporal (índice de masa ventricular izquierda: IMVI). Se consideró HVI cuando el IMVI fue mayor de 143 g/m<sup>2</sup> y de 102 g/m<sup>2</sup> en el hombre y mujer, respectivamente (84). Así mismo, un cociente de la onda E (velocidad de vaciamiento pasivo auricular) respecto a la onda A (velocidad de vaciamiento activo) <1 se consideró disfunción diastólica (84).

### **MÉTODOS: TÉCNICAS MOLECULARES**

#### **A) Extracción de DNA de sangre periférica**

Para la obtención del DNA, se extrajeron 3 ó 4 ml de sangre total, que fueron transportados en tubos Venoject<sup>®</sup> conteniendo EDTA como anticoagulante. Esta sustancia inhibe las DNAsas que degradarían al DNA, al ser un quelante del Mg<sup>2+</sup>, cofactor de estas enzimas. El DNA puede obtenerse a partir de cualquier célula nucleada del organismo. Pocos nanogramos de DNA son suficiente para realizar un

análisis genotípico mediante PCR.

Para obtener las células nucleadas y desechar el grupo hemo (ya que inhibe la Taq DNA polimerasa) llevamos a cabo el siguiente protocolo, según métodos standard (228):

- Se pasa la sangre del tubo Venoject<sup>®</sup> a un tubo de mayor volumen (50 ml). Se añade un *buffer* de lisis hemática (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) hasta un volumen total aproximado de 20 ml, para romper los hematíes. Para favorecer esta acción, el tubo se agita un poco y se mantiene a 4 °C unos 15 minutos.
- Se centrifuga a 4°C (2.800 rpm 15 min) y el *pellet* se lava nuevamente con tampón de lisis (volumen total aprox. 5 ml).
- Tras nueva centrifugación, al *pellet* otra vez obtenido se le añade 2.5 ml de *buffer* TEN (10 mM Tris HCl pH 8.0, 25 mM EDTA, 100 mM NaCl) para resuspenderlo.
- A continuación, para romper las membranas de las células blancas se añaden 150 µl de solución detergente dodecil-sulfato de sodio (SDS) 10 %, y para digerir las proteínas 50 µl de proteinasa K (10 mg/ml). Se deja incubando hasta el día siguiente a 37 °C con agitación suave.

Para recuperar los ácidos nucleicos y desechar los restos de membranas y proteínas digeridas, se procede posteriormente a una extracción fenol-cloroformo.

Brevemente, consiste en los siguientes pasos:

- 2.5 ml fenol-cloroformo, agitación prolongada (≈15 min) y centrifugado (2800 rpm, 12°C, 15 min). El fenol es un solvente orgánico, con lo cual arrastrará las proteínas desnaturalizadas hacia la fase orgánica durante la centrifugación,

quedando algunas en la interfase y dejando los ácidos nucleicos en la fase superior acuosa, libres mayoritariamente de proteínas. El cloroformo ayuda a eliminar el fenol de la fase acuosa.

- De la fase acuosa superior se toman con mucho cuidado unos 2 ml y se pasan a otro tubo, en el que se precipita el DNA con 200 µl de acetato de sodio 3 M y 5 ml (o aprox. dos volúmenes) de etanol absoluto y agitando suavemente. La adición de la sal aumenta la fuerza iónica de la solución, lo cual reduce la repulsión de los grupos fosfato cargados negativamente del ácido nucleico, y de esta forma permite replegarse a las moléculas de DNA. El alcohol, por su parte, hace más hidrofóbica la solución y por lo tanto menos capaz de solvatar al ácido nucleico cargado. Estos efectos combinados reducen la solubilidad de los ácidos nucleicos y producen su precipitación.
- La madeja (hebra) de DNA se pasa a un tubo *ependorf<sup>â</sup>*, se lava con etanol 70 % (elimina restos de sales), se centrifuga (1-2 min) y se resuspende en *buffer* TE (10 mM *Tris* HCl pH 8; 1 mM *EDTA*) en un volumen que dependerá del tamaño del *pellet* de DNA obtenido, normalmente entre 150-250 µl de TE. De esta forma, el DNA se puede conservar durante años a 4°C.

## **B) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La PCR es una técnica enzimática, diseñada por K. Mullis y cols. en 1983, que permite fabricar *in vitro* un número teóricamente ilimitado de copias de una secuencia de DNA conocida. Esto permite disponer de forma rápida de cantidades suficientes de una determinada región del DNA para su posterior estudio molecular. Esta simple pero

eficiente técnica, ha revolucionado la biología molecular y muchos aspectos del diagnóstico clínico y forense.

Para la realización de la PCR se requieren unos reactivos básicos que se someten a ciclos repetidos, en los que sólo varía la temperatura de incubación.

### **Ciclos**

Cada ciclo consta de tres pasos o reacciones:

#### 1) Desnaturalización del DNA

Se separan las dos hebras del DNA bicatenario de la muestra, lo que se lleva a cabo calentando a 94 - 95 °C. En el primer ciclo se suele prolongar este calentamiento durante 3-5 minutos, ya que el DNA a desnaturalizar es de gran tamaño. En los ciclos siguientes, donde el DNA a desnaturalizar es el sintetizado en los ciclos anteriores, de pequeño tamaño, es suficiente 94 °C durante 1 minuto.

Si el fragmento de DNA a amplificar es de gran tamaño (por encima de 2000 bases) o es muy rico en C y G, se debe incrementar el tiempo de desnaturalización a 95°C y/o añadir dimetil sulfóxido (DMSO) a la reacción, que ayuda a romper los enlaces  $G\equiv C$ , más fuertes que los  $A=T$ .

- #### 2) Hibridación de los primers o unión de los oligonucleótidos (cebadores) a sus secuencias complementarias del DNA muestra, por descenso de la temperatura (entre 37 y 70 °C). El valor exacto de la misma se calculará en cada caso según la homología entre los primers y el DNA muestra, la longitud de los primers, contenido de G-C, etc. En el caso de los tipajes del AT1R y la apo E, uno de los primers utilizado no tiene 100% de complementariedad con la secuencia del DNA, sino que es un primer mutado. Con este primer mutado se consigue un sitio de

corte para una enzima de restricción para distinguir los alelos del polimorfismo correspondiente.

- 3) Extensión de las cadenas: comprende la síntesis y polimerización de los fragmentos de DNA delimitados por los *primers*, a partir del extremo 3' de éstos, usando la molécula madre como molde. La temperatura se adecúa a 72 °C para que pueda actuar la polimerasa y copiar la hebra de DNA molde. Con este tiempo se consigue amplificar aproximadamente hasta 1000 pares de bases.

Si este proceso se repite un número “n” de veces, al final tendremos dos potencia de “n” ( $2^n$ ) copias de la región de DNA delimitada por los *primers*. Por tanto, a partir de unas pocas moléculas de DNA es posible conseguir, de forma exponencial, cantidades suficientes de un segmento para análisis bioquímico. Si la amplificación fuera 100 % efectiva, entonces el número de moléculas obtenidas se doblaría en cada ciclo (amplificación exponencial) y entonces 30 ciclos producirían una amplificación del orden de miles de millones ( $2^{30} = 1.073.741.824$  copias). Desafortunadamente, la PCR no es perfecta y a partir de 30-35 ciclos se entra en una fase “plateau”, ya que comienza a escasear o desaparecer alguno de los reactivos necesarios, o la enzima es incapaz de sintetizar rápidamente nuevo DNA. A altas concentraciones, el DNA podría comenzar a cebarse a sí mismo y resultaría en la síntesis de productos inespecíficos. La amplificación de esta forma se para o produce amplificaciones inespecíficas después de un cierto número de ciclos. El número de ciclos requeridos para una amplificación óptima varía dependiendo de la cantidad de material de partida y la eficiencia de cada paso de amplificación. Generalmente, de 25 a 35 ciclos deberían ser suficientes para producir 100 ng –1 µg de DNA de una secuencia humana a partir de 50 ng de DNA genómico.



Al terminar el proceso existe una extensión final que se realiza a una temperatura de 72°C durante 20 minutos, para permitir que todas las moléculas que no se han terminado de formar lo hagan.

Estos pasos se repiten cíclicamente en la actualidad mediante aparatos llamados termocicladores. En ellos se combina un calefactor con un refrigerador controlados por un microprocesador. Esto permite la programación de los tiempos y temperatura que deseamos en cada paso, así como el número de ciclos que deseamos que se repitan.

### **Reactivos**

Los reactivos básicos para la PCR son:

- 1º) La muestra o molde de DNA a amplificar.
- 2º) Una enzima, la DNA polimerasa, encargada del proceso de síntesis de las nuevas copias de DNA.
- 3º) Dos oligonucleótidos, llamados cebadores o *primers*, cada uno de ellos complementario a cada hebra del DNA molde al que flanquean (con la secuencia de nuestro interés).
- 4º) Una cantidad abundante de los cuatro deoxinucleótidos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).

#### 1) DNA molde

La muestra para PCR puede ser DNA de cadena simple o doble, o RNA. En este último caso, previamente tenemos que transformarlo en DNA complementario (cDNA) mediante la enzima transcriptasa inversa (RT-PCR).

La PCR tiene dos características importantes:

- Permite trabajar con cantidades mínimas de DNA; en general se utiliza 0,1  $\mu$ g por muestra.
- El DNA no tiene que ser altamente purificado. Por ello, se puede usar una suspensión de células o una muestra tisular. Generalmente se realiza en estos casos una ruptura celular por choque osmótico -con una solución de lisis hipotónica y un detergente - o térmico.

En el presente trabajo se empleó por cada reacción (de acuerdo a su concentración) 1  $\mu$ l del DNA “madre” obtenido con extracción fenol-cloroformo.

## 2) Taq DNA polimerasa

Inicialmente se empleaba un fragmento de DNA polimerasa I de *Escherichia coli*, denominado fragmento de Klenow, cuya temperatura óptima de reacción es de 37 °C. Sin embargo, esta enzima pierde su actividad a la temperatura de desnaturalización usada en la PCR por lo que era necesario la adición de nueva cantidad de enzima tras cada ciclo. Este problema se solucionó en 1988 (229) con la comercialización de una DNA polimerasa procedente de una bacteria termófila, *Thermus aquaticus* (de ahí la denominación de Taq polimerasa), que vive a 70-75 °C en fuentes termales. Esta Taq polimerasa tiene una temperatura óptima de reacción entre 75 a 80 °C, siendo mucho más resistente al calor. De esta forma, pierde parte de actividad en el transcurso de la reacción pero aún mantiene un buen porcentaje (65%) después de muchos ciclos. La heparina parece que inhibe la Taq, de ahí la importancia de recoger la muestra de sangre en un tubo con EDTA como anticoagulante.

En nuestros ensayos hemos empleado una unidad de Taq (Promega<sup>®</sup>) por 50  $\mu$ l de reacción.

### 3) Primers u oligonucleótidos

Para poder sintetizar copias de un determinado fragmento de DNA con la técnica de la PCR, debe conocerse al menos la secuencia de los dos extremos del fragmento. Se sintetizan entonces las secuencias complementarias a cada flanco obteniéndose los dos oligonucleótidos, *primers* o cebadores. Uno de ellos hibridará con la hebra “sense” de DNA molde en sentido 5'→3' según las reglas de complementariedad. El otro *primer* hibridará con la hebra complementaria antisentido. A partir de aquí, la Taq polimerasa podrá llevar a cabo su proceso de síntesis de la cadena complementaria, siempre en dirección 3'→5' del DNA molde y desde el extremo 3' del *primer*.

Para el diseño de los oligonucleótidos se suele tener en cuenta una serie de reglas, como:

- a) El tamaño suele ser de 19 - 25 bases, con lo cual hay una elevada probabilidad de unirse a un solo lugar del genoma humano. Si el tamaño es mayor, la especificidad aumenta.
- b) Se seleccionan secuencias en las que no abunden repeticiones de bases (poliuridinas o polipirimidinas) para evitar la inespecificidad de la amplificación.
- c) Se evitan secuencias que puedan formar estructuras secundarias por sí mismas, pues esto dificulta la unión de los *primers* al DNA muestra.
- d) Se evita que los dos oligonucleótidos tengan complementariedad entre ellos, lo que podría conducir a una autoamplificación.
- e) Se comprueba en banco de datos que las secuencias seleccionadas no están en otro lugar del genoma, lo que podría llevar a amplificar regiones no deseadas.

- f) Se verifica que los *primers* si no pueden ser 100 % complementarios al DNA molde, sí lo sean al extremo 3', por ser éste el lugar de unión de la Taq polimerasa.

### Composición de los primers

Los *primers* usados en el presente trabajo se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ , 100  $\mu\text{M}$  en *buffer* TE. Luego se mezclaron en alícuotas a 25  $\mu\text{M}$  c/u, conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las secuencias utilizadas para cada uno de los polimorfismos estudiados fueron:

- Genotipo ECA.

ACE-1: 5' GCC CTG CAG GTG TCT GCA GCA TGT 3'

ACE-2: 5' GGA TGG CTC TCC CCG CCT TGT CTC 3'

- Genotipo AGT.

AGT-1\*: 5' CAG GGT GCT GTC CAC ACT GGACCC C 3'

AGT-2: 5' CCG TTT GTG CAG GGC CTG GCT CTC TCT 3'

- Genotipo AT1R.

AT1R-1\*: 5' AGC ACT TCA CTA CCA AAT GGG C 3'

AT1R-2: 5' TCT GAC ATT GTT CTT CGA GCA G 3'

- Genotipo ApoE.

ApoE4-1\*: 5' GCC CGG CTG GGT GCG GAC ATG 3'

ApoE4-2\*: 5' GAG GTG CAC CCG CAG CTC CTC 3'

\* *primer* mutado en la base subrayada.

### Elección de los primers

- Para el polimorfismo de la ECA se tomó la secuencia de *primers* de Lindpaintner y cols. (92).
- En el caso del tipaje del AGT se tomaron de referencia las secuencias de *primers* publicadas por el grupo de Russ y cols. (230), así como el resto de su metodología.
- Los *primers* para tipar el polimorfismo del AT1R, fueron diseñados por nuestro grupo buscando las secuencias adecuadas en Gen Bank y siendo uno de ellos mutado en la 3ª base a partir del extremo 3'. Así se creó una diana de restricción para la Hae III.
- Así mismo, para el tipaje del polimorfismo de la apo E también se usaron *primers* diseñados a partir de la secuencia del gen, obtenida en Gen Bank, y elegidas sus secuencias por nuestro grupo. Se determinó que los *primers* fuesen mutados, de tal forma que se crease una diana de restricción para la Cfo I.

### 4) Otros reactivos

Aparte de los reactivos citados, la solución en la que se realiza la PCR debe contener :

- Los cuatro deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs): dATP, dCTP, dGTP y dTTP. El stock de cada uno se sirve a 100 mM y se conservan a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Luego se alicuotean en mezclas de los cuatro a 2.5 mM. En la PCR se usan a una concentración final de 100  $\mu\text{M}$ .

- Un tampón adecuado: normalmente Tris-HCl, de pH 9 a temperatura ambiente. Su concentración suele hallarse alrededor de 10 mM, con lo que se consigue mantener un pH óptimo.
- KCl: generalmente utilizado a una concentración final de 50 mM.
- MgCl<sub>2</sub>: habitualmente utilizado a una concentración final de 1,5 mM. Este parámetro es muy importante en la PCR ya que afecta seriamente la especificidad de la amplificación. Un exceso de Mg<sup>++</sup> produce amplificaciones inespecíficas y una concentración insuficiente produce un menor rendimiento. Por otra parte la cantidad de Mg<sup>++</sup> debe ir relacionada con la concentración de los cuatro dNTP; si se aumenta la concentración de los dNTP por encima de 200 μM, hay que aumentar la concentración del ion ya que los dNTP quelan parte del mismo.

### Protocolo de PCR

El protocolo general que se siguió para cada muestra fue el siguiente :

|                                   |       |
|-----------------------------------|-------|
| H <sub>2</sub> O.....             | 30 μl |
| Buffer 10x PCR* .....             | 5 μl  |
| dNTPs a 2.5 mM.....               | 2 μl  |
| mezcla <i>primers</i> a 25 μM c/u | 1 μl  |
| Taq - DNA polimerasa.....         | 1 μl  |
| polymejor.....                    | 10 μl |
| DNA.....                          | 1 μl  |

V<sub>final</sub>= 50 μl

\* (MgCl<sub>2</sub>, KCl, Tris HCl)

En el caso del polimorfismo apo E, se le añade además a la mezcla 2.5  $\mu$ l. de DMSO, al ser una zona del DNA a amplificar rica en enlaces G $\equiv$ C, con lo cual se le resta esta cantidad al agua y se añadirían sólo 27.5  $\mu$ l de la misma, para completar el volumen final de 50  $\mu$ l.

Finalmente, a cada tubo de muestra se le añade una gota de aceite mineral, para evitar la evaporación de las muestras durante la PCR. Actualmente ya se disponen de termocicladores que llevan incorporados bloques térmicos en sus tapas, que se ponen en contacto con la parte superior de los tubos de PCR, y por consiguiente evitan la evaporación de la muestra, ahorrándonos el uso del aceite mineral y facilitando la posterior manipulación del producto de PCR.

Condiciones de temperatura : Esquema general

|                           |                                      | <u>Nº ciclos</u> |
|---------------------------|--------------------------------------|------------------|
| Ciclo inicial:            | 95 °C 3 min                          | 1                |
| Ciclo de hibridación:     | 94 °C 1 min (desnaturalización)      | 30               |
|                           | Temp.hibridación 1 min (hibridación) | 30               |
|                           | 72 °C 1 min (extensión)              | 30               |
| Ciclo de extensión final: | 72 °C 20 min                         | 1                |

En el caso del tipaje del polimorfismo de la apo E, por los enlaces G $\equiv$ C, el tiempo del ciclo inicial es de 5 min, 95 °C.

Las temperaturas de hibridación, en cada PCR en particular, fueron las siguientes:

| PCR             | Temperatura de hibridación (°C) |
|-----------------|---------------------------------|
| Polimorf. ECA   | 62                              |
| Polimorf. AT1R  | 60                              |
| Polimorf. AGT   | 70                              |
| Polimorf. apo E | 68                              |

### Digestión con enzimas de restricción

Excepto para el polimorfismo de la ECA, los productos de PCR de los otros tres polimorfismos estudiados, antes de la electroforesis deben pasar por un proceso de digestión con enzimas de restricción, las cuales reconocen determinadas secuencias diana del DNA y lo cortan por dicha secuencia. Si la secuencia del sitio polimórfico de un determinado alelo coincide o está incluida en la secuencia diana para una determinada enzima de restricción, ésta puede ser utilizada para distinguir los alelos que determinan el polimorfismo, por la presencia o no de la diana de restricción, lo que provocaría el corte o no del DNA, distinguiéndose dos alelos.

En el caso del polimorfismo AT1R se ha usado un *primer* mutado en la PCR, es decir, el AT1R-1 (*ver composición de los primers*) se ha diseñado de tal forma que la antepenúltima base del *primer* no es complementaria con la secuencia de la cadena molde. Esto no impide que el resto del *primer* hibride bajando un poco la temperatura, pero la presencia de esa base mutada provoca la aparición de una diana de restricción (reconocida por la enzima Hae III como GGC/C) en el producto amplificado, en uno de



los dos alelos que definen al polimorfismo AT1R, que puede ser diferenciado del otro alelo porque es cortado por la enzima de restricción. En este caso, si aparece el cambio A→C del alelo C (“desfavorable”), la citosina completa la diana de restricción (GGC↓C) y el alelo C es cortado por Hae III en dos trozos que se detectan por diferencia de tamaño en la electroforesis. Sin embargo, si el producto amplificado en la PCR corresponde con el alelo A (“favorable”), la adenina ya no completaría la diana de restricción (GGCA) y la enzima no cortaría, quedando intacto el DNA, cuyo tamaño correspondería con la suma de los dos trozos cortados en el alelo C. De esta forma, tanto el alelo A como el alelo C se pueden diferenciar por tamaños en la electroforesis, para el tipaje de cada individuo.

El *primer* AGT-1 (*ver composición de los primers*) para el tipaje del polimorfismo del AGT también es mutado por la misma razón que para el tipaje del AT1R, pero se utiliza la enzima Tth 111I (GACN↓NNGTC).

En el caso del polimorfismo de la apo E, los *primers*, en condiciones normales, tienen una diana de restricción para la misma enzima (Cfo I: GCG↓C) que detecta el sitio polimórfico. Por lo tanto, los *primers* hemos de diseñarlos con una base mutada en el sitio de la diana, porque de no ser así, serían cortados también por la enzima de restricción usada para diferenciar los alelos E3 y E4, y aparecería un patrón de bandas más confuso para su lectura en la electroforesis. En este caso, la Cfo I detecta el cambio Cys→Arg que caracteriza al polimorfismo, o sea, al alelo E4, y deja intacto al alelo E3 y a los propios *primers*.

En los polimorfismos aquí estudiados, la diana de restricción coincide en el alelo “desfavorable”, pero esto no es norma general, ya que en el caso de otros

polimorfismos, el alelo “favorable” es el que incluye la diana de restricción para la enzima y es cortado por la misma.

Los protocolos que se siguieron para la digestión de los productos de PCR con enzimas de restricción fueron los siguientes:

|                                      | <b>AT1R</b>    | <b>AGT</b>     | <b>apo E</b>   |
|--------------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| <b>H<sub>2</sub>O (ml)</b>           | 11.9           | 9.5            | 5.5            |
| <b>Buffer (10x) (ml)</b>             | 2              | 2              | 2              |
| <b>Espermidina (50 mM) (ml)</b>      | 1.6            | 1.6            | 1.6            |
| <b>DTT (0.1M) (ml)</b>               | 0.2            | 0.2            | 0.2            |
| <b>BSA (10 mg/ml) (ml)</b>           | 0.2            | 0.2            | 0.2            |
| <b>Enzima restricción [u/ml]</b>     | Hae III [40]   | Tth 111I [10]  | Cfo I [10]     |
| <b>(ml)</b>                          | 0.125          | 0.5            | 0.5            |
| <b>DNA (ml)</b>                      | 7              | 6              | 10             |
| <b>T<sup>a</sup> (°C) incubación</b> | 37             | 65             | 37             |
| <b>Tiempo (h)</b>                    | 24<br>(mín. 4) | 24<br>(mín. 4) | 24<br>(mín. 4) |

DTT: ditioneitol. Agente reductor que impide la oxidación de la enzima de restricción.

BSA: albúmina de suero bovino.

El DTT, la BSA y la espermidina se ha visto empíricamente que mejoran la calidad de la digestión, aunque se desconoce aún el mecanismo de acción.

Las enzimas de restricción fueron adquiridas de Promega<sup>®</sup> con su correspondiente *buffer* enzimático.

En el caso del polimorfismo de la ECA, el tipaje se lleva a cabo separando los productos de PCR directamente en la electroforesis, sin necesidad de digerirlo previamente con enzimas de restricción, ya que el polimorfismo consiste en la presencia o no (inserción/delección) de una secuencia de 287 pb en el intrón 16, con lo cual los alelos se pueden diferenciar por tamaños en la electroforesis.

### **C) Electroforesis**

La electroforesis es una técnica de separación de partículas (moléculas o iones) con cargas eléctricas, en base a la distinta velocidad que alcanzan en un campo eléctrico. Para detectar el fragmento de DNA amplificado por PCR se somete el producto de esta reacción a una electroforesis en gel de agarosa o de poliacrilamida. Durante la misma, los fragmentos obtenidos por PCR migran a través de un soporte (gel) según su tamaño y su carga eléctrica.

En general, las partículas a separar han de cumplir las siguientes condiciones:

- Que tengan diferentes movilidades electroforéticas (velocidad que alcanza la partícula por unidad de campo eléctrico).
- Forma y carga de la partícula.
- También influye la viscosidad del medio.

Campo eléctrico: la corriente eléctrica utilizada en la electroforesis es de carácter continuo, siendo el sentido de la misma desde el polo (-) o cátodo, al polo (+) o ánodo.

En el caso de separaciones de ácidos nucleicos, a pH en torno a la neutralidad, éstos, al estar cargados negativamente (por los grupos fosfato) migrarán del polo (-) al polo (+).

Las intensidades más utilizadas son:

- Entre 10-40 volt./cm para macromoléculas.
- Y unas intensidades sobre 10 veces mayores para moléculas pequeñas.

Generalmente, a menor voltaje, menor movilidad de las partículas.

En el proceso de electroforesis, en los electrodos se producirá hidrólisis del agua. En el cátodo se liberarán sobre todo protones ( $H^+$ ). En el ánodo se producirán mayoritariamente aniones ( $OH^-$ ). Esto puede variar continuamente el pH del medio y afectar el movimiento de las partículas, debido a que el pH influye sobre la carga de la partícula (normalmente el pH idóneo para electroforesis ha de estar entre 6 y 8). Para evitar esto usamos grandes cantidades de tampón diluídos (buffer TBE).

El medio a través del cual van a moverse las partículas para separarse es un medio en el que la movilidad es buena, pero que no sea muy líquido. Para ello se utilizan los llamados geles, que son polímeros hidrofílicos que forman un entramado tridimensional (red o malla). A nivel molecular permiten gran movilidad de las partículas a su través. A nivel macroscópico mantienen la forma sólida. Un ejemplo de geles son los de agarosa, formados en un 99.5 % por agua; o los geles de poliacrilamida (también llamados de acrilamida), en un 65-95 % de agua.

Las moléculas pequeñas atravesarán con facilidad la red tridimensional. Las moléculas grandes quedarán frenadas por la malla. Por su parte, las moléculas intermedias atravesarán con lentitud la red.

### Propiedades de los geles.

- El gel ha de ser inerte, es decir, no debe interactuar ni con las moléculas de la muestra ni con las del medio.
- Deben ser estables, tanto bioquímica como mecánicamente.
- Deben permitir la detección de las moléculas separadas.

En los geles de agarosa y poliacrilamida se pueden controlar con gran precisión el tamaño de los poros de la malla. En función del problema concreto que queramos separar podemos obtener geles de diferente tamaño de poro y de esta manera cubrir un rango grande de pesos moleculares.

#### **C.1) En gel de poliacrilamida**

En esta técnica, los fragmentos obtenidos van a avanzar con una velocidad de migración ( $V$ ) que dependerá de la fuerza del campo eléctrico ( $E$ ), la carga eléctrica neta ( $Z$ ) y la resistencia de fricción ( $f$ ), según la relación :

$$V = \frac{E \times Z}{f}$$

La resistencia de fricción es una función del tamaño y la forma de la molécula y es una fuerza que limita la velocidad de migración.

En relación al campo eléctrico, su fuerza es definida por la longitud del gel y la diferencia de potencial. Al aplicarse a las moléculas de DNA, éstas (por la carga negativa de sus grupos fosfato) migrarán hacia el polo positivo (ánodo). Como la relación carga/masa es la misma para DNA de diferente longitud, el factor determinante que afectará el paso a través del gel será el tamaño del DNA. Para que la separación sea

efectiva en geles de poliacrilamida, los fragmentos de DNA deben ser menores a 1000 pb.

Una vez colocada en el gel la muestra problema de DNA y comenzar la electroforesis, las partículas se irán separando por tamaños e irán formando durante la migración a través del gel, una serie de bandas en las que la del nivel inferior (“abajo”) serán las menos pesadas y por tanto avanzan más rápido, y las bandas del nivel superior (“arriba”) las más pesadas y las que migran más lento. El conjunto de bandas forman la llamada “pauta en escalera” o patrón de bandas. En la parte superior del gel las bandas se separarán con más dificultad que en la parte inferior, donde la separación es mayor.

Para poder visualizar estas bandas (hasta aquí son invisibles) se usa el bromuro de etidio (BrEt), un agente intercalante que se une a las moléculas de DNA mediante interacciones hidrofóbicas (se intercala entre la doble cadena del DNA). Cuando el BrEt está muy empaquetado con el DNA en un entorno hidrofóbico, al iluminarlo con luz U.V. emite fluorescencia. El BrEt es un potente agente carcinogénico.

Otros parámetros que van a afectar la migración de DNA a través del gel son:

a) La concentración de acrilamida:

Los geles de acrilamida se suelen usar para partículas entre 6 pb (gel al 20% de acrilamida) hasta ácidos nucleicos (a.n.) de aproximadamente 1 Kb (gel al 3%).

Pueden separarse a.n. que difieren tan solo en una base.

Los geles se obtienen por polimerización química de la acrilamida.

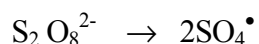


Acrilamida

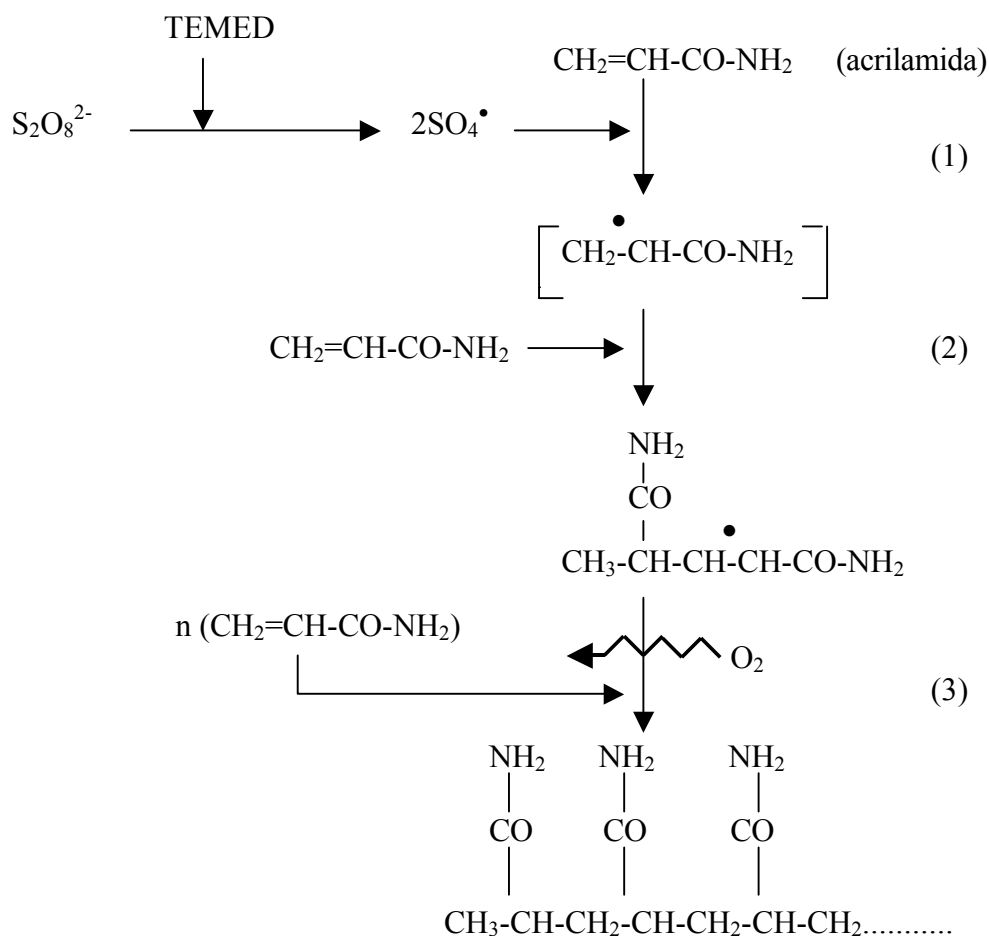
Estos geles son hidrofílicos. Tienen una estructura polimérica formada por “n” moléculas del monómero. La reacción de polimerización transcurre a través de un mecanismo en el cual actúan radicales libres. Se forman cadenas lineales que no interaccionan unas con otras. Pero para formar el gel es necesario que se crucen entre sí dichas moléculas lineales. Para ello se usa un derivado de la acrilamida: el NN'-metilén-bis-acrilamida. Donde entra esta molécula, se unen dos cadenas de poliacrilamida.

El tamaño del poro dependerá de la cantidad de acrilamida que añadamos y también de la cantidad de puentes de cruce (bisacrilamida).

El método que se suele utilizar para producir radicales libres necesarios para comenzar la polimerización es añadiendo persulfato amónico (APS), que en disolución forma radicales libres sulfato.



En esta reacción hay un catalizador de formación de radicales libres sulfato y es el tetrametil-disulfato (TEMED 0.04%). El esquema de la reacción es el siguiente:



- (1) Formación del radical libre.
- (2) Adición a una segunda molécula de acrilamida.
- (3) Polimerización (poliacrilamida).

La reacción de radicales libres termina cuando el material a polimerizar se ha agotado o cuando entra otra reacción que compita con ésta. El O<sub>2</sub> que difunde a través del gel inhibe la polimerización (igual el O<sub>2</sub> atmosférico). Asimismo, aumentando la temperatura se logra que la reacción de polimerización sea más rápida. Un dato importante a tener en cuenta es que la acrilamida sin polimerizar o en polvo es muy neurotóxica.



El tamaño de los poros u orificios del gel va a depender de estos parámetros vistos:

- cantidad de acrilamida utilizada por unidad de volumen.
- proporción acrilamida : bis.

Por ello, se sigue la siguiente tabla de concentraciones óptimas de acrilamida en función de los fragmentos de DNA a resolver:

| ACRILAMIDA (%) | TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS A SEPARAR (pb) |
|----------------|---|
| 3,5            | 100 a 1000                              |
| 5              | 100 a 500                               |
| 8              | 60 a 400                                |
| 12             | 50 a 200                                |
| 20             | 5 a 100                                 |

Los geles utilizados en nuestro estudio para el tipaje de los polimorfismos fueron al 5 % de acrilamida ya que el tamaño de los fragmentos a separar era entre 141 pb (alelo AGT T235) y 597 pb (alelo ECA I). En el caso del tipaje del polimorfismo de la apo E se usaron geles al 8 % de acrilamida (alelo E4 de 78 pb).

#### b) Buffers de electroforesis

Tienen como función :

- \* mantener constante el pH.
- \* conducir la corriente.

Los buffers más usados son Tris acetato (TAE) y Tris borato (TBE). Este último es el buffer utilizado en todas las electroforesis en acrilamida realizadas en este estudio, en una concentración final 1X.

## Técnica

### Preparación de soluciones stock:

#### 1. Acrilamida 30 %

|                              |        |
|------------------------------|--------|
| acrilamida                   | 29 g   |
| N,N'- metilen bis acrilamida | 1 g    |
| H <sub>2</sub> O csp         | 100 ml |

Se prepara por pesada directa, con la única precaución de manipular con cuidado –bajo campana, con guantes y mascarilla– la acrilamida, por su toxicidad. Se guarda a 4 °C.

#### 2. Buffer de electroforesis Tris- borato 5 X (TBE 5X)

|                      |         |
|----------------------|---------|
| Tris base*           | 54 g    |
| Acido bórico         | 27.5 g  |
| EDTA                 | 3.7 g   |
| H <sub>2</sub> O csp | 1000 ml |

(\* Tris hidroximetil aminometano)

## 3. Persulfato de amonio 25 %

|                      |       |
|----------------------|-------|
| Persulfato de amonio | 2.5 g |
| H <sub>2</sub> O csp | 10 ml |

Una vez preparada esta solución se congela y se descongela en alícuotas, que se mantienen a 4 °C, por un período aproximado a una semana.

## 4. Bromuro de etidio 1 mg/ml

|                      |       |
|----------------------|-------|
| Bromuro de etidio    | 10 mg |
| H <sub>2</sub> O csp | 10 ml |

Esta solución se guarda a 4 °C y protegida de la luz.

Preparación del gel

Se limpian con etanol dos placas de vidrio cuadradas. Entre ambas, en los laterales y parte inferior, se colocan separadores finos y luego se pinzan para evitar el escape de la acrilamida.

Se calcula la cantidad de reactivos necesarios para preparar el gel con la concentración deseada. En nuestro estudio utilizamos geles al 5 % de acrilamida. Para ello empleamos:

|                        |         |
|------------------------|---------|
| TBE 5X                 | 4.5 ml  |
| Acrilamida 30 %        | 3.75 ml |
| H <sub>2</sub> O hasta | 22.5 ml |

Se calienta ahora esta mezcla un poco en el microondas (aproximad. 45 °C) y se le añaden los catalizadores:

|       |       |
|-------|-------|
| APS   | 50 ul |
| TEMED | 10 ul |

Acto seguido, la mezcla de reactivos se añade entre los vidrios y se coloca una plantilla en forma de peine para formar los pocillos. Se deja en posición horizontal alrededor de 20 minutos para que polimerice.

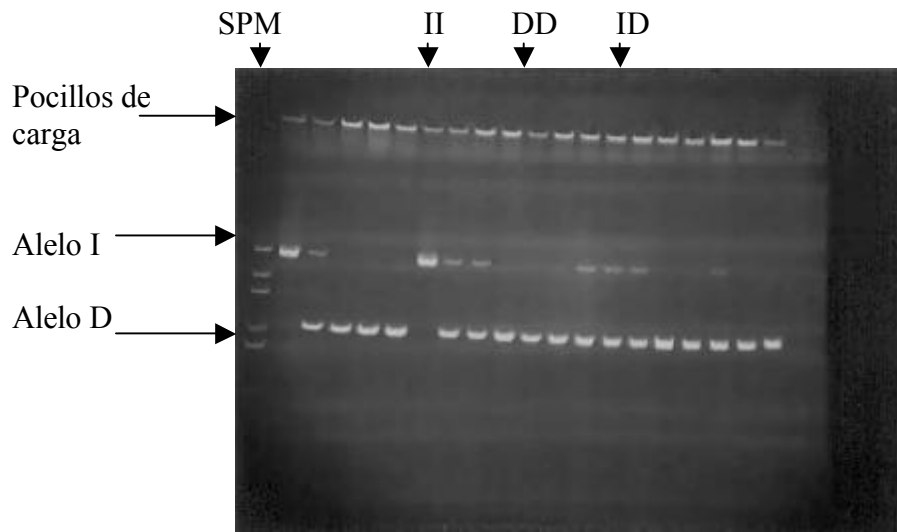
Se retira el peine y el separador inferior y se sujetan las placas en una cubeta de electroforesis que contiene TBE 1X. En cada pocillo, una vez lavados con el buffer TBE, se colocan 20 µl del producto de digestión (o según el estudio, 10 µl del producto de PCR) de cada muestra. En el primer pocillo cargamos el standard de tamaño molecular.

#### Electroforesis y lectura

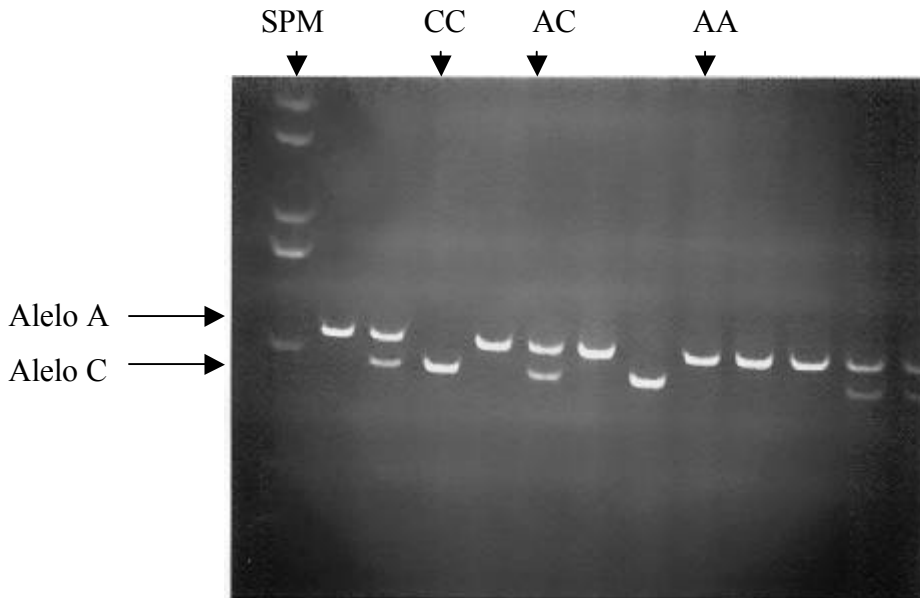
La cubeta de electroforesis se conecta a un voltaje de unos 120 V durante aproximadamente dos horas y media.

Posteriormente, se retira el gel y se tiñe en una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml) durante unos 10 minutos. Este reactivo permite visualizar el DNA ya que se intercala entre las bases de los ácidos nucleicos y fluoresce rojo-naranja cuando es iluminado con luz ultravioleta en un transiluminador.

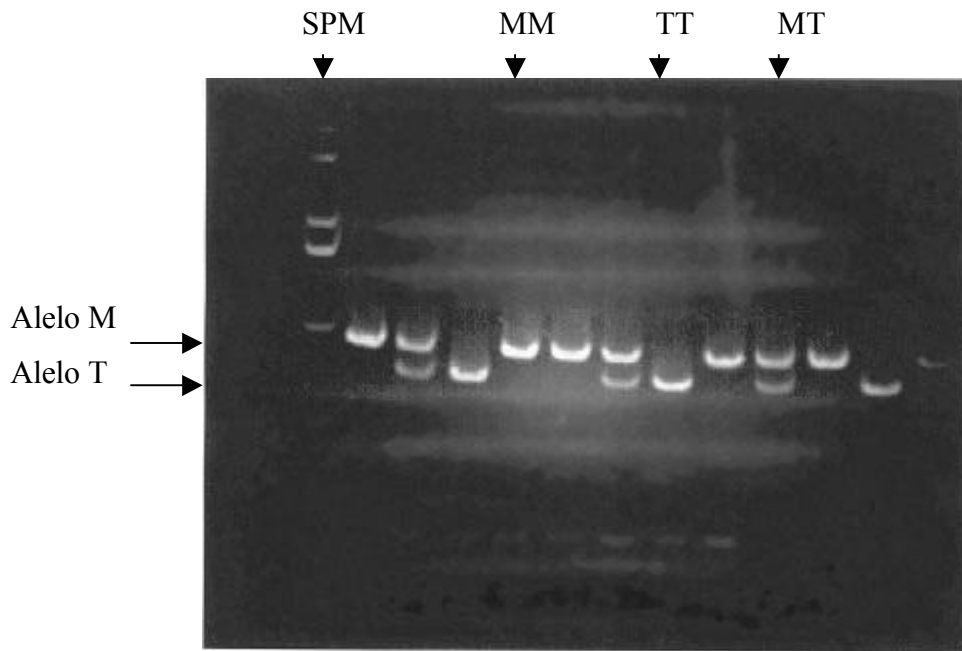
Para documentar los resultados, se obtuvieron fotografías de los geles. En las figuras 8, 9, 10 y 11 se muestran los estudios electroforéticos en gel de poli(acrilamida) de los polimorfismos estudiados.



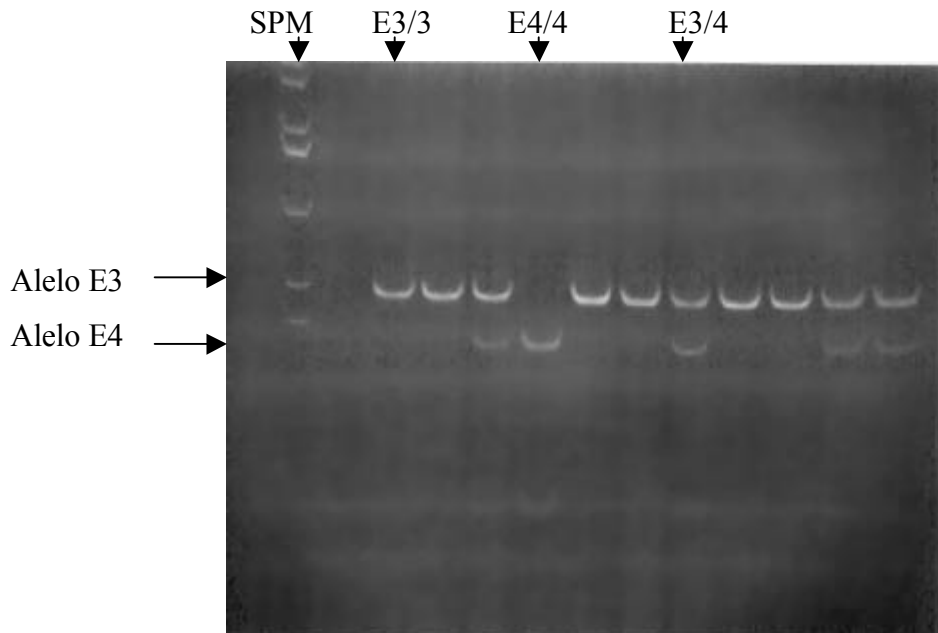
**Fig. 8.** Electroforesis en gel de poliacrilamida para el genotipaje del polimorfismo de la ECA. Se pueden observar los 3 tipos de genotipos: individuos II, DD e ID. En la primera calle aparecen los diferentes tamaños del estandar de peso molecular (SPM).



**Fig. 9.** Electroforesis en gel de poliacrilamida para el genotipaje del polimorfismo del AT1R. Se observan los 3 tipos de genotipos: individuos AA, CC y AC. SPM: estandar de peso molecular.



**Fig. 10.** Electroforesis en gel de poliacrilamida para el genotipaje del polimorfismo del AGT. Se observan los 3 tipos de genotipos: individuos MM, TT y MT. SPM: estandar de peso molecular.



**Fig. 11.** Electroforesis en gel de poliacrilamida para el genotipaje del polimorfismo de la apo E. Se observan los 3 tipos de genotipos: individuos E3/3, E4/4 y E3/4. SPM: estandar de peso molecular.

### Tamaños moleculares de los fragmentos de cada polimorfismo estudiado

| Polimorfismo | Alelo favorable (pb) | Alelo desfavorable (pb) | Enzima restric. |
|--------------|----------------------|-------------------------|-----------------|
| ECA          | I (597)              | D (319)                 | —               |
| AT1R         | A (182)              | C (161+21)              | Hae III         |
| AGT          | M (165)              | T (141+24)              | Tth111 I        |
| apo E        | E3 (108)             | E4 (78+30)              | Cfo I           |

#### C.2) En gel de agarosa

La agarosa es un polisacárido lineal que al polimerizar genera una malla de poro mayor que la acrilamida. Por esto, este tipo de geles es usado para separar grandes fragmentos de DNA, en general mayores que 1000 bp. El rango de migración electroforética del DNA en estos geles dependerá especialmente de los siguientes parámetros :

- a) Tamaño molecular del DNA: la migración a través de la matriz del gel es inversamente proporcional al  $\log_{10}$  del peso molecular.
- b) La concentración de agarosa: hay una relación lineal entre el logaritmo de la movilidad electroforética de DNA ( $\mu$ ) y la concentración del gel ( $r$ ), lo cual es descrito por la ecuación:

$$\log \mu = \log \mu_0 - K_f r$$

donde  $\mu_0$  es la movilidad electroforética libre y  $K_f$  es el coeficiente de retardo, constante relacionada con las propiedades del gel, así como la medida y forma de

las moléculas que migran. De esta forma, usando diferentes concentraciones de geles, se pueden separar un amplio rango de fragmentos de DNA:

| AGAROSA (%) | TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS A SEPARAR (kb) |
|-------------|---|
| 0.3         | 60 – 5                                  |
| 0.5         | 30 – 1                                  |
| 0.7         | 12 – 0.8                                |
| 1.0         | 10 – 0.5                                |
| 1.2         | 7 – 0.4                                 |
| 1.5         | 3 – 0.2                                 |

- c) La conformación del DNA: se ha visto que el DNA según sea su forma (circular, mellado o lineal), con igual peso molecular, migra diferente en los geles de agarosa. La movilidad relativa de las tres formas se ve influenciada por la densidad de superhélices en la forma circular.
- d) La corriente aplicada: a bajo voltaje, el rango de migración de los fragmentos de DNA lineal es proporcional al voltaje aplicado. Sin embargo, cuando la fuerza del campo eléctrico aumenta, la movilidad de los fragmentos de alto peso molecular se incrementa irregularmente. Así, el rango efectivo de separación de geles de agarosa desciende cuando el voltaje se incrementa. Para obtener una resolución máxima, los geles deben ser sometidos a no más de 5 v/cm.



- e) Composición de las bases y temperatura: La conducta electroforética de DNA en los geles de agarosa (a diferencia con los de acrilamida) no es significativamente afectada por la composición básica del DNA o la temperatura de la electroforesis.

## **Técnica**

### 1) Preparación de soluciones stock

Buffer de electroforesis Tris- borato 5 X (TBE 5X)

|                      |          |
|----------------------|----------|
| Tris base            | 54 g     |
| Acido bórico         | 27.5 g   |
| EDTA                 | 3.7 g    |
| H <sub>2</sub> O csp | 1000 ml. |

Bromuro de etidio 1 mg/ml

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Bromuro de etidio | 10 mg |
| H <sub>2</sub> O  | 10 ml |

### 2) Preparación del gel

Se pesan tantos gramos de agarosa como la concentración que se desee utilizar.

A la agarosa se le añade 100 ml de TBE 0.5X y se disuelve por agitación y calor para dar una solución transparente.

Un soporte para electroforesis horizontal, se limpia con etanol (70 %) y se cierra con cinta adhesiva apropiada. Cuando la solución de agarosa alcanza alrededor de 50 °C, se añade bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 ug/ml. Posteriormente se colocan en el soporte las plantillas para los pocillos, en forma de peine, y se vierte la solución de agarosa dejándose solidificar unos 20 minutos.

Finalmente, se retira la plantilla y la cinta adhesiva y se coloca en la cubeta conteniendo TBE 0.5 X con bromuro de etidio 0.5 ug/ml. Se cargan los pocillos con el producto de PCR y se somete a 85 V unos 45 minutos.

La presencia de las bandas se lee directamente en el transiluminador y se fotografía si es necesario.

## **MÉTODOS ESTADÍSTICOS**

Las variables continuas son expresadas como  $X \pm$  Desviación standard.

- Las diferencias entre las variables continuas de 2 grupos fueron evaluadas por la t de Student, o test no paramétricos (U Mann Whitney) según procediera. El análisis de la homogeneidad de varias muestras cuantitativas se realizó por el análisis de la varianza (ANOVA) o el test de Kruskall-Wallis.
- El análisis mediante la chi cuadrado o el test exacto de Fisher fueron usados para evaluar las diferencias entre las variables cualitativas en los grupos de estudio.
- El método de Kaplan-Meier fue utilizado para el cálculo de la tasa de supervivencia libre de eventos en ambos grupos de pacientes. La comparación de las curvas se efectuó por el log-rank test.
- Un análisis de regresión logística “paso a paso” fue utilizado para investigar el impacto independiente de aquellos factores de riesgo, incluidos los distintos genotipos, sobre la aparición de ECV.
- Así mismo, mediante el análisis de Cox se analizó la contribución de las variables analizadas sobre la aparición de la ECV.

Un valor de  $P < 0.05$  fue considerado significativo.

Todos los cálculos estadísticos fueron realizados utilizando el programa informático SPSS 10.0<sup>®</sup> para Windows 98<sup>®</sup>.

---

## ***RESULTADOS***

Un total de 207 pacientes portadores de un injerto renal fueron incluidos en el estudio. La **tabla 1** muestra los datos demográficos y las características clínicas generales del grupo de enfermos. La edad media de los pacientes fue de  $49.8 \pm 13$  años y como era de esperar predominaban los enfermos del sexo masculino. Así mismo, la diabetes mellitus (90% de tipo II) y la glomerulonefritis crónica representaron las causas más frecuentes de insuficiencia renal crónica (IRC) terminal.

El tiempo de seguimiento medio postrasplante fue de  $67.4 \pm 40.1$  meses, y en general, se observó una alta prevalencia de factores de riesgo vascular tras el implante (Tabla 1), principalmente hipertensión arterial (88%) y dislipemia (73%). Finalmente, un 37 y un 51% de los enfermos recibían IECAs o antiagregantes plaquetarios, respectivamente.

Acorde a los criterios de inclusión, ningún enfermo presentó un evento CV mayor pretrasplante, pero 54 pacientes mostraron signos de ateromatosis (soplos vasculares o extensas calcificaciones vasculares) antes del trasplante (Tabla 1).

Setenta y siete pacientes (37%) sufrieron su primer evento CV después del primer año de seguimiento postrasplante. Concretamente, 22 (10.6%) presentaron criterios de enfermedad cardíaca coronaria (ECC), 7 (3.4%) desarrollaron un ACV isquémico y 58 (28 %) sufrieron enfermedad vascular periférica (EVP), de los cuales en 48 (23%) fue el primer evento CV (10 enfermos presentaron previamente un IAM: n=8, ó un ACV: n=2). Adicionalmente, 8 pacientes fallecieron como consecuencia de estos eventos CV.

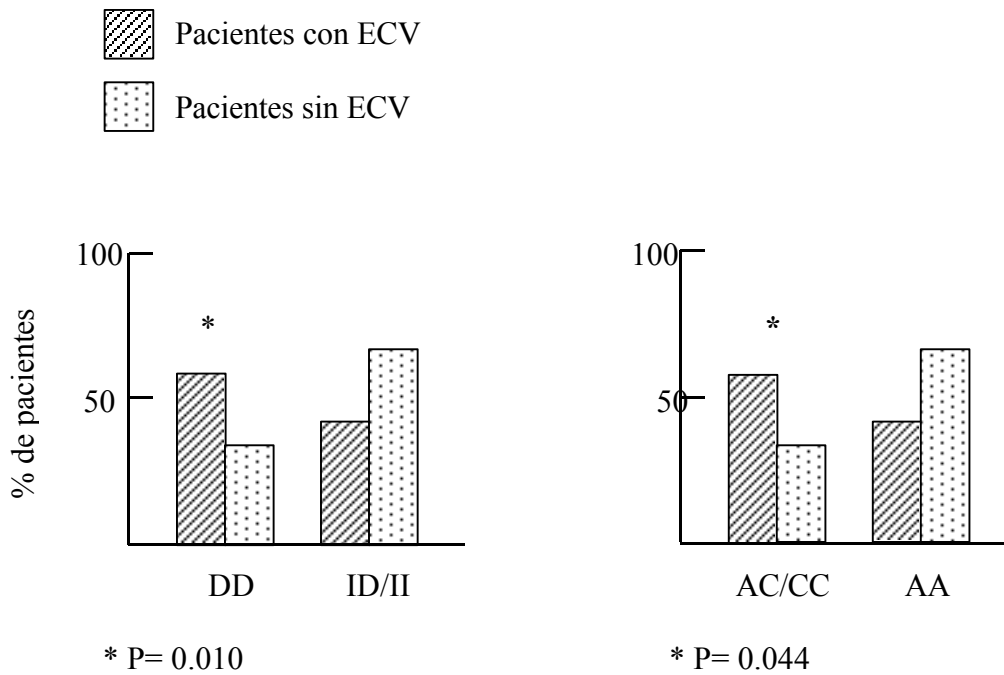
En las **tablas 2 y 3** se muestran las características clínicas y los parámetros bioquímicos más relevantes en los pacientes con y sin eventos cardiovasculares tras el trasplante. Como se observa, algunos factores clásicos de riesgo vascular como una

mayor edad, la presencia de diabetes pretrasplante, la HTA o la dislipemia pre y postrasplante, fueron más prevalentes en los enfermos que sufrieron alguna complicación CV posterior, frente al resto (tabla 2). Asimismo, en los pacientes con ECV predominaban los varones (78 vs 66%;  $P=0.08$ ) y presentan un mayor número de alteraciones ecocardiográficas (HVI y disfunción diastólica), reflejo de un peor perfil CV. Obviamente, y como consecuencia de presentar más datos de ateromatosis pretrasplante y de sufrir complicaciones CV, estos enfermos recibieron una mayor proporción de antiagregantes plaquetarios e IECAs, que aquellos que no presentaron ECV durante la evolución.

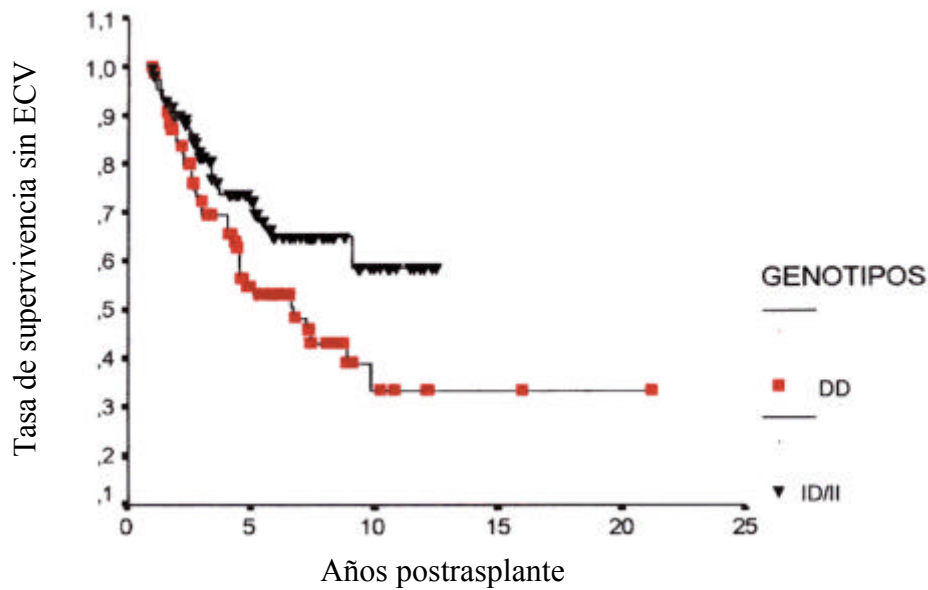
Aunque la totalidad de los enfermos con dislipemia postrasplante recibían hipolipemiantes, el nivel de triglicéridos fue significativamente mayor en los pacientes con ECV ( $P=0.001$ )(tabla 3). Otros parámetros del perfil lipídico, así como los niveles de ácido úrico y PTH, fueron similares en ambos grupos de pacientes.

La distribución de los genotipos de los cuatro polimorfismos estudiados en ambos grupos de pacientes se muestra en la **tabla 4**. Esta distribución genotípica no se desvió del equilibrio de Hardy-Weinberg en ninguno de los polimorfismos. Sorprendentemente, el genotipo DD estaba “sobre-expresado” en los pacientes con ECV, frente a otros genotipos del SRA (54 vs 37%;  $P=0.040$ ). Asimismo, se observó una mayor prevalencia de los pacientes con algún alelo C (AC+CC) del polimorfismo del gen del receptor AT1R, en los individuos que sufrieron estas complicaciones (**figura 12**). Más gráficamente, en las **figuras 13 y 14** se observa una clara asociación entre la aparición del ECV y los genotipos desfavorables del polimorfismo del gen de la ECA (DD) y del AT1R, respectivamente.

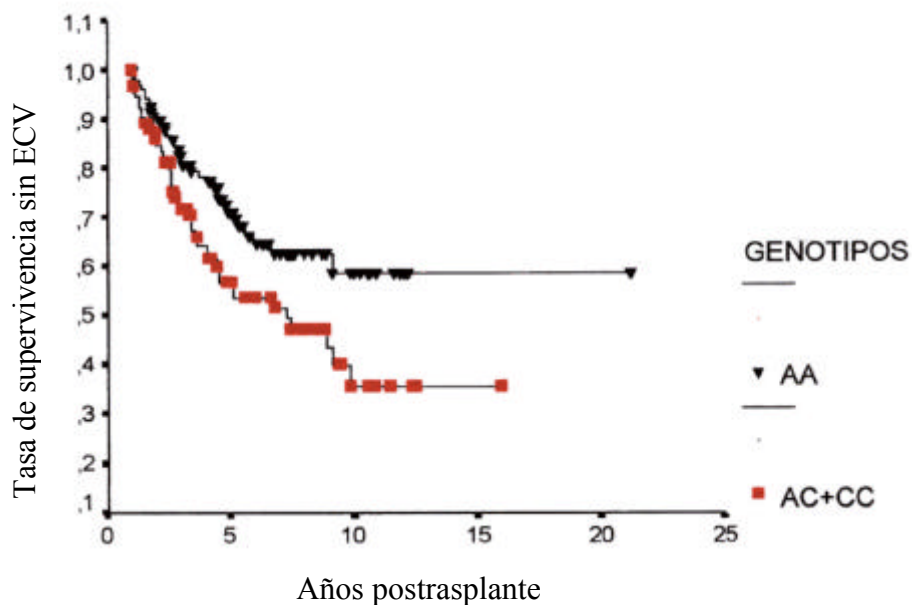
Por el contrario las frecuencias genotípicas de los polimorfismos del gen del AGT y de la apo E fueron similares en ambos grupos de enfermos (**tabla 4**).



**Fig. 12.** Representación gráfica en la que se observa la mayor prevalencia de ECV en aquellos pacientes con polimorfismos “desfavorables” del gen de la ECA (DD) y del AT1R (AC+CC), frente a aquellos que portan alelos “favorables” y no presentaron ECV.



**Fig. 13.** Estimación de Kaplan-Meier de la aparición del primer evento CV durante el seguimiento en pacientes con y sin genotipo DD. La proporción de pacientes sin ECV fue significativamente superior en aquellos con genotipo ID/II (Log-Rank: 6.35 ;  $P=0.012$ ).



**Fig. 14.** Estimación de Kaplan-Meier de la aparición del primer evento CV tras el trasplante renal en pacientes con y sin algún alelo C del polimorfismo del AT1R. La proporción de pacientes con algún ECV fue significativamente superior en aquellos con genotipo AC+CC (Log-Rank: 5.65;  $P=0.017$ ).



Es de destacar que se observó una interacción significativa entre los polimorfismos del gen de la ECA y el AT1R, producto probablemente de un efecto sinérgico entre los dos genes. En otras palabras, una mayor proporción de pacientes con ECV presentaban al mismo tiempo el genotipo DD y algún alelo C desfavorable (AC ó CC) del polimorfismo del gen del AT1R. Este efecto, sin embargo, no fue observado con los otros polimorfismos estudiados (**tabla 5**).

Cuando se excluyeron los pacientes que recibieron IECAs durante la evolución (N=77), también se observó que la presencia del genotipo DD y la de algún alelo C (AC ó CC) se asociaron, en el análisis univariado, al desarrollo de complicaciones CV (**tabla 6**).

En las tablas 7, 8, 9 y 10 se muestra la distribución de los datos clínicos y factores de riesgo vascular, según los diferentes genotipos de los polimorfismos del SRA y de la apo E en todos los enfermos. Los pacientes con algún alelo C del polimorfismo del gen del AT1R presentaron mayor edad (P=0.038) y sólo una tendencia a sufrir más HTA postrasplante (P=0.056) que aquellos con genotipo AA (**tabla 8**). Así mismo, en el grupo de enfermos con algún alelo “desfavorable” del polimorfismo del gen del AGT (alelo T), predominaban los varones (P=0.064) (**tabla 9**), pero éstos mostraron con menor frecuencia criterios ecocardiográficos de HVI, que los pacientes con genotipo MM (69.5 vs. 86%; P=0.011). La distribución de otros factores de riesgo vascular, así como la proporción de enfermos que recibían fármacos protectores vasculares, fue similar entre los diferentes genotipos de los polimorfismos del SRA.

Por otra parte, los pacientes con algún alelo E4 del polimorfismo del gen de la apo E habían permanecido más tiempo en tratamiento sustitutivo (hemodiálisis o diálisis peritoneal) y presentaron menores niveles de HDL que aquellos con genotipo E3/3

( $P=0.086$ ) (**tabla 10**). No obstante, el nivel medio de triglicéridos fue significativamente menor en los primeros ( $158 \pm 67$  vs.  $187 \pm 78$  mg/dl;  $P=0.025$ ), ante una similar proporción de trastornos dislipémicos postrasplante en ambos grupos (67 vs. 75%;  $P=0.246$ ).

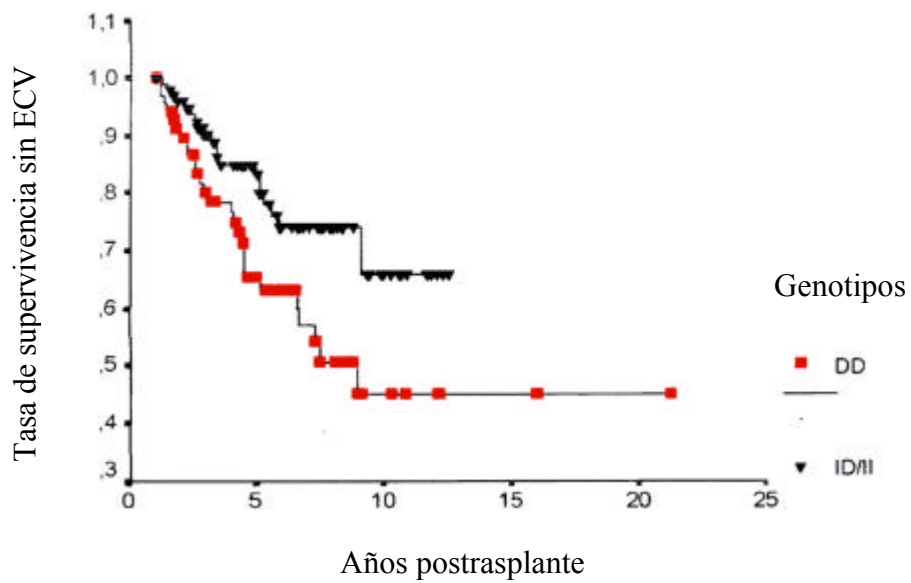
Para identificar con mayor claridad los factores de riesgo de sufrir ECV, se realizó un análisis de regresión logística “paso a paso”, utilizando como variable dependiente la presencia o no de algún evento CV, y como variables independientes todos aquellos factores de riesgo vascular. Como era de esperar, el sexo masculino, la edad, la presencia de ateromatosis previa en diálisis, la diabetes pretrasplante y la aparición de hiperlipemia o HTA postrasplante fueron factores independientes de riesgo (**tabla 11**). Así mismo, y de forma sorprendente, la presencia del genotipo DD fue también un factor de riesgo independiente que confería 2.7 veces más riesgo de sufrir algún evento CV que otros genotipos (OR: 2.77; IC 95%: 1.22-6.27;  $P=0.014$ ) (tabla 11); esto se mantenía al excluir a los pacientes que recibieron IECAs ( $N=77$ ) durante el seguimiento (OR=2.7; IC 95%: 0.99-7.35;  $P=0.051$ ).

Por el contrario, la presencia de algún alelo “desfavorable” de los polimorfismos del gen del receptor AT1 (AC+CC) y/o del angiotensinógeno (MT+TT), no supuso un incremento del riesgo vascular. Así mismo, la presencia de algún alelo E4 del gen de la apo E tampoco se asoció a un mayor riesgo de sufrir un evento CV.

De manera similar, el análisis multivariado de Cox, ajustando para otras variables confundentes, mostró que algunos factores tradicionales de riesgo vascular (edad, sexo, dislipemia y diabetes) y la presencia del genotipo DD fueron predictores independientes de primeros eventos CV postrasplante (**tabla 12**). Otras variantes

polimórficas desfavorables de los genes del AT1R, AGT y apo E no se asociaron al desarrollo de complicaciones CV.

Con todo, se observó una interacción entre la presencia de diabetes pretrasplante y el genotipo DD ( $P= 0.013$ ; tabla 12). En efecto, el análisis de los enfermos sin diabetes pretrasplante reveló que la presencia del genotipo DD fue más frecuente en aquellos enfermos que sufrieron algún evento CV (56 vs. 36%;  $P= 0.024$ ; **tabla 13** y **figura 15**), al mismo tiempo que representó un factor de riesgo independiente de desarrollar estas ECV postrasplante ( $RR= 1.70$ ; IC 95%: 0.96-3.06;  $P=0.074$ ).



**Figura 15.** Estimación de Kaplan y Meier de primeros eventos CV durante el seguimiento en pacientes sin diabetes mellitus pretrasplante, según el polimorfismo del gen de la ECA (Long Rank: 6.08; P= 0.013).

En las tablas 13, 14 y 15 se muestra la distribución de los genotipos de los polimorfismos estudiados, así como las características clínicas de los pacientes sin diabetes pretrasplante. Una mayor frecuencia del alelo C y del genotipo DD se observó en los enfermos con complicaciones cardiovasculares durante el seguimiento (**tabla 13**). Asimismo, una mayor proporción de pacientes con ECV presentaron al mismo tiempo el genotipo DD y algún alelo “desfavorable” C del gen del AT1R, lo que no ocurrió con otros polimorfismos (**tabla 14**). Otros factores de riesgo vascular como una mayor edad, sexo masculino o la presencia de dislipemia (pre y postrasplante), HTA y signos de aterosclerosis fueron más prevalentes en estos enfermos, sin diabetes pretrasplante, que sufrieron algún evento CV (**tabla 15**).

En las tablas 16, 17, 18 y 19 se presentan la distribución de las características clínicas y factores de riesgo según los diferentes genotipos de los polimorfismos del SRA y de la apo E en pacientes sin diabetes mellitus pretrasplante. Aunque la frecuencia de trastornos dislipémicos pretrasplante fue similar entre los pacientes con los diferentes genotipos del polimorfismo del gen de la ECA, los enfermos con algún alelo D mostraron más dislipemias postrasplante que el resto (**tabla 16**). Asimismo, los pacientes con el genotipo “desfavorable” CC del polimorfismo del gen AT1R presentaron una mayor edad que otros genotipos (AA ó AC) (**tabla 17**). Es de destacar que, a pesar de que los enfermos con algún alelo D ó C mostraron un menor tiempo de permanencia en diálisis (tablas 16 y 17), éstos desarrollaron más complicaciones CV postrasplante que el resto de enfermos (tabla 13), reflejo probablemente del efecto deletéreo vascular de estos genotipos. Una mayor proporción de varones se observó en los pacientes con genotipos MT y TT del polimorfismo del gen del AGT con respecto al genotipo MM (**tabla 18**), si bien aquellos eran enfermos más jóvenes. Finalmente, los

pacientes con algún alelo E4 no mostraron mayores cifras de colesterol o triglicéridos plasmáticos (**tabla 19**) que aquellos con genotipos E3/3 del polimorfismo de la apo E, lo que deja entrever el posible efecto aditivo de la diabetes en el desarrollo de la dislipemia en aquellos pacientes.

En estos pacientes sin diabetes mellitus pretrasplante se realizó también un análisis de regresión logística “paso a paso” para identificar los factores de riesgo vascular. La edad, el sexo masculino y el hábito de fumar fueron factores de riesgo independientes de desarrollar eventos CV postrasplante (**tabla 20**). Asimismo, se observó que el genotipo DD y la interacción entre DD y algún alelo C (AC+CC) fueron predictores independientes de eventos CV postrasplante (tabla 20). Otros genotipos desfavorables de los polimorfismos del gen del AGT (MT ó TT) y de la apo E (E3/4 ó E4/4) no se asociaron al desarrollo de estas complicaciones en enfermos sin diabetes pretrasplante.

Finalmente, cuando se analizaron aquellos enfermos sin otros factores de riesgo asociados (ausencia de diabetes pretrasplante, índice de masa corporal menor de 27 Kg/m<sup>2</sup> y colesterol de menos de 240 mg/dl), de nuevo el genotipo DD fue más prevalente en los enfermos con ECV postrasplante (61 vs. 30%; p=0.03) y éste constituyó un factor de riesgo independiente de ECV (OR: 5.3; IC 95%: 1-31; p=0.05).

Dada la importancia del tiempo de seguimiento tras el implante en la aparición de las ECV postrasplante, se llevó a cabo arbitrariamente, un análisis de los factores de riesgo vascular en pacientes con un tiempo de evolución mayor o menor de 5 años. Ciento diez pacientes presentaron un tiempo de seguimiento menor o igual a 5 años ( $X=3.09\pm 1.16$  años), de los cuales 50 presentaron alguna ECV postrasplante. En este grupo de enfermos se observó que aquellos con ECV postrasplante presentaban más

edad y había un mayor número de diabéticos pretrasplante y trastornos dislipémicos que el resto (**tabla 21**). Como consecuencia, estos pacientes mostraban más datos de ateromatosis pretrasplante y recibieron un mayor número de antiagregantes plaquetarios. Sin embargo, sólo se observó una tendencia a una mayor frecuencia del genotipo DD en aquellos con estas complicaciones CV (**tabla 22**). Otros polimorfismos no fueron diferentes entre estos enfermos. Con todo, se observó un efecto sinérgico entre el genotipo DD del polimorfismo de la ECA y aquellos con algún alelo C desfavorable del polimorfismo del gen AT1R (**tabla 23**), hecho éste que no fue evidenciado con otros genotipos.

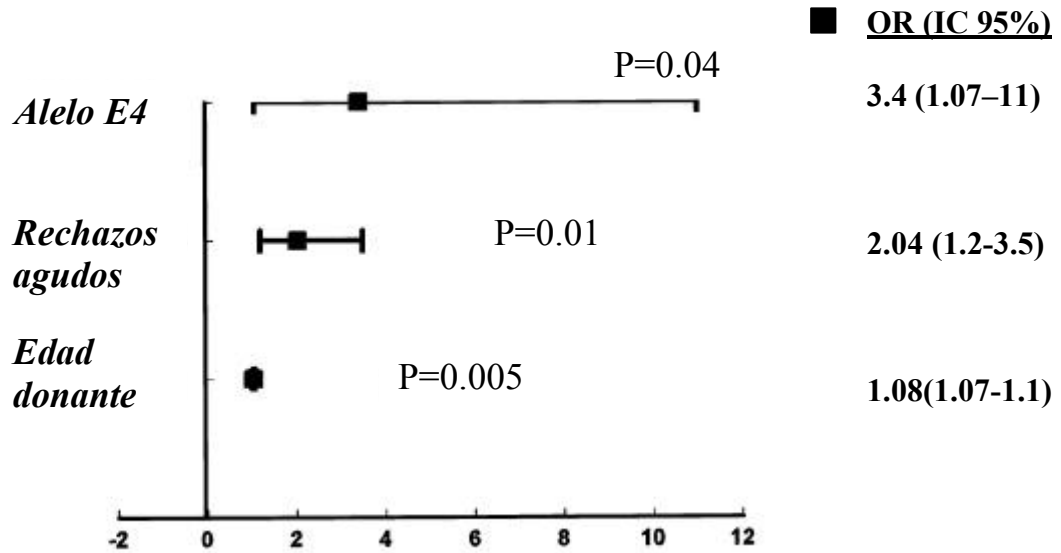
Por otra parte, 97 pacientes presentaron un tiempo de seguimiento mayor de 5 años, de los cuales 27 desarrollaron algún evento CV. De manera similar, estos enfermos eran más añosos y había un mayor número de diabéticos pretrasplante, ateromatosis y trastornos dislipémicos que el resto (**tabla 24**). Sólo el genotipo DD se asoció a ECV postrasplante (**tabla 25**) y un efecto sinérgico fue observado, de nuevo, entre este genotipo y los enfermos con algún alelo C para el desarrollo de complicaciones cardiovasculares (**tabla 26**).

Un análisis de regresión realizado en los pacientes con un tiempo de seguimiento menor o igual a 5 años, mostró que sólo algunos factores clásicos de riesgo fueron predictores independientes del riesgo de desarrollar CV y no el genotipo DD (**tabla 27**). No obstante, al excluir a los pacientes con diabetes pretrasplante, el genotipo DD, la edad y el sexo masculino se mostraron como factores de riesgo de ECV (**tabla 28**). Este mismo análisis realizado en los pacientes con más de 5 años de evolución postrasplante mostró que sólo la edad, el hábito de fumar y los triglicéridos se asociaron al riesgo de complicaciones (**tabla 29**).

Un total de 28 pacientes desarrollaron durante la evolución una nefropatía crónica del injerto (NCI), en base a los criterios histológicos de la clasificación de BANFF 93. En el análisis univariado, cuando se comparó la presencia de NCI frente al resto, sólo el alelo E4 se asoció a la aparición de NCI (**tabla 30**), mientras que otros polimorfismos no mostraron tal asociación.

Para identificar con mayor claridad los factores de riesgo asociados al desarrollo de NCI, se compararon los datos clínicos de los enfermos con NCI frente a aquellos pacientes (N=100) que, presumiblemente, no tenían esta entidad en base a criterios clínicos: ausencia de proteinuria y creatinina sérica menor o igual a 2.5 mg/dl, con un tiempo de seguimiento mayor o igual a 3 años (**tabla 31**). Como era predecible, los enfermos con NCI presentaron un mayor número de rechazos agudos, así como donantes más añosos con creatinina sérica significativamente más elevada. Así mismo, los niveles de paratohormona (PTH) también fueron más elevados, producto de un mayor deterioro de la función renal. En estos pacientes, de nuevo la presencia del alelo E4 se asoció con el desarrollo de la NCI, mientras que los otros polimorfismos no mostraron tal asociación (**tabla 32**). Por último, un análisis de regresión logística llevado a cabo para identificar los factores de riesgo de NCI, demostró que la edad del donante, el número de rechazos agudos y la presencia del alelo E4 fueron factores predictores de la aparición de NCI en estos enfermos (**Figura 16**).





**Figura 16.** Modelo de Regresión Logística (N=128 trasplantes y 28 rechazos crónicos). Otras variables incluidas en el modelo, pero sin significación estadística fueron: incompatibilidades ABDR, infección por CMV, hábito de fumar, dislipemia, hipertensión y el tiempo postrasplante. OR: Odds ratio; IC: Intervalo de confianza.

**Tabla 1: Datos demográficos y clínicos globales**

| <b>N = 207</b>   |                   |           |
|--|-------------------|-----------|
| <b>Edad (años)</b>                                     | 49.8 ± 12.8       |           |
| <b>Sexo (%varones)</b>                                 | 70.5              |           |
| <b>Enfermedad de base (%)</b>                          | <b>DM</b>         | 39 (18.8) |
|  | <b>GNC</b>        | 65 (31.4) |
|  | <b>NI</b>         | 16 (7.7)  |
|  | <b>PQ</b>         | 16 (7.7)  |
|  | <b>NF</b>         | 11 (5.3)  |
|  | <b>PNC</b>        | 21 (10.1) |
|  | <b>No filiada</b> | 20 (9.6)  |
|  | <b>Otros</b>      | 19 (9.1)  |
| <b>Tiempo en diálisis (meses)</b>                      | 46.2 ± 169        |           |
| <b>Tiempo seguimiento posTx (meses)</b>                | 67.42 ± 40.1      |           |
| <b>Ateromatosis preTx (%)</b>                          | 54 (26)           |           |
| <b>Diabetes posTx (%)</b>                              | 22 (10.6)         |           |
| <b>HTA posTx (%)</b>                                   | 182 (88)          |           |
| <b>Dislipemia posTx (%)</b>                            | 152 (73)          |           |
| <b>Indice de masa corporal (Kg/m<sup>2</sup>)</b>      | 27.3 ± 5.2        |           |
| <b>Fumador (%)</b>                                     | 33 (16)           |           |
| <b>Nº rechazos agudos primer año</b>                   | 0.6 ± 0.8         |           |
| <b>Infección por CMV (%)</b>                           | 81 (39)           |           |
| <b>Creatinina sérica (mg/dl)</b>                       | 1.8 ± 1.1         |           |
| <b>Pacientes con HVI * (%)</b>                         | 139 (67)          |           |
| <b>Tratamiento con IECAs (%)</b>                       | 77 (37)           |           |
| <b>Tratamiento con antiagregantes plaquetarios (%)</b> | 106 (51)          |           |
| <b>Retrasplantes (%)</b>                               | 5 (2.4)           |           |

\* En 27 pacientes no se obtuvieron datos ecocardiográficos.

X±DE (media±desviación típica); DM: diabetes mellitus; GNC: glomerulonefritis crónica; NI: nefropatía isquémica; PQ: poliquistosis renal; NF: nefropatía familiar; PNC: pielonefritis crónica; posTx: posterior al trasplante; HTA: hipertensión arterial; CMV: citomegalovirus; HVI: hipertrofia ventricular izquierda; IECAs: inhibidores de la enzima de conversión de angiotensina.

**Tabla 2: Características clínicas y factores de riesgo vascular acorde a la presencia o no de eventos cardiovasculares (ECV) tras el trasplante.**

|   | <b>ECV<br/>n = 77</b> | <b>Sin ECV<br/>n = 130</b> | <b>Valor P</b> |
|---|-----------------------|----------------------------|----------------|
| <b>Edad (años)</b>                                | 56.7 ± 10.1           | 45.6 ± 12.4                | 0.000          |
| <b>Sexo (%varones)</b>                            | 60 (78)               | 86 (66)                    | 0.084          |
| <b>Diabetes mellitus preTx (%)</b>                | 29 (37.7)             | 10 (7.7)                   | 0.000          |
| <b>Diabetes mellitus posTx (%)</b>                | 7 (9)                 | 15 (11.5)                  | 0.162          |
| <b>Tiempo diálisis (meses)</b>                    | 28.5 ± 29             | 25 ± 17                    | 0.443          |
| <b>HTA pretrasplante (%)</b>                      | 66 (85)               | 82 (63)                    | 0.000          |
| <b>HTA postrasplante (%)</b>                      | 73 (95)               | 109 (84)                   | 0.026          |
| <b>Dislipemia preTx (%)</b>                       | 28 (36)               | 13 (10)                    | 0.000          |
| <b>Dislipemia posTx (%)</b>                       | 68 (88)               | 84 (65)                    | 0.000          |
| <b>Ateromatosis preTx (%)</b>                     | 38 (49)               | 16 (12)                    | 0.000          |
| <b>Tiempo evolución posTx (años)</b>              | 4.8 ± 2.8             | 6 ± 3.4                    | 0.010          |
| <b>Nº rechazos agudos 1er. Año</b>                | 0.66 ± 0.8            | 0.68 ± 0.8                 | 0.851          |
| <b>Rechazo crónico (%)</b>                        | 8 (10.4)              | 20 (15)                    | 0.402          |
| <b>Infección por CMV (%)</b>                      | 21 (27)               | 60 (46)                    | 0.006          |
| <b>Índice de masa corporal (Kg/m<sup>2</sup>)</b> | 27.5 ± 5.2            | 27.1 ± 5.2                 | 0.435          |
| <b>Fumador (%)</b>                                | 10 (13)               | 23 (18)                    | 0.435          |
| <b>Tratamiento con IECAs (%)</b>                  | 32 (41.5)             | 45 (34.5)                  | 0.372          |
| <b>Tratamiento con antiagregantes (%)</b>         | 55 (71.5)             | 51 (39)                    | 0.000          |
| <b>Pacientes con HVI (%)</b>                      | 60 (91)               | 79 (67)                    | 0.000          |
| <b>Pacientes con disfunción diastólica (%)</b>    | 40 (78)               | 35 (42)                    | 0.000          |
| <b>Pacientes con proteinuria nefrótica (%)</b>    | 6 (8)                 | 5 (4)                      | 0.118          |
| <b>Éxito (%)</b>                                  | 8 (10.4)              | 6 (4.6)                    | 0.060          |

X±DE: media±desviación típica. PreTx o posTx: pretrasplante o postrasplante. CMV: citomegalovirus; HTA: hipertensión arterial; IECA: inhibidor de la enzima de conversión de angiotensina; HVI: hipertrofia ventricular izquierda.

**Tabla 3: Datos bioquímicos de los pacientes con y sin eventos cardiovasculares durante la evolución.**

|                                  | <b>ECV<br/>n=77</b>                                  | <b>Sin ECV<br/>n=130</b> | <b>Valor P</b> |       |
|----------------------------------|--|--------------------------|----------------|-------|
| <b>Creatinina sérica (mg/dl)</b> | 1.8 ± 0.8  | 1.9 ± 1.2                | 0.392          |       |
| <b>Colesterol total (mg/dl)</b>  | 215 ± 44   | 214.6 ± 39               | 0.947          |       |
| <b>HDL-colesterol (mg/dl)</b>    | 52 ± 15  | 54.4 ± 15.7              | 0.508          |       |
| <b>Triglicéridos (mg/dl)</b>     | 203.8 ± 75   | 166 ± 75                 | 0.001          |       |
| <b>Apo A (mg/dl)</b>             | 147 ± 27   | 153.5 ± 33               | 0.151          |       |
| <b>Apo B (mg/dl)</b>             | 142 ± 175  | 124 ± 119                | 0.386          |       |
| <b>Apo B/A (mg/dl)</b>           | 1.03 ± 1.4   | 0.8 ± 0.7                | 0.115          |       |
| <b>Ácido úrico (mg/dl)</b>       | 7.8 ± 1.8  | 7.8 ± 1.7                | 0.987          |       |
| <b>PTH<br/>(pg/ml)</b>           | <b>Global</b>  | 132 ± 126.8              | 149 ± 260      | 0.606 |
|                                  | <b>Pacientes sin diabetes mellitus pretrasplante</b> | 136 ± 118                | 156 ± 270      | 0.622 |
|                                  | <b>Pacientes ≤ 5 años evolución</b>                  | 128 ± 140                | 194 ± 374      | 0.253 |
|                                  | <b>Pacientes &gt; 5 años evolución</b>               | 140 ± 100                | 113 ± 92       | 0.200 |

X±DE: media±desviación típica.

ECV= enfermedad cardiovascular.

Apo A, B= apolipoproteína A y B.

PTH= hormona paratiroidea.

**Tabla 4: Frecuencias de los diferentes polimorfismos genéticos del sistema renina-angiotensina (SRA) y de la apo E en pacientes con y sin enfermedad cardiovascular (ECV) tras el trasplante.**

|              |                        | <b>ECV<br/>n = 77</b> | <b>Sin ECV<br/>n = 130</b> | <b>Valor P</b> |
|--------------|------------------------|-----------------------|----------------------------|----------------|
| <b>ECA</b>   | <b>DD (%)</b>          | 42 (54)               | 48 (37)                    | 0.040*         |
|              | <b>ID (%)</b>          | 27 (35)               | 67 (51.5)                  |                |
|              | <b>II (%)</b>          | 8 (10.3)              | 15 (11.5)                  |                |
|              | <b>ID + II (%)</b>     | 35 (45.5)             | 82 (63)                    | 0.010^         |
| <b>AT1R</b>  | <b>AA (%)</b>          | 34 (44)               | 78 (60)                    | 0.038*         |
|              | <b>AC (%)</b>          | 34 (44)               | 46 (35)                    |                |
|              | <b>CC (%)</b>          | 9 (11.7)              | 6 (4.6)                    |                |
|              | <b>AC + CC (%)</b>     | 43 (55.7)             | 52 (39.6)                  | 0.044^         |
| <b>AGT</b>   | <b>MM (%)</b>          | 25 (32.4)             | 47 (36)                    | 0.230*         |
|              | <b>MT (%)</b>          | 37 (48)               | 68 (52)                    |                |
|              | <b>TT (%)</b>          | 15 (19.5)             | 15 (11.5)                  |                |
|              | <b>MT + TT (%)</b>     | 52 (67.5)             | 83 (63.5)                  | 0.762^         |
| <b>Apo E</b> | <b>E3/3 (%)</b>        | 61 (79)               | 101 (77)                   | 0.881*         |
|              | <b>E3/4 (%)</b>        | 15 (19.5)             | 28 (21.5)                  |                |
|              | <b>E4/4 (%)</b>        | 1 (1.3)               | 1 (0.8)                    |                |
|              | <b>E3/4 + E4/4 (%)</b> | 16 (21)               | 29 (22)                    | 0.863^         |

\* Relación entre los distintos polimorfismos y la presencia o no de ECV: test de la  $X^2$ .

^ Comparación de pacientes con: ID+II vs. DD; AC+CC vs. AA; MT+TT vs. MM; E3/4+E4/4 vs. E3/3, mediante el test de la  $X^2$ ; ECA = enzima de conversión de la angiotensina; AT1R = receptor de la angiotensina II de tipo 1; AGT = angiotensinógeno Apo E= apolipoproteína E

**Tabla 5. Distribución de los genotipos de los polimorfismos del gen del AT1R, AGT y apo E en pacientes con y sin ECV, respecto al polimorfismo del gen de la ECA.**

| ECA   |                 | DD<br>N = 90   |                   | II + ID<br>N = 117 |                   |
|-------|-----------------|----------------|-------------------|--------------------|-------------------|
|       |                 | ECV<br>n = 42  | Sin ECV<br>n = 48 | ECV<br>n = 35      | Sin ECV<br>n = 82 |
| AT1R  | AA (%)          | 16 (38)        | 34 (70.8)         | 18 (51.4)          | 44 (53.6)         |
|       | AC + CC (%)     | 26 (62)        | 14 (29.2)         | 17 (48.6)          | 38 (46.4)         |
|       |                 | <i>P=0.003</i> |                   | <i>P=0.842</i>     |                   |
| AGT   | MM (%)          | 13 (31)        | 12 (25)           | 12 (34.3)          | 35 (42.7)         |
|       | MT + TT (%)     | 29 (69)        | 36 (75)           | 23 (65.7)          | 47 (57.3)         |
|       |                 | <i>P=0.639</i> |                   | <i>P=0.419</i>     |                   |
| Apo E | E3/3 (%)        | 33 (78.6)      | 38 (79)           | 28 (80)            | 63 (76.8)         |
|       | E3/4 + E4/4 (%) | 9 (21.4)       | 10 (21)           | 7 (20)             | 19 (23.2)         |
|       |                 | <i>P=1.000</i> |                   | <i>P=0.811</i>     |                   |

P: según test de la Chi-cuadrado

ECV= enfermedad cardiovascular

ECA= enzima de conversión de la angiotensina

AT1R= receptor de la angiotensina II de tipo 1

AGT= angiotensinógeno

Apo E= apolipoproteína E

**Tabla 6: Distribución de las frecuencias genotípicas de los pacientes (con o sin ECV) que no recibieron inhibidores de la ECA, respecto a los polimorfismos del SRA y de la apo E.**

|              |                        | <b>ECV<br/>n = 45</b> | <b>Sin ECV<br/>n = 85</b> | <b>Valor *P</b> |
|--------------|------------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------|
| <b>ECA</b>   | <b>DD (%)</b>          | 26 (58)               | 30 (35)                   | 0.016           |
|              | <b>ID + II (%)</b>     | 19 (42)               | 55 (65)                   |                 |
| <b>AT1R</b>  | <b>AA (%)</b>          | 17 (38)               | 50 (59)                   | 0.027           |
|              | <b>AC + CC (%)</b>     | 28 (62)               | 35 (41)                   |                 |
| <b>AGT</b>   | <b>MM (%)</b>          | 16 (36)               | 30 (35)                   | 0.976           |
|              | <b>MT + TT (%)</b>     | 29 (64)               | 55 (65)                   |                 |
| <b>Apo E</b> | <b>E3/3 (%)</b>        | 37 (82)               | 64 (75)                   | 0.507           |
|              | <b>E3/4 + E4/4 (%)</b> | 8 (18)                | 21 (25)                   |                 |

\* test de la Chi-cuadrado ( $X^2$ ).

ECV= enfermedad cardiovascular

ECA= enzima de conversión de la angiotensina

AT1R= receptor de la angiotensina II de tipo 1

AGT= angiotensinógeno

Apo E= apolipoproteína E

**Tabla 7. Datos clínicos y factores de riesgo vascular, acorde al polimorfismo del gen de la enzima de conversión de angiotensina (ECA).**

|  | <b>DD<br/>N=90</b> | <b>ID<br/>N=94</b> | <b>II<br/>N=23</b> | <b>Valor<br/>*P</b> | <b>ID/II<br/>N=117</b> | <b>Valor<br/>^P</b> |
|--|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|------------------------|---------------------|
| <b>Edad (años)</b>                           | 50.3±13.5          | 49.7±12.1          | 48.1±13            | 0.756               | 49.4±12.3              | 0.619               |
| <b>Sexo (%varones)</b>                       | 61 (67.7)          | 68 (72.3)          | 17 (73.9)          | 0.740               | 85 (72.6)              | 0.446               |
| <b>DM preTx (%)</b>                          | 20 (22.2)          | 15 (16)            | 4 (17.4)           | 0.545               | 19 (16.2)              | 0.275               |
| <b>Tiempo en diálisis (meses)</b>            | 38.4±109           | 33.5±126           | 47.3±49.4          | 0.875               | 36±116.4               | 0.357               |
| <b>Dislipemia preTx (%)</b>                  | 20 (32.2)          | 18 (26.9)          | 3 (20)             | 0.592               | 21 (25.6)              | 0.381               |
| <b>HTA preTx (%)</b>                         | 61 (68)            | 70 (74)            | 17 (74)            | 0.895               | 87 (74.3)              | 0.779               |
| <b>Ateromatosis preTx (%)</b>                | 24 (26.6)          | 23 (24.5)          | 7 (30.4)           | 0.832               | 30 (25.6)              | 0.868               |
| <b>Tiempo evolución posTx (años)</b>         | 5.4±3.5            | 5.6±3.1            | 6±3                | 0.759               | 5.6±3                  | 0.647               |
| <b>Infección CMV (%)</b>                     | 30 (33.3)          | 41 (43.6)          | 10 (43.4)          | 0.325               | 51 (43.6)              | 0.134               |
| <b>Fumador (%)</b>                           | 12 (13.3)          | 15 (16)            | 6 (26)             | 0.329               | 21 (18)                | 0.369               |
| <b>HTA posTx (%)</b>                         | 78 (86.7)          | 84 (89.4)          | 20 (87)            | 0.845               | 104(88.9)              | 0.627               |
| <b>Índ. masa corporal (Kg/m<sup>2</sup>)</b> | 27.8±5.4           | 27±4.8             | 26.7±6.6           | 0.471               | 26.9±5                 | 0.227               |
| <b>Dislipemia posTx (%)</b>                  | 71 (79)            | 67 (71.3)          | 14 (61)            | 0.177               | 81 (69.2)              | 0.119               |
| <b>Pacientes con HVI (%)</b>                 | 60(74)             | 65(76.5)           | 14(78)             | 0.913               | 79 (76.7 )             | 0.681               |
| <b>Tratamiento con IECA (%)</b>              | 34 (37.8)          | 38 (40.4)          | 5 (21.7)           | 0.248               | 43 (36.7)              | 0.880               |
| <b>Tratamiento con antiagregantes (%)</b>    | 9 (39.1)           | 49 (52.1)          | 48 (53.3)          | 0.464               | 58 (49.5)              | 0.592               |
| <b>Colesterol total (mg/dl)</b>              | 209±41.3           | 219.7±39           | 216.7±44           | 0.212               | 219±40.3               | 0.077               |
| <b>HDL-colesterol (mg/dl)</b>                | 52.7±17.3          | 54.7±13.3          | 55.2±15.5          | 0.636               | 54.7±13.7              | 0.381               |
| <b>Apo B (mg/dl)</b>                         | 130±136            | 138±164            | 100±16.1           | 0.529               | 131±149                | 0.949               |
| <b>Triglicéridos (mg/dl)</b>                 | 186±74.7           | 180±82.8           | 161±59.8           | 0.382               | 176±79.3               | 0.389               |
| <b>Creatinina sérica (mg/dl)</b>             | 1.7±0.9            | 1.9±1.2            | 2.2±1.4            | 0.111               | 1.98±1.22              | 0.097               |
| <b>Ácido úrico (mg/dl)</b>                   | 7.8±1.8            | 7.7±1.8            | 7.8±1.6            | 0.878               | 7.8±1.8                | 0.613               |

X±DE: media±desviación típica. \*P= ANOVA intragrupos, o X<sup>2</sup> según procediese.

^P= ID/II vs. DD. PreTx o PosTx: pre o postrasplante; DM: diabetes mellitus.

HTA: hipertensión arterial; CMV: citomegalovirus



**Tabla 8. Datos clínicos y factores de riesgo vascular, acorde al polimorfismo del gen del receptor de angiotensina II de tipo 1 (AT1R).**

|   | AA<br>N=112 | AC<br>N=80 | CC<br>N=15 | Valor<br>*P | AC/CC<br>N=95 | Valor<br>^P |
|---|-------------|------------|------------|-------------|---------------|-------------|
| Edad (años)                             | 48.1±13     | 51.2±12.3  | 54.7±12.1  | 0.073       | 51.8±12.3     | 0.038       |
| Sexo (%varones)                         | 82 (73.2)   | 54 (65.8)  | 10 (66.7)  | 0.654       | 64 (67.4)     | 0.358       |
| DM preTx (%)                            | 20 (17.8)   | 14 (17.5)  | 5 (33.3)   | 0.329       | 19 (20)       | 0.694       |
| Tiempo en diálisis (meses)              | 40.2±101    | 60.4±245   | 16.6±12    | 0.575       | 21.2±20.9     | 0.025       |
| Dislipemia preTx (%)                    | 21 (27.6)   | 16 (28)    | 4 (36.4)   | 0.832       | 20 (29.4)     | 0.813       |
| HTA preTx (%)                           | 76 (68)     | 60 (75)    | 12 (80)    | 0.564       | 72 (75.8)     | 0.363       |
| Ateromatosis preTx (%)                  | 29 (25.9)   | 20 (25)    | 5 (33.3)   | 0.795       | 25 (26.3)     | 0.945       |
| Tiempo evolución posTx (años)           | 5.7±3.2     | 5.5±3.2    | 4.7±3.8    | 0.563       | 5.7±3.2       | 0.539       |
| Infección CMV (%)                       | 41 (36.6)   | 33 (41.2)  | 7 (46.7)   | 0.668       | 40 (42.1)     | 0.419       |
| Fumador (%)                             | 23 (20.5)   | 10 (12.5)  | -          | 0.070       | 10 (10.5)     | 0.050       |
| HTA posTx (%)                           | 94 (84)     | 75 (93.8)  | 13 (86.7)  | 0.119       | 88 (92.6)     | 0.056       |
| Índ. masa corporal (Kg/m <sup>2</sup> ) | 27.1±5.4    | 27.7±5.03  | 26.6±5.8   | 0.712       | 27.2±5.4      | 0.643       |
| Dislipemia posTx (%)                    | 82 (73.2)   | 59 (73.7)  | 11 (73.3)  | 0.997       | 70 (73.6)     | 0.939       |
| Pacientes con HVI (%)                   | 71 (71)     | 59 (82)    | 9 (75)     | 0.257       | 68 (81)       | 0.118       |
| Tratamiento con IECA (%)                | 45 (40)     | 31 (38.7)  | 1 (6.7)    | 0.039       | 32 (33.7)     | 0.335       |
| Tratamiento con antiagregantes (%)      | 53 (47)     | 45 (56)    | 8 (53.3)   | 0.468       | 53 (55.8)     | 0.225       |
| Colesterol total (mg/dl)                | 213±43      | 216.5±37   | 214±47.3   | 0.882       | 213.6±43      | 0.649       |
| HDL-colesterol (mg/dl)                  | 53.4±16.4   | 54.5±14.4  | 54.3±13.7  | 0.887       | 53.4±16.4     | 0.625       |
| Apo B (mg/dl)                           | 125±129     | 143±173    | 104±27.2   | 0.541       | 125±129       | 0.583       |
| Triglicéridos (mg/dl)                   | 177±63.3    | 184±92.3   | 184±85.9   | 0.812       | 177.4±63      | 0.519       |
| Creatinina sérica (mg/dl)               | 2±1.2       | 1.7±0.9    | 1.7±0.9    | 0.191       | 2±1.2         | 0.069       |
| Ácido úrico (mg/dl)                     | 7.9±1.8     | 7.7±1.5    | 7.7±2.8    | 0.514       | 7.9±1.8       | 0.249       |

X±DE: media±desviación típica. \*P= ANOVA intragrupos, o X<sup>2</sup> según procediese.

^P= AC/CC vs. AA. PreTx o PosTx: pre o postrasplante; DM: diabetes mellitus.

HTA: hipertensión arterial; CMV: citomegalovirus.

**Tabla 9. Datos clínicos y factores de riesgo vascular, acorde al polimorfismo del gen del angiotensinógeno (AGT).**

|   | MM<br>N=72 | MT<br>N=105 | TT<br>N=30 | Valor<br>*P | MT/TT<br>N=135 | Valor<br>^P |
|---|------------|-------------|------------|-------------|----------------|-------------|
| Edad (años)                             | 52.4±10.7  | 48.3±13.1   | 48.7±15.2  | 0.097       | 48.4±13.6      | 0.031       |
| Sexo (%varones)                         | 45 (62.5)  | 78 (74.3)   | 23 (76.7)  | 0.175       | 101(74.8)      | 0.064       |
| DM preTx (%)                            | 13 (18)    | 17 (16.2)   | 9 (30)     | 0.228       | 26 (19.2)      | 0.833       |
| Tiempo en diálisis (meses)              | 60.3±189   | 43±177      | 23.8±35.2  | 0.620       | 25.2±26.4      | 0.408       |
| Dislipemia preTx (%)                    | 16 (32.6)  | 15 (21)     | 10 (41.7)  | 0.113       | 25 (26.3)      | 0.425       |
| HTA preTx (%)                           | 51 (71)    | 77 (73)     | 20 (66)    | 0.957       | 97 (71.9)      | 0.986       |
| Ateromatosis preTx (%)                  | 17 (23.6)  | 27 (25.7)   | 10 (33.3)  | 0.591       | 37 (27.4)      | 0.554       |
| Tiempo evolución posTx (años)           | 6±3.8      | 5.4±3       | 5.1±2.5    | 0.313       | 5.3±2.9        | 0.136       |
| Infección CMV (%)                       | 30 (41.7)  | 38 (36.2)   | 13 (43.3)  | 0.671       | 51 (37.8)      | 0.585       |
| Fumador (%)                             | 14 (19)    | 17 (16)     | 2 (6.7)    | 0.274       | 19 (14)        | 0.315       |
| HTA posTx (%)                           | 64 (88.9)  | 91 (86.7)   | 27 (90)    | 0.843       | 118(87.4)      | 0.755       |
| Índ. masa corporal (Kg/m <sup>2</sup> ) | 28±5.6     | 27±5        | 26.2±5.3   | 0.238       | 26.9±5         | 0.146       |
| Dislipemia posTx (%)                    | 56 (77.8)  | 75 (71.4)   | 21 (70)    | 0.579       | 96 (71)        | 0.301       |
| Pacientes con HVI (%)                   | 57 (86)    | 62 (70)     | 20 (69)    | 0.038       | 82 (69.5)      | 0.011       |
| Tratamiento con IECA (%)                | 26 (36)    | 39 (37)     | 12 (40)    | 0.934       | 51 (37.8)      | 0.813       |
| Tratamiento con antiagregantes (%)      | 41 (57)    | 46 (44)     | 19 (63)    | 0.082       | 65 (48)        | 0.228       |
| Colesterol total (mg/dl)                | 215±39     | 216.9±45    | 206.6±28   | 0.479       | 214.6±42       | 0.933       |
| HDL-colesterol (mg/dl)                  | 54.6±15.1  | 54±16.3     | 51.6±13    | 0.658       | 53.5±15.6      | 0.633       |
| Apo B (mg/dl)                           | 125±121    | 153.7±15    | 156±28.5   | 0.909       | 134±153        | 0.671       |
| Triglicéridos (mg/dl)                   | 188.7±86   | 179.4±74    | 165.7±61   | 0.381       | 176.3±71       | 0.273       |
| Creatinina sérica (mg/dl)               | 1.9±1.2    | 1.9±1       | 1.8±0.9    | 0.955       | 1.9±1          | 0.942       |
| Ácido úrico (mg/dl)                     | 7.7±1.8    | 8±1.7       | 7.6±1.8    | 0.438       | 7.9±1.7        | 0.374       |

X±DE: media±desviación típica. \*P= ANOVA intragrupos, o X<sup>2</sup> según procediese.

^P= MT/TT vs. MM. PreTx o PosTx: pre o postrasplante; DM: diabetes mellitus.

HTA: hipertensión arterial; CMV: citomegalovirus.

**Tabla 10. Datos clínicos y factores de riesgo vascular, acorde al polimorfismo del gen de la apolipoproteína E (apo E).**

|  | <b>E3/3<br/>N=162</b> | <b>E3/4<br/>N=43</b> | <b>E4/4<br/>N=2</b> | <b>Valor<br/>*P</b> | <b>E3/4+E4/4<br/>N=45</b> | <b>Valor<br/>^P</b> |
|--|-----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|
| <b>Edad (años)</b>                           | 49.6±12.8             | 50.5±13              | 47.5±14.8           | 0.890               | 50.4±12.8                 | 0.721               |
| <b>Sexo (%varones)</b>                       | 110 (68)              | 35 (81.4)            | 1 (50)              | 0.184               | 36 (80)                   | 0.115               |
| <b>DM preTx (%)</b>                          | 31 (19)               | 8 (18.6)             | -                   | 0.789               | 8 (17.8)                  | 0.837               |
| <b>Tiempo en diálisis (meses)</b>            | 23.3±27.3             | 37.8±36              | 28±19.8             | 0.022               | 37.3±35.3                 | 0.006               |
| <b>Dislipemia preTx (%)</b>                  | 34 (21)               | 7 (16.3)             | -                   | 0.681               | 7 (23.3)                  | 0.483               |
| <b>HTA preTx (%)</b>                         | 120 (74)              | 27 (62.8)            | 1 (50)              | 0.015               | 28 (62.2)                 | 0.005               |
| <b>Ateromatosis preTx (%)</b>                | 42 (26)               | 12 (28)              | -                   | 0.676               | 12 (26.7)                 | 0.920               |
| <b>Tiempo evolución posTx (años)</b>         | 5.4±3                 | 6±3.5                | 9.3±9.4             | 0.143               | 6.2±3.8                   | 0.162               |
| <b>Infección CMV (%)</b>                     | 60 (37)               | 20 (46.5)            | 1 (50)              | 0.501               | 21 (46.7)                 | 0.242               |
| <b>Fumador (%)</b>                           | 26 (16)               | 7 (16.3)             | -                   | 0.825               | 7 (15.6)                  | 0.936               |
| <b>HTA posTx (%)</b>                         | 141 (87)              | 39 (90.7)            | 2 (100)             | 0.702               | 41 (91.1)                 | 0.458               |
| <b>Índ. masa corporal (Kg/m<sup>2</sup>)</b> | 27.3±5.4              | 27±4.8               | 29.5±7              | 0.783               | 27.2±4.8                  | 0.804               |
| <b>Dislipemia posTx (%)</b>                  | 122 (75)              | 29 (67.4)            | 1 (50)              | 0.439               | 30 (67)                   | 0.246               |
| <b>Pacientes con HVI (%)</b>                 | 106(73.6)             | 31 (81.6)            | 2 (100)             | 0.430               | 33 (82.5)                 | 0.247               |
| <b>Tratamiento con IECA (%)</b>              | 61 (37.7)             | 16 (37.2)            | -                   | 0.549               | 16 (35.6)                 | 0.797               |
| <b>Tratamiento con antiagregantes (%)</b>    | 84 (51.9)             | 22 (51.2)            | -                   | 0.345               | 22 (48.9)                 | 0.725               |
| <b>Colesterol total (mg/dl)</b>              | 214.9±42              | 214.7±37             | 207±12.8            | 0.964               | 214.3±36                  | 0.933               |
| <b>HDL-colesterol (mg/dl)</b>                | 54.8±15.6             | 51±14.4              | 37±5.7              | 0.105               | 50.3±14.4                 | 0.086               |
| <b>Apo B (mg/dl)</b>                         | 132±147               | 125±129              | 119±1.4             | 0.961               | 125±126                   | 0.782               |
| <b>Triglicéridos (mg/dl)</b>                 | 187±78                | 155±64.7             | 209±130             | 0.052               | 158±67                    | 0.025               |
| <b>Creatinina sérica (mg/dl)</b>             | 1.8±0.9               | 2±1.5                | 1.2±0.4             | 0.468               | 2±1.4                     | 0.491               |
| <b>Ácido úrico (mg/dl)</b>                   | 7.9±1.8               | 7.6±1.7              | 6.9±1.4             | 0.429               | 7.5±1.7                   | 0.234               |

X±DE: media±desviación típica. \*P= ANOVA intragrupos, o X<sup>2</sup> según procediese.

^P= E3/4+E4/4 vs. E3/3. PreTx o posTx: pre o postrasplante; DM: diabetes mellitus.

T°: tiempo; HTA: hipertensión arterial; CMV: citomegalovirus.

**Tabla 11. Factores de riesgo para la aparición de ECV después del trasplante.**

|                                   | <b>Odds Ratio</b> | <b>IC 95%</b> | <b>P</b> |
|-----------------------------------|-------------------|---------------|----------|
| <b>Edad</b>                       | 1.08              | 1.4 - 1.12    | 0.012    |
| <b>Sexo varón</b>                 | 2.78              | 1.07 – 7.24   | 0.036    |
| <b>Ateromatosis pretrasplante</b> | 6.10              | 1.92 – 19.42  | 0.002    |
| <b>Diabetes pretrasplante</b>     | 4.74              | 1.29 – 17.40  | 0.019    |
| <b>HTA postrasplante</b>          | 4.37              | 1.07 – 17.85  | 0.040    |
| <b>Dislipemia postrasplante</b>   | 8.26              | 2.49 – 27.40  | 0.001    |
| <b>Genotipo DD</b>                | 2.77              | 1.22 – 6.27   | 0.014    |
| <b>Genotipos AC + CC</b>          | 1.80              | 0.80 – 4.03   | 0.156    |

Modelo de regresión logística “paso a paso” (N= 207 trasplantes y 77 eventos CV). Una Odds ratio >1 indica un mayor riesgo de sufrir alguna ECV. Otras variables incluidas en el modelo, pero que no alcanzaron significación estadística, fueron función renal, HVI, índice de masa corporal, hábito de fumar, ingesta de IECAs, diabetes postrasplante de novo, episodios de rechazo, genotipos MT+TT y E3/4+E4/4 y tiempo en diálisis (cada una P>0.05).

HTA: hipertensión arterial.

**Tabla 12. Factores de riesgo para la aparición de ECV después del trasplante, según el análisis multivariado de Cox.**

|                                   | <b>Riesgo Relativo</b> | <b>IC 95%</b> | <b>P</b> |
|-----------------------------------|------------------------|---------------|----------|
| <b>Edad</b>                       | 1.07                   | 1.03 – 1.10   | 0.000    |
| <b>Sexo (varón)</b>               | 2.44                   | 1.28 – 4.67   | 0.007    |
| <b>Ateromatosis pretrasplante</b> | 2.53                   | 1.22 – 5.25   | 0.013    |
| <b>Diabetes pretrasplante</b>     | 2.87                   | 1.13 – 7.2    | 0.026    |
| <b>HTA postrasplante</b>          | 0.73                   | 0.21 – 2.48   | 0.608    |
| <b>Dislipemia postrasplante</b>   | 7.46                   | 3.11 – 17.87  | 0.000    |
| <b>Hábito de fumar</b>            | 0.90                   | 0.33 – 2.45   | 0.846    |
| <b>Genotipo DD</b>                | 3.12                   | 1.16 – 8.38   | 0.024    |
| <b>Alelo C</b>                    | 1.41                   | 0.77 - 2.58   | 0.262    |
| <b>Alelo T</b>                    | 1.67                   | 0.94 – 2.97   | 0.083    |
| <b>Alelo E4</b>                   | 0.83                   | 0.4 – 1.4     | 0.342    |
| <b>Genotipo DD * DM preTx</b>     | 0.21                   | 0.06 – 0.71   | 0.013    |

HTA: hipertensión arterial.

DM preTx: diabetes mellitus pretrasplante.

**Tabla 13. Complicaciones cardiovasculares según los polimorfismos de los genes de la enzima de conversión de angiotensina (ECA), receptor de angiotensina II de tipo 1 (AT1R), angiotensinógeno (AGT) y apolipoproteína E (apo E) en enfermos sin diabetes pretrasplante.**

|       |                 | ECV<br>n = 48 | Sin ECV<br>n = 120 | Valor *P |
|-------|-----------------|---------------|--------------------|----------|
| ECA   | DD (%)          | 27 (56)       | 43 (36)            | 0.024    |
|       | ID + II (%)     | 21 (44)       | 77 (64)            |          |
| AT1R  | AA (%)          | 20 (41)       | 72 (60)            | 0.039    |
|       | AC + CC (%)     | 28 (58)       | 48 (40)            |          |
| AGT   | MM (%)          | 16 (33)       | 43 (36)            | 0.859    |
|       | MT + TT (%)     | 32 (66)       | 77 (64)            |          |
| Apo E | E3/3 (%)        | 38 (79)       | 93 (77)            | 0.815    |
|       | E3/4 + E4/4 (%) | 10 (21)       | 27 (22.5)          |          |

\* Test de la Chi-cuadrado; ECV= enfermedad cardiovascular.

**Tabla 14. Distribución de los genotipos de los polimorfismos del gen de la enzima de conversión de angiotensina (ECA) y del receptor de Ang II de tipo 1 (AT1R) en pacientes sin diabetes mellitus pretrasplante, respecto a la aparición de ECV postrasplante.**

| ECA  |             | DD<br>N = 70   |                   | II + ID<br>N = 98 |                   |
|------|-------------|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|      |             | ECV<br>n = 27  | Sin ECV<br>n = 43 | ECV<br>n = 21     | Sin ECV<br>n = 77 |
| AT1R | AA (%)      | 7 (26)         | 30 (70)           | 13 (62)           | 42 (54)           |
|      | AC + CC (%) | 20 (74)        | 13 (30)           | 8 (38)            | 35 (46)           |
|      |             | <i>P=0.000</i> |                   | <i>P=0.625</i>    |                   |

P= según test de la Chi-cuadrado. ECV= enfermedad cardiovascular.

**Tabla 15. Datos clínicos de los pacientes sin diabetes mellitus pretrasplante con y sin enfermedad cardiovascular (ECV).**

|   | <b>ECV<br/>n = 48</b> | <b>Sin ECV<br/>n = 120</b> | <b>Valor P</b> |
|---|-----------------------|----------------------------|----------------|
| <b>Edad (años)</b>                                | 59.6±7.8              | 45.5±13                    | 0.000          |
| <b>Sexo (%varones)</b>                            | 40 (83)               | 78 (65)                    | 0.024          |
| <b>Diabetes mellitus postTx (%)</b>               | 7 (14.5)              | 15 (12.5)                  | 0.446          |
| <b>Tiempo diálisis (meses)</b>                    | 35.3±34               | 60±220                     | 0.457          |
| <b>HTA pretrasplante (%)</b>                      | 37 (77)               | 74 (61)                    | 0.102          |
| <b>HTA postrasplante (%)</b>                      | 45 (94)               | 102 (85)                   | 0.094          |
| <b>Dislipemia preTx (%)</b>                       | 11 (38)               | 12 (14)                    | 0.009          |
| <b>Dislipemia postTx (%)</b>                      | 42 (87.5)             | 81 (67)                    | 0.005          |
| <b>Ateromatosis preTx (%)</b>                     | 12 (25)               | 10 (8.3)                   | 0.006          |
| <b>Tiempo evolución postTx (años)</b>             | 5.54±3                | 6±3.4                      | 0.334          |
| <b>Nº rechazos agudos 1er. Año</b>                | 0.68±0.8              | 0.7±0.8                    | 0.885          |
| <b>Infección por CMV (%)</b>                      | 13 (27)               | 57 (47)                    | 0.011          |
| <b>Índice de masa corporal (Kg/m<sup>2</sup>)</b> | 28.7±5                | 27.2±5.2                   | 0.860          |
| <b>Fumador (%)</b>                                | 9 (19)                | 20 (17)                    | 0.453          |
| <b>Tratamiento con IECA (%)</b>                   | 17 (35)               | 41 (34)                    | 0.507          |
| <b>Tratamiento con antiagregantes (%)</b>         | 35 (73)               | 43 (36)                    | 0.000          |

X±DE: media ± desviación típica.

**Tabla 16. Datos clínicos y factores de riesgo vascular según el polimorfismo del gen de la enzima de conversión de angiotensina (ECA) en pacientes sin diabetes mellitus pretrasplante.**

|   | <b>DD<br/>N=70</b> | <b>ID<br/>N=79</b> | <b>II<br/>N=19</b> | <b>Valor<br/>*P</b> | <b>ID/II<br/>N=98</b> | <b>Valor<br/>^P</b> |
|---|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|
| <b>Edad (años)</b>                                | 50±13.7            | 49.1±12.6          | 49.6±13.7          | 0.914               | 49.2±12.7             | 0.687               |
| <b>Sexo (%varones)</b>                            | 47 (67)            | 56 (71)            | 15 (79)            | 0.599               | 71 (72.4)             | 0.458               |
| <b>Tiempo diálisis (meses)</b>                    | 28.7±31            | 23±24.3            | 53.8±51            | 0.001               | 28.7±33               | 0.993               |
| <b>Dislipemia preTx (%)</b>                       | 11 (23)            | 10 (18)            | 2 (16.7)           | 0.733               | 12 (18)               | 0.436               |
| <b>Ateromatosis preTx (%)</b>                     | 7 (10)             | 10 (12.7)          | 5 (26.3)           | 0.172               | 15 (15.3)             | 0.315               |
| <b>Diabetes posTx (%)</b>                         | 7 (10)             | 14 (17)            | 1 (53)             | 0.212               | 15 (15.5)             | 0.231               |
| <b>Tiempo evolución posTx (años)</b>              | 5.9±3.7            | 5.9±3              | 6.2±3.3            | 0.947               | 5.9±3                 | 0.912               |
| <b>Índice de masa corporal (Kg/m<sup>2</sup>)</b> | 28.2±5.1           | 27.2±4.9           | 27.6±6.7           | 0.538               | 27.2±5.3              | 0.279               |
| <b>Fumador (%)</b>                                | 11 (15.7)          | 14 (17.7)          | 4 (21)             | 0.852               | 18 (18.4)             | 0.654               |
| <b>Dislipemia posTx (%)</b>                       | 57 (81)            | 56 (71)            | 10 (52)            | 0.035               | 66 (67.3)             | 0.042               |
| <b>Colesterol total (mg/dl)</b>                   | 211±39.4           | 221±38.3           | 219±45.7           | 0.291               | 220±39.6              | 0.118               |
| <b>Triglicéridos (mg/dl)</b>                      | 184±69.5           | 177±80.6           | 157±60.6           | 0.368               | 173±77.3              | 0.346               |
| <b>HTA posTx (%)</b>                              | 61 (87)            | 70 (88.6)          | 16 (84)            | 0.867               | 86 (87.8)             | 0.906               |
| <b>Creatinina sérica (mg/dl)</b>                  | 1.68±0.8           | 1.92±1.2           | 2.35±1.5           | 0.066               | 2±1.3                 | 0.070               |
| <b>Tratamiento con IECA (%)</b>                   | 26 (37)            | 29 (36.7)          | 3 (15.8)           | 0.189               | 43 (44)               | 0.433               |
| <b>Tratamiento con antiagregantes (%)</b>         | 35 (50)            | 37 (46.8)          | 6 (31.6)           | 0.359               | 32 (32.7)             | 0.546               |

X±DE: media±desviación típica. \*P= ANOVA intragrupos, o X<sup>2</sup> según procediese.

^P= ID/II vs. DD. PreTx o PosTx: pre o postrasplante; HTA: hipertensión arterial.



**Tabla 17. Datos clínicos y factores de riesgo vascular según el polimorfismo del gen del receptor de angiotensina II de tipo 1 (AT1R) en pacientes sin diabetes mellitus pretrasplante.**

|  | AA<br>N=92 | AC<br>N=66 | CC<br>N=10 | Valor<br>*P | AC/CC<br>N=76 | Valor<br>^P |
|--|------------|------------|------------|-------------|---------------|-------------|
| Edad (años)                                  | 47.6±13    | 50.9±13    | 58.6±10.7  | 0.024       | 51.9±13       | 0.037       |
| Sexo (%varones)                              | 66 (71.7)  | 45 (68.2)  | 7 (70)     | 0.890       | 52 (68.4)     | 0.640       |
| Tiempo diálisis (meses)                      | 33.7±37.8  | 23±22.9    | 19.4±13.8  | 0.090       | 22.6±21.8     | 0.030       |
| Dislipemia preTx (%)                         | 13 (20.6)  | 9 (20.5)   | 1 (16.7)   | 0.974       | 10 (20)       | 0.934       |
| Ateromatosis preTx (%)                       | 13 (14.1)  | 8 (12.1)   | 1 (10)     | 0.893       | 9 (11.8)      | 0.662       |
| Diabetes posTx (%)                           | 14 (15.2)  | 16 (24.6)  | 2 (20)     | 0.574       | 10 (13.2)     | 0.983       |
| Tiempo evolución posTx (años)                | 6±3.3      | 5.8±3.2    | 5.5±4.6    | 0.855       | 5.8±3.4       | 0.648       |
| Índice de masa corporal (Kg/m <sup>2</sup> ) | 27.4±5.5   | 27.8±4.8   | 28.9±5     | 0.673       | 27.9±4.8      | 0.513       |
| Fumador (%)                                  | 20 (21.7)  | 9 (13.6)   | -          | 0.136       | 9 (11.8)      | 0.091       |
| Dislipemia posTx (%)                         | 67 (72.8)  | 50 (75.8)  | 6 (60)     | 0.573       | 56 (73.7)     | 0.901       |
| Colesterol total (mg/dl)                     | 216.4±43   | 219.6±36   | 198±21.7   | 0.288       | 216.8±35      | 0.946       |
| Triglicéridos (mg/dl)                        | 177±63.5   | 181.7±88   | 159±62     | 0.678       | 178.8±85      | 0.899       |
| HTA posTx (%)                                | 7 (83.7)   | 61 (92.4)  | 9 (90)     | 0.254       | 70 (92.1)     | 0.101       |
| Creatinina sérica (mg/dl)                    | 2±1.2      | 1.7±1      | 1.6±1      | 0.146       | 1.7±1         | 0.051       |
| Tratamiento con IECA (%)                     | 34 (37)    | 23 (34.8)  | 1 (10)     | 0.234       | 24 (31.6)     | 0.466       |
| Tratamiento con antiagregantes (%)           | 40 (43.5)  | 33 (50)    | 5 (50)     | 0.701       | 38 (50)       | 0.399       |

X±DE: media±desviación típica. \*P= ANOVA intragrupos, o X<sup>2</sup> según procediese.

^P= AC/CC vs. AA. PreTx o posTx: pre o postrasplante; HTA: hipertensión arterial.

**Tabla 18. Datos clínicos y factores de riesgo vascular según el polimorfismo del gen del angiotensinógeno (AGT) en pacientes sin diabetes mellitus pretrasplante.**

|  | MM<br>N=59 | MT<br>N=88 | TT<br>N=21 | Valor<br>*P | MT/TT<br>N=109 | Valor<br>^P |
|--|------------|------------|------------|-------------|----------------|-------------|
| Edad (años)                                  | 52.2±10.8  | 48.3±13.4  | 47.6±17    | 0.162       | 48±14          | 0.057       |
| Sexo (%varones)                              | 36 (61)    | 66 (75)    | 16 (76.2)  | 0.156       | 82 (75.2)      | 0.054       |
| Tiempo diálisis (meses)                      | 31.6±38.5  | 27±25      | 27±41.4    | 0.719       | 27.2±28.2      | 0.416       |
| Dislipemia preTx (%)                         | 10 (25.6)  | 9 (15.3)   | 4 (26.7)   | 0.370       | 13 (17.6)      | 0.311       |
| Ateromatosis preTx (%)                       | 8 (13.6)   | 11 (12.5)  | 3 (14.3)   | 0.968       | 14 (12.8)      | 0.896       |
| Diabetes posTx (%)                           | 11 (19)    | 16 (18.2)  | 5 (23.8)   | 0.705       | 14 (12.8)      | 0.896       |
| Tiempo evolución posTx (años)                | 6.5±3.9    | 5.6±3      | 5.8±2.5    | 0.245       | 5.6±3          | 0.097       |
| Índice de masa corporal (Kg/m <sup>2</sup> ) | 28.5±5.5   | 27.4±5     | 26±4.8     | 0.138       | 27±5           | 0.097       |
| Fumador (%)                                  | 13 (22)    | 14 (16)    | 2 (9.5)    | 0.380       | 16 (14.7)      | 0.229       |
| Dislipemia posTx (%)                         | 45 (76.3)  | 64 (72.7)  | 14 (66.7)  | 0.687       | 78 (71.6)      | 0.510       |
| Colesterol total (mg/dl)                     | 214±37.5   | 219±43.7   | 214±27.3   | 0.731       | 218±41         | 0.536       |
| Triglicéridos (mg/dl)                        | 185±87.5   | 177±66.3   | 162±63.8   | 0.479       | 174±65.8       | 0.365       |
| HTA posTx (%)                                | 51 (86.4)  | 78 (88.6)  | 18 (85.7)  | 0.893       | 96 (88)        | 0.760       |
| Creatinina sérica (mg/dl)                    | 1.9±1.3    | 1.9±1      | 1.7±0.7    | 0.809       | 1.9±1          | 0.915       |
| Tratamiento con IECA (%)                     | 21 (35.6)  | 28 (31.8)  | 9 (42.9)   | 0.619       | 37 (34)        | 0.830       |
| Tratamiento con antiagregantes (%)           | 32 (54.2)  | 34 (38.6)  | 12 (57)    | 0.102       | 46 (42.2)      | 0.135       |

X±DE: media±desviación típica. \*P= ANOVA intragrupos, o X<sup>2</sup> según procediese.

^P= MT/TT vs. MM. PreTx o posTx: pre o postrasplante; HTA: hipertensión arterial.

**Tabla 19. Datos clínicos y factores de riesgo vascular según el polimorfismo del gen de la apolipoproteína E (apo E) en pacientes sin diabetes mellitus pretrasplante.**

|   | <b>E3/3<br/>N=131</b> | <b>E3/4<br/>N=35</b> | <b>E4/4<br/>N=2</b> | <b>Valor<br/>*P</b> | <b>E3/4+E4/4<br/>N=37</b> | <b>Valor<br/>^P</b> |
|---|-----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|
| <b>Edad (años)</b>                                | 49.6±13               | 49.7±13.6            | 47.5±14.8           | 0.974               | 49.6±13.5                 | 0.998               |
| <b>Sexo (%varones)</b>                            | 88 (67.2)             | 29 (83)              | 1 (50)              | 0.162               | 30 (81)                   | 0.102               |
| <b>Tiempo diálisis (meses)</b>                    | 25.5±29.8             | 40±37.7              | 28±19.8             | 0.064               | 39.4±36.9                 | 0.022               |
| <b>Dislipemia preTx (%)</b>                       | 20 (22.5)             | 3 (13)               | -                   | 0.533               | 3 (12.5)                  | 0.282               |
| <b>Ateromatosis preTx (%)</b>                     | 16 (12.2)             | 6 (17)               | -                   | 0.639               | 6 (16.2)                  | 0.524               |
| <b>Diabetes posTx (%)</b>                         | 24 (18.5)             | 7 (20)               | 1 (50)              | 0.672               | 8 (21.6)                  | 0.082               |
| <b>Tiempo evolución posTx (años)</b>              | 5.8±3.2               | 6.4±3.4              | 9.3±9.4             | 0.226               | 6.5±3.7                   | 0.224               |
| <b>Índice de masa corporal (Kg/m<sup>2</sup>)</b> | 27.8±5.3              | 27±4.9               | 29.6±7              | 0.584               | 27±5                      | 0.441               |
| <b>Fumador (%)</b>                                | 23 (17.6)             | 6 (17)               | -                   | 0.808               | 6 (16.2)                  | 0.849               |
| <b>Dislipemia posTx (%)</b>                       | 99 (75.6)             | 23 (65.7)            | 1 (50)              | 0.382               | 24 (65)                   | 0.194               |
| <b>Colesterol total (mg/dl)</b>                   | 216±40.6              | 217.5±38             | 207±12.7            | 0.935               | 217±37                    | 0.952               |
| <b>Triglicéridos (mg/dl)</b>                      | 183±74.5              | 156.7±68             | 209±130             | 0.144               | 159±70.7                  | 0.087               |
| <b>HTA posTx (%)</b>                              | 114 (87)              | 31 (88.6)            | 2 (100)             | 0.840               | 33 (89.2)                 | 0.725               |
| <b>Creatinina sérica (mg/dl)</b>                  | 1.8±1                 | 2±1.5                | 1.2±0.4             | 0.473               | 2±1.5                     | 0.481               |
| <b>Tratamiento con IECA (%)</b>                   | 47 (36)               | 11 (31)              | -                   | 0.520               | 11 (29.7)                 | 0.487               |
| <b>Tratamiento con antiagregantes (%)</b>         | 62 (47.3)             | 16 (45.7)            | -                   | 0.410               | 16 (43.2)                 | 0.660               |

X±DE: media±desviación típica. \*P= ANOVA intragrupos, o X<sup>2</sup> según procediese.

^P=E3/4+E4/4 vs. E3/3.. PreTx o posTx: pre o postrasplante; HTA: hipertensión arterial.

**Tabla 20. Factores de riesgo vascular para el desarrollo de complicaciones cardiovasculares postrasplante en pacientes sin diabetes mellitus pretrasplante.**

|                              | <b>Odds Ratio</b> | <b>IC 95%</b> | <b>P</b> |
|------------------------------|-------------------|---------------|----------|
| <b>Edad</b>                  | 1.13              | 1.07 – 1.18   | 0.000    |
| <b>Sexo (varón)</b>          | 4                 | 1.28 – 12.4   | 0.016    |
| <b>Hábito de fumar</b>       | 5.9               | 1.6 – 22.5    | 0.008    |
| <b>Genotipo DD</b>           | 2.9               | 1.2 – 7.3     | 0.026    |
| <b>Genotipo DD * alelo C</b> | 9.2               | 2 - 41        | 0.004    |

Modelo de regresión logística “paso a paso” (N=168 trasplantes y 48 eventos CV). Una Odds ratio >1 indica un mayor riesgo de sufrir un evento CV. Otras variables incluidas en el modelo, pero sin significación estadística fueron: ateromatosis pretrasplante, dislipemia, índice de masa corporal, HTA, ingesta de IECAs, función renal, diabetes postrasplante y genotipos CC del AT1R, MT+TT del AGT y alelo E4 (E3/4+E4/4) de la apo E (cada una con P>0.05).

**Tabla 21. Características clínicas de los pacientes con un tiempo de seguimiento menor o igual a 5 años, en función de presentar o no complicaciones cardiovasculares postrasplante.**

|   | <b>ECV<br/>n = 50</b> | <b>Sin ECV<br/>n = 60</b> | <b>Valor P</b> |
|---|-----------------------|---------------------------|----------------|
| <b>Edad (años)</b>                                | 56±11.6               | 45.7±13.4                 | 0.000          |
| <b>Sexo (%varones)</b>                            | 39 (78)               | 41 (68.3)                 | 0.257          |
| <b>Diabetes mellitus preTx (%)</b>                | 24 (48)               | 6 (10)                    | 0.000          |
| <b>Diabetes mellitus posTx (%)</b>                | 6 (12)                | 9 (15)                    | 0.199          |
| <b>Tiempo diálisis (meses)</b>                    | 24±27                 | 24.7±34.3                 | 0.919          |
| <b>HTA pretrasplante (%)</b>                      | 45 (90)               | 40 (66.7)                 | 0.001          |
| <b>HTA postrasplante (%)</b>                      | 47 (94)               | 51 (85)                   | 0.132          |
| <b>Dislipemia pretrasplante (%)</b>               | 25 (59.5)             | 9 (16.4)                  | 0.000          |
| <b>Dislipemia postrasplante (%)</b>               | 44 (88)               | 37 (61.7)                 | 0.002          |
| <b>Ateromatosis pretrasplante (%)</b>             | 31 (62)               | 12 (20)                   | 0.000          |
| <b>Nº rechazos agudos</b>                         | 0.7±0.9               | 0.6±0.8                   | 0.871          |
| <b>Rechazo crónico (%)</b>                        | 6 (12)                | 3 (5)                     | 0.182          |
| <b>Infección por CMV (%)</b>                      | 15 (30)               | 26 (43.3)                 | 0.150          |
| <b>Índice de masa corporal (Kg/m<sup>2</sup>)</b> | 27.8±6                | 27.4±5                    | 0.698          |
| <b>Fumador (%)</b>                                | 5 (10)                | 12 (20)                   | 0.149          |
| <b>Tratamiento con IECAs (%)</b>                  | 21 (42)               | 24 (40)                   | 0.832          |
| <b>Tratamiento con antiagregantes (%)</b>         | 36 (72)               | 26 (43.3)                 | 0.003          |
| <b>Colesterol total (mg/dl)</b>                   | 212±49                | 209±33.6                  | 0.717          |
| <b>Triglicéridos (mg/dl)</b>                      | 204±81.8              | 173±91.7                  | 0.067          |
| <b>Creatinina sérica (mg/dl)</b>                  | 1.8±0.7               | 1.7±0.9                   | 0.512          |

X±DE: media±desviación típica. ECV: enfermedad cardiovascular; PreTx o posTx: pretrasplante o postrasplante. CMV: citomegalovirus; HTA: hipertensión arterial; IECA: inhibidor de la enzima de conversión de angiotensina.

**Tabla 22. Complicaciones cardiovasculares según los polimorfismos de los genes de la enzima de conversión de angiotensina (ECA), receptor de angiotensina II de tipo 1 (AT1R), angiotensinógeno (AGT) y apolipoproteína E (apo E) en pacientes con tiempo de seguimiento menor o igual a 5 años.**

|              |                        | <b>ECV<br/>n = 50</b> | <b>Sin ECV<br/>n = 60</b> | <b>Valor P*</b> |
|--------------|------------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------|
| <b>ECA</b>   | <b>DD (%)</b>          | 27 (54)               | 24 (40)                   |                 |
|              | <b>ID + II (%)</b>     | 23 (46)               | 36 (60)                   | 0.143           |
| <b>AT1R</b>  | <b>AA (%)</b>          | 22 (44)               | 34 (56.7)                 |                 |
|              | <b>AC + CC (%)</b>     | 28 (56)               | 26 (43.3)                 | 0.186           |
| <b>AGT</b>   | <b>MM (%)</b>          | 14 (28)               | 23 (38.3)                 |                 |
|              | <b>MT + TT (%)</b>     | 36 (72)               | 37 (61.7)                 | 0.253           |
| <b>Apo E</b> | <b>E3/3 (%)</b>        | 40 (80)               | 48 (80)                   |                 |
|              | <b>E3/4 + E4/4 (%)</b> | 10 (20)               | 10 (20)                   | 1.000           |

\* Test de la Chi-cuadrado.

ECV= enfermedad cardiovascular

**Tabla 23: Distribución de los genotipos de los polimorfismos del gen del receptor de angiotensina II de tipo 1 (AT1R), angiotensinógeno (AGT) y apolipoproteína E (apo E) en pacientes con tiempo de seguimiento menor o igual a 5 años, con respecto al polimorfismo de la enzima de conversión de angiotensina (ECA).**

| ECA   |                 | DD<br>N = 51   |                   | II + ID<br>N = 59 |                   |
|-------|-----------------|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|       |                 | ECV<br>n = 27  | Sin ECV<br>n = 24 | ECV<br>n = 23     | Sin ECV<br>n = 36 |
| AT1R  | AA (%)          | 11 (41)        | 16 (67)           | 11 (48)           | 18 (50)           |
|       | AC + CC (%)     | 16 (59)        | 8 (33)            | 12 (52)           | 18 (50)           |
|       |                 | <i>P=0.064</i> |                   | <i>P=0.871</i>    |                   |
| AGT   | MM (%)          | 7 (26)         | 8 (33)            | 7 (30)            | 15 (41)           |
|       | MT + TT (%)     | 20 (74)        | 16 (67)           | 16 (70)           | 21 (59)           |
|       |                 | <i>P=0.759</i> |                   | <i>P=0.422</i>    |                   |
| Apo E | E3/3 (%)        | 23 (85)        | 20 (83)           | 17 (74)           | 18 (78)           |
|       | E3/4 + E4/4 (%) | 4 (15)         | 4 (17)            | 6 (26)            | 8 (22)            |
|       |                 | <i>P=0.856</i> |                   | <i>P=0.762</i>    |                   |

X<sup>2</sup>: test de la Chi-cuadrado, o test exacto de Fisher, según procediese.

ECV= enfermedad cardiovascular

**Tabla 24. Características clínicas de los pacientes con un tiempo de seguimiento mayor a 5 años, en función de presentar o no complicaciones cardiovasculares postrasplante.**

|   | <b>ECV<br/>n = 27</b> | <b>Sin ECV<br/>n = 70</b> | <b>Valor P</b> |
|---|-----------------------|---------------------------|----------------|
| <b>Edad (años)</b>                                | 58±6.5                | 45.7±11.6                 | 0.000          |
| <b>Sexo (%varones)</b>                            | 21 (77.8)             | 45 (64.3)                 | 0.202          |
| <b>Diabetes mellitus preTx (%)</b>                | 5 (18.5)              | 4 (5.7)                   | 0.051          |
| <b>Diabetes mellitus posTx (%)</b>                | 6 (22.2)              | 10 (14.3)                 | 0.345          |
| <b>Tiempo diálisis (meses)</b>                    | 37.5±33.8             | 25.6±25.3                 | 0.077          |
| <b>HTA pretrasplante (%)</b>                      | 21 (77.8)             | 42 (60)                   | 0.256          |
| <b>HTA postrasplante (%)</b>                      | 26 (96.3)             | 58 (82.9)                 | 0.082          |
| <b>Dislipemia pretrasplante (%)</b>               | 3 (25)                | 4 (11.4)                  | 0.254          |
| <b>Dislipemia postrasplante (%)</b>               | 24 (89)               | 47 (67)                   | 0.030          |
| <b>Ateromatosis pretrasplante (%)</b>             | 7 (26)                | 4 (5.7)                   | 0.005          |
| <b>Nº rechazos agudos</b>                         | 0.7±0.7               | 0.7±0.8                   | 0.731          |
| <b>Rechazo crónico (%)</b>                        | 2 (7.4)               | 17 (24.3)                 | 0.060          |
| <b>Infección por CMV (%)</b>                      | 6 (22.2)              | 34 (48.6)                 | 0.018          |
| <b>Índice de masa corporal (Kg/m<sup>2</sup>)</b> | 27.3±3.4              | 26.9±5.5                  | 0.753          |
| <b>Fumador (%)</b>                                | 5 (18.5)              | 11 (15.7)                 | 0.739          |
| <b>Tratamiento con IECAs (%)</b>                  | 11 (40.7)             | 21 (30)                   | 0.313          |
| <b>Tratamiento con antiagregantes (%)</b>         | 19 (70.4)             | 25 (35.7)                 | 0.002          |
| <b>Colesterol total (mg/dl)</b>                   | 220±31.7              | 219±43                    | 0.911          |
| <b>Triglicéridos (mg/dl)</b>                      | 203±63                | 161.5±57.3                | 0.002          |
| <b>Creatinina sérica (mg/dl)</b>                  | 1.8±1.1               | 2±1.4                     | 0.245          |

X±DE: media±desviación típica. ECV: enfermedad cardiovascular PreTx o posTx:

pretrasplante o postrasplante ; CMV: citomegalovirus; HTA: hipertensión arterial;

IECA: inhibidor de la enzima de conversión de angiotensina.



**Tabla 25. Complicaciones cardiovasculares según los polimorfismos de los genes de la enzima de conversión de angiotensina (ECA), receptor de angiotensina II de tipo 1 (AT1R), angiotensinógeno (AGT) y apolipoproteína E (apo E) en pacientes con tiempo de seguimiento mayor a 5 años.**

|              |                        | <b>ECV<br/>n = 27</b> | <b>Sin ECV<br/>n = 70</b> | <b>Valor P*</b> |
|--------------|------------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------|
| <b>ECA</b>   | <b>DD (%)</b>          | 15 (55.6)             | 24 (34.3)                 |                 |
|              | <b>ID + II (%)</b>     | 12 (44.4)             | 46 (65.7)                 | 0.056           |
| <b>AT1R</b>  | <b>AA (%)</b>          | 12 (44.4)             | 44 (63)                   |                 |
|              | <b>AC + CC (%)</b>     | 15 (55.6)             | 26 (37)                   | 0.100           |
| <b>AGT</b>   | <b>MM (%)</b>          | 11 (40.7)             | 24 (34.3)                 |                 |
|              | <b>MT + TT (%)</b>     | 16 (59.3)             | 46 (65.7)                 | 0.553           |
| <b>Apo E</b> | <b>E3/3 (%)</b>        | 21 (77.8)             | 53 (75.7)                 |                 |
|              | <b>E3/4 + E4/4 (%)</b> | 6 (22.2)              | 17 (24.3)                 | 0.830           |

\* Test de la Chi-cuadrado.

ECV= enfermedad cardiovascular

**Tabla 26: Distribución de los genotipos de los polimorfismos del gen del receptor de angiotensina II de tipo 1 (AT1R), angiotensinógeno (AGT) y apolipoproteína E (apo E) en pacientes con tiempo de seguimiento mayor a 5 años, con respecto al polimorfismo de la enzima de conversión de angiotensina (ECA).**

| ECA   |                 | DD<br>N = 39     |                   | II + ID<br>N = 58 |                   |
|-------|-----------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|       |                 | ECV<br>n = 15    | Sin ECV<br>n = 24 | ECV<br>n = 12     | Sin ECV<br>n = 46 |
| AT1R  | AA (%)          | 5 (33)           | 18 (75)           | 7 (58)            | 26 (56)           |
|       | AC + CC (%)     | 10 (67)          | 6 (25)            | 5 (42)            | 20 (44)           |
|       |                 | <i>*P= 0.010</i> |                   | <i>*P= 0.254</i>  |                   |
| AGT   | MM (%)          | 6 (40)           | 4 (17)            | 5 (42)            | 20 (43)           |
|       | MT + TT (%)     | 9 (60)           | 20 (83)           | 7 (58)            | 26 (57)           |
|       |                 | <i>*P= 0.107</i> |                   | <i>*P= 0.254</i>  |                   |
| Apo E | E3/3 (%)        | 10 (67)          | 18 (75)           | 11 (92)           | 35 (76)           |
|       | E3/4 + E4/4 (%) | 5 (33)           | 6 (25)            | 1 (8)             | 11 (24)           |
|       |                 | <i>*P= 0.241</i> |                   | <i>*P= 0.179</i>  |                   |

\* Test exacto de Fisher.

ECV= enfermedad cardiovascular

**Tabla 27. Factores de riesgo vascular en pacientes con tiempo de seguimiento menor o igual a 5 años.**

|                                 | <b>Odds Ratio</b> | <b>IC 95%</b> | <b>P</b> |
|---------------------------------|-------------------|---------------|----------|
| <b>Edad</b>                     | 1.09              | 1.042 – 1.14  | 0.000    |
| <b>Sexo (varón)</b>             | 3.5               | 1.1 – 10.7    | 0.033    |
| <b>Diabetes pretrasplante</b>   | 21                | 5 – 83        | 0.000    |
| <b>Dislipemia postrasplante</b> | 7.4               | 1.8 – 30      | 0.005    |
| <b>Genotipo DD</b>              | 2.1               | 0.7 – 5.8     | 0.148    |

Modelo de regresión logística “paso a paso” (N= 110 trasplantes y 50 eventos CV). Otras variables incluídas en el modelo, pero sin significación estadística fueron: índice de masa corporal, hábito de fumar, HTA, y los genotipos AC+CC, MT+TT y E3/4+E4/4 (cada una con una P>0.05).

**Tabla 28. Factores de riesgo vascular para el desarrollo de complicaciones cardiovasculares en pacientes sin diabetes mellitus pretrasplante y con tiempo de seguimiento menor o igual a 5 años.**

|                     | <b>Odds Ratio</b> | <b>IC 95%</b> | <b>P</b> |
|---------------------|-------------------|---------------|----------|
| <b>Edad</b>         | 1.12              | 1.06 – 1.2    | 0.000    |
| <b>Sexo (varón)</b> | 6.3               | 1.4 – 29      | 0.018    |
| <b>Genotipo DD</b>  | 3.5               | 1.01 – 12     | 0.047    |

Modelo de regresión logística “paso a paso” (N= 80 trasplantes y 26 eventos CV). Otras variables incluídas en el modelo, pero sin significación estadística fueron: índice de masa corporal, hábito de fumar, HTA, dislipemia, y los genotipos AC+CC, MT+TT y E3/4+E4/4 (cada una con una P>0.05).

**Tabla 29. Factores de riesgo vascular para el desarrollo de complicaciones cardiovasculares en pacientes sin diabetes mellitus pretrasplante y con tiempo de seguimiento mayor a 5 años.**

|                        | <b>Odds Ratio</b> | <b>IC 95%</b> | <b>P</b> |
|------------------------|-------------------|---------------|----------|
| <b>Edad</b>            | 1.17              | 1.08 – 1.3    | 0.000    |
| <b>Hábito de fumar</b> | 8.3               | 1.1 – 62      | 0.041    |
| <b>Triglicéridos</b>   | 1.012             | 1.001 – 1.02  | 0.026    |

Modelo de regresión logística “paso a paso” (N= 88 trasplantes y 22 eventos CV). Otras variables incluidas en el modelo, pero sin significación estadística fueron: índice de masa corporal, HTA, dislipemia, sexo y los genotipos desfavorables de los polimorfismos estudiados: DD, AC+CC, MT+TT y E3/4+E4/4 (cada una con una  $P > 0.05$ ).

**Tabla 30. Distribución de las frecuencias de los genotipos de los polimorfismos del sistema renina-angiotensina y de la apolipoproteína E (apo E) en pacientes con nefropatía crónica del injerto (NCI) y el resto de pacientes.**

|              |                        | <b>NCI<br/>n = 28</b> | <b>Resto<br/>n = 179</b> | <b>Valor *P</b> |
|--------------|------------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------|
| <b>ECA</b>   | <b>DD (%)</b>          | 11 (39)               | 79 (44)                  |                 |
|              | <b>ID + II (%)</b>     | 17 (61)               | 100 (56)                 | 0.686           |
| <b>AT1R</b>  | <b>AA (%)</b>          | 19 (68)               | 93 (52)                  |                 |
|              | <b>AC + CC (%)</b>     | 9 (32)                | 86 (48)                  | 0.153           |
| <b>AGT</b>   | <b>MM (%)</b>          | 9 (32)                | 63 (35)                  |                 |
|              | <b>MT + TT (%)</b>     | 19 (68)               | 116 (65)                 | 0.833           |
| <b>Apo E</b> | <b>E3/3 (%)</b>        | 17 (61)               | 145 (81)                 |                 |
|              | <b>E3/4 + E4/4 (%)</b> | 11 (39)               | 34 (19)                  | 0.025           |

\* Test de la Chi-cuadrado.

ECA= enzima de conversión de la angiotensina

AT1R= receptor de la angiotensina II de tipo 1

AGT= angiotensinógeno

Apo E= apolipoproteína E

**Tabla 31. Parámetros clínicos de los pacientes con nefropatía crónica del injerto (NCI) frente a enfermos sin datos clínicos de NCI (ausencia de proteinuria y creatinina sérica menor o igual a 2.5 mg/dl) con un tiempo de seguimiento mayor o igual a 3 años.**

|   | <b>NCI<br/>n = 28</b> | <b>Sin NCI<br/>n = 100</b> | <b>Valor P</b> |
|---|-----------------------|----------------------------|----------------|
| <b>Edad receptor (años)</b>                       | 48.6±12.4             | 49.6±13.6                  | 0.723          |
| <b>Sexo (% varones)</b>                           | 23 (82)               | 68 (68)                    | 0.165          |
| <b>Diabetes mellitus preTx (%)</b>                | 4 (14.3)              | 13 (13)                    | 0.859          |
| <b>Edad donante (años)</b>                        | 43±20                 | 29.8±13.6                  | 0.000          |
| <b>Creatinina donante (mg/dl)</b>                 | 1.5±0.6               | 1±0.6                      | 0.020          |
| <b>Incompatibilidades BDR</b>                     | 1.6±0.9               | 1.7±1                      | 0.791          |
| <b>Nº rechazos agudos 1er. año</b>                | 1.3±1                 | 0.6±0.8                    | 0.000          |
| <b>Dislipemia postrasplante (%)</b>               | 18 (64)               | 73 (73)                    | 0.479          |
| <b>Colesterol total (mg/dl)</b>                   | 218±48                | 216±38.8                   | 0.830          |
| <b>HDL colesterol (mg/dl)</b>                     | 50.9±11.6             | 55.3±15.4                  | 0.173          |
| <b>Triglicéridos (mg/dl)</b>                      | 185±76                | 173±67.6                   | 0.419          |
| <b>Necrosis tubular aguda (%)</b>                 | 10 (38)               | 26 (26)                    | 0.229          |
| <b>Creatinina sérica actual (mg/dl)</b>           | 3.6±1.7               | 1.4±0.5                    | 0.000          |
| <b>Creatinina sérica al alta (mg/dl)</b>          | 1.9±0.7               | 1.7±0.8                    | 0.162          |
| <b>Infección por CMV (%)</b>                      | 12 (43)               | 46 (46)                    | 0.768          |
| <b>Fumador (%)</b>                                | 4 (14.3)              | 17 (17)                    | 0.732          |
| <b>HTA postrasplante (%)</b>                      | 27 (96)               | 84 (84)                    | 0.118          |
| <b>Niveles de CsA (ng/ml)</b>                     | 193.6±78              | 207±46                     | 0.247          |
| <b>Índice de masa corporal (Kg/m<sup>2</sup>)</b> | 27.2±4.6              | 27.5±5.4                   | 0.762          |
| <b>Tiempo de evolución posTx (años)</b>           | 6.9±3.7               | 6.5±2.4                    | 0.493          |
| <b>Tratamiento con IECAs (%)</b>                  | 7 (25)                | 30 (30)                    | 0.606          |
| <b>Hormona paratiroidea (pg/ml)</b>               | 168±141               | 106±87.5                   | 0.005          |
| <b>Apolipoproteína B (mg/dl)</b>                  | 103.7±27              | 139±162                    | 0.259          |
| <b>Apolipoproteína A (mg/dl)</b>                  | 144±27                | 155±34.5                   | 0.125          |

X±DE: media±desviación típica. PreTx o posTx: pretrasplante o postrasplante. CMV: citomegalovirus; HTA: hipertensión arterial; CsA: ciclosporina A; IECA: inhibidor de la enzima de conversión de angiotensina.

**Tabla 32. Distribución de las frecuencias de los genotipos de los polimorfismos del sistema renina-angiotensina y de la apolipoproteína E (apo E) en pacientes con nefropatía crónica del injerto (NCI) frente a enfermos sin datos clínicos de NCI (ausencia de proteinuria y creatinina sérica menor o igual a 2.5 mg/dl) con un tiempo de seguimiento mayor o igual a 3 años.**

|              |                        | <b>NCI<br/>n = 28</b> | <b>Sin NCI<br/>n = 100</b> | <b>Valor P*</b> |
|--------------|------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------|
| <b>ECA</b>   | <b>DD (%)</b>          | 11 (39.3)             | 40 (40)                    | 1.000           |
|              | <b>ID + II (%)</b>     | 17 (60)               | 60 (60)                    |                 |
| <b>AT1R</b>  | <b>AA (%)</b>          | 19 (68)               | 53 (53)                    | 0.198           |
|              | <b>AC + CC (%)</b>     | 9 (32)                | 47 (47)                    |                 |
| <b>AGT</b>   | <b>MM (%)</b>          | 9 (36)                | 36 (36)                    | 0.824           |
|              | <b>MT + TT (%)</b>     | 19 (68)               | 64 (64)                    |                 |
| <b>Apo E</b> | <b>E3/3 (%)</b>        | 17 (60)               | 83 (83)                    | 0.019           |
|              | <b>E3/4 + E4/4 (%)</b> | 11 (39)               | 17 (17)                    |                 |

\* Test de la Chi-cuadrado.

ECA= enzima de conversión de la angiotensina

AT1R= receptor de la angiotensina II de tipo 1

AGT= angiotensinógeno

Apo E= apolipoproteína E

---

## ***DISCUSIÓN***



El trasplante renal constituye, sin duda, el tratamiento de elección de la insuficiencia renal crónica terminal. Un espectacular avance en la medicación inmunosupresora ha permitido descender de forma notoria la incidencia de rechazos agudos, sin un incremento paralelo de las infecciones oportunistas. El resultado ha sido una mejora sustancial en las tasas de supervivencia del injerto a corto y medio plazo. Sin embargo, a más largo plazo no se han observado resultados similares, y la muerte del paciente, principalmente de origen cardiovascular, compite con la disfunción inmunológica como la primera causa de fallo del injerto en el postrasplante tardío (231).

En efecto, aunque las complicaciones cardiovasculares han disminuido en los últimos años, éstas representan aún el 46% de la morbi-mortalidad global en esta población (232). Concretamente, la enfermedad cardíaca coronaria es seis veces más frecuente que la esperada para la población general no diabética (233), y esto se acentúa en la población más joven (234). Todo ello justifica, obviamente, el creciente interés en los últimos años por estos trastornos en la comunidad nefrológica internacional.

Esta alarmante situación obedece a la interacción entre los factores de riesgo postrasplante (clásicos e inherentes al trasplante) y probablemente factores genéticos, como lo observado en nuestro estudio. Así mismo, muchos de estos factores están ya presentes antes del implante (235), lo que incrementa, obviamente, la morbi-mortalidad cardiovascular.

Existen algunas limitaciones importantes en este estudio. En primer lugar, es difícil determinar a partir de estudios observacionales si la relación entre factores de riesgo (clásicos y genéticos) y la enfermedad vascular postrasplante es directa, o está mediada por factores del propio trasplante como la medicación inmunosupresora o los rechazos agudos, entre otros. En segundo lugar, los estudios de asociación reflejan sólo

una tendencia en la génesis de estos trastornos CV y no profundizan en los mecanismos que intervienen en los mismos. Finalmente, el número de pacientes estudiados y eventos CV de este análisis puede haber sido demasiado pequeño para poder precisar una fidedigna asociación entre los factores estudiados y la ECV postrasplante.

A pesar de estas limitaciones, los resultados de este estudio confirman que la ECV es la principal causa de morbi-mortalidad tras el trasplante renal. Para estudiar mejor el efecto del trasplante sobre la aparición de estas complicaciones, sólo analizamos aquellos pacientes con más de un año de seguimiento con injerto funcionante.

En nuestro estudio, el 37% de los enfermos presentaron algún ECV durante el seguimiento, de los cuales un 10% sufrieron un IAM, el 3.4% un ACV y el 23% **(236)** desarrollaron una franca enfermedad vascular periférica como primera manifestación de las alteraciones CV postrasplante. Esta alta tasa de ECV es aún más relevante si consideramos que más de la mitad de los enfermos recibía antiagregantes plaquetarios o inhibidores de la ECA.

Hallazgos similares han sido observados previamente por otros autores en estudios observacionales de pacientes con injerto renal. Concretamente, Kasiske y cols. **(235)** observaron que un 30% de los pacientes trasplantados padecían algún ECV durante la evolución, de los cuales el 12% correspondía a un IAM, el 7.6% presentaron un ACV y el 10% una EVP. Otros estudios posteriores corroboraron tales hallazgos **(237)**. Con todo, la mayor frecuencia de EVP encontrada en nuestros pacientes pudiera obedecer al elevado número de diabéticos (29%) y/o enfermos con signos de ateromatosis pretrasplante.

En estos estudios observacionales, una ingente cantidad de factores de riesgo

vascular fue el denominador común de los mismos. En pocas entidades clínicas se suman tantos factores de riesgo como en el trasplante renal.

Nosotros encontramos también una alta prevalencia de factores de riesgo pre y postrasplante que pudieran justificar la elevada tasa de complicaciones cardiovasculares durante el seguimiento. Como ocurre en la población general **(238, 239)**, la edad y el sexo masculino fueron factores de riesgo de ECV en nuestros enfermos. Por el contrario, otros factores conocidos como el hábito de fumar o la obesidad no se asociaron al desarrollo de estas complicaciones postrasplante, pero es posible que el tamaño de la muestra haya sido demasiado pequeña, o que el impacto de otros factores de riesgo vascular fuera superior, en presencia del tratamiento supresor.

En este sentido, la diabetes mellitus pretrasplante, los trastornos dislipémicos, la HTA, así como la presencia de datos clínicos de ateromatosis antes del implante, representaron, globalmente, factores decisivos en la aparición de estas complicaciones en nuestros pacientes. De manera similar, un estudio reciente de la Universidad de Minnesota, no sólo observó un elevado número de estos factores de riesgo, sino que el riesgo de cardiopatía isquémica asociado a diabetes, HTA o dislipemia fue significativamente mayor en los pacientes trasplantados con respecto a la población general **(26)**.

La HTA es muy prevalente tras el trasplante renal (60-70%), a pesar de la normalización de la función renal y de la corrección de la volemia. Además, puede condicionar el pronóstico de estos enfermos **(240)**. En su patogenia se han implicado numerosos factores, si bien los fármacos anticalcineurínicos y los esteroides juegan un importante papel en su desarrollo. Todos nuestros pacientes recibieron estos fármacos tras el trasplante y una elevada tasa de nuestros enfermos sufrió esta complicación

durante el seguimiento. Sin embargo, el impacto de la HTA sobre la ECV postrasplante fue sólo marginal (**tablas 11 y 12**).

Estudios observacionales previos, tampoco encuentran una clara asociación entre ECV y HTA tras el implante, y esta complicación no fue un factor de riesgo independiente de cardiopatía coronaria (**26, 241**). El tratamiento intenso de esta entidad durante la evolución pudiera haber obscurecido el verdadero impacto de esta complicación, por lo que una asociación entre HTA y la ECV es difícil de precisar en estudios retrospectivos como el nuestro.

La hiperlipemia es una frecuente (60%) y persistente complicación tras el trasplante renal (**242**). Su patogenia es multifactorial y se ha asociado al desarrollo de ECV postrasplante (**26, 237**). Esta complicación tan prevalente en nuestros enfermos fue también un factor de riesgo independiente de ECV. Es posible, que el elevado número de diabéticos justificara tal hallazgo. El hecho de que los trastornos dislipémicos no se asociaran al desarrollo de ECV en pacientes sin diabetes pretrasplante, apoya este argumento. Al mismo tiempo, no sabemos si la acción del tratamiento hipolipemiente en enfermos pudiera tener un efecto confundente en este análisis. Futuros estudios prospectivos aclararán estos aspectos en esta población.

La diabetes mellitus es un conocido factor de riesgo vascular en la población general (**238**) y en pacientes con trasplante renal (**243**). Además, un 20% de los pacientes desarrollan esta complicación tras el implante (**244**). Datos del Registro Americano refieren que 2/3 de los pacientes con IAM postrasplante son diabéticos e hipertensos (**245**). Así mismo, en un estudio reciente, el riesgo de cardiopatía isquémica asociado a diabetes pretrasplante (tipos 1 y 2) fue más alto en estos pacientes con respecto a la población general (**26**).

En nuestro estudio, un 40% de los pacientes con ECV sufría esta entidad y ésta fue un factor de riesgo muy importante en el desarrollo de eventos CV. Al mismo tiempo, muchos de estos pacientes presentaban datos clínicos de ateromatosis que pudiera haber acelerado el desarrollo de estas complicaciones. Queda por aclarar si la hiperglucemia participa directamente en la patogénesis de la enfermedad vascular o simplemente forma parte de la constelación de alteraciones metabólicas que integran el síndrome X (especialmente en la diabetes tipo 2), como ha sido sugerido previamente (246). A favor de esta hipótesis está el hecho de que, la HTA y la dislipemia no fueron factores independientes de riesgo (análisis de regresión logística) para el desarrollo de ECV, cuando los pacientes sin diabetes mellitus pretrasplante fueron excluidos del análisis (tabla 20).

Por otra parte, el impacto de estos factores de riesgo vascular (principalmente edad, diabetes y dislipemia) fue independiente del tiempo de evolución postrasplante. Así, aquellos pacientes con un tiempo de seguimiento menor y mayor de 5 años mostraron en el análisis multivariado que la diabetes y la dislipemia (principalmente la hipertrigliceridemia) fueron predictores independientes del desarrollo de complicaciones cardiovasculares postrasplante.

Otros factores de riesgo que pudieran asociarse al desarrollo de enfermedad cardiovascular postrasplante son la hiperhomocisteinemia o los niveles elevados de lipoproteína (a), como ha sido sugerido en un estudio reciente (233). Sin embargo, estos aspectos no fueron analizados en nuestro estudio, pero es probable que estas alteraciones se sumen a la constelación de factores tradicionales de riesgo vascular que inciden en la elevada tasa de ECV postrasplante.

A pesar de esta mayor vulnerabilidad cardiovascular del paciente con trasplante

renal, no se sabe con exactitud si la modificación de estos factores de riesgo puede paliar tal situación. Por el momento, y como ocurre en la población general **(238)**, parece prudente un adecuado control de los factores de riesgo y la identificación precoz de los mismos en aras de reducir estas complicaciones. En este sentido, la reducción de la hemoglobina glicosilada (HbA1c), el empleo de estatinas desde el implante o el tratamiento energético de la hipertensión postrasplante pudieran ser algunos de los objetivos futuros para disminuir esta morbi-mortalidad.

De estos hechos se infiere que, pudieran coexistir en estos pacientes otros factores adicionales que justificasen la alta tasa de ECV postrasplante. Es probable que factores inherentes al propio trasplante renal, como los fármacos inmunosupresores, contribuyan al desarrollo de este peor perfil metabólico y vascular. La ciclosporina constituyó la base del tratamiento inmunosupresor de nuestros enfermos, y es conocido que los fármacos anticalcineurínicos pueden jugar un importante papel lesivo vascular. La ciclosporina estimula el SRA, a la vez que altera la liberación de NO y la síntesis de prostaglandinas **(28)**. El resultado final es una disfunción endotelial y aumento de las resistencias periféricas. Asimismo, los corticoides participan en el desarrollo de la HTA, dislipemia e intolerancia hidrocarbonada, así como en una mayor producción de ECA en las células del músculo liso vascular **(247)**. En síntesis, estos fármacos, entre otros, pudieran magnificar los efectos deletéreos de algunos factores tradicionales de riesgo vascular. Por tanto, la individualización de la inmunosupresión pudiera ser una de las estrategias futuras para disminuir el riesgo vascular.

Por otra parte, es posible que una interacción entre factores genéticos y los factores clásicos de riesgo pueda jugar un importante papel en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular postrasplante.

El SRA participa en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares y los polimorfismos genéticos de sus componentes se han asociado al desarrollo de la ECV en la población general. Concretamente, el polimorfismo (I/D) del gen de la ECA se ha relacionado con complicaciones cardiovasculares (87-91, 111, 112), incluida la hipertrofia ventricular (84, 96). Los individuos con genotipo DD presentan mayores niveles de ECA y angiotensina II, y esta sustancia juega un papel decisivo en la patogénesis de la aterosclerosis (92). La población trasplantada no podía ser una excepción. El genotipo DD fue más prevalente en nuestros pacientes con ECV y éste fue un factor independiente de riesgo en el análisis multivariado para el desarrollo de estas complicaciones. En un estudio previo de nuestro grupo, el genotipo DD también se asoció a un mayor incremento de la masa ventricular, tras 12 meses de trasplante, independientemente de las cifras de tensión arterial (84).

Hasta donde nosotros sabemos, este es el primer estudio en pacientes con injerto renal donde se demuestra tal asociación. Así mismo, no se encontraron diferencias en los parámetros clínicos entre los diferentes genotipos (DD vs. ID vs. II) de este polimorfismo que pudieran justificar estos hallazgos.

En el análisis multivariado de Cox se observó una interacción entre la diabetes mellitus pretrasplante y el genotipo DD (tabla 12). Concretamente, en los pacientes con diabetes mellitus pretrasplante, la prevalencia del genotipo DD fue similar en los enfermos con y sin ECV postrasplante (52% vs. 50%). Sin embargo, y como era previsible, en los enfermos sin diabetes pretrasplante se observó una sobre-expresión de este genotipo en los pacientes que desarrollaron ECV (56% vs. 36%). De manera similar, la presencia del alelo C del polimorfismo del gen AT1R fue significativamente mayor en aquellos enfermos sin diabetes pretrasplante que sufrieron ECV (58% vs.

40%). Más aún, el análisis de los pacientes con menos tiempo en riesgo (< 5 años de seguimiento), mostró que el genotipo DD fue también un factor independiente de riesgo vascular. En esta línea, se ha observado en la población general que, el genotipo DD confería más riesgo para el desarrollo de cardiopatía isquémica en aquellos individuos sin otros claros factores de riesgo como la obesidad o la dislipemia (87). Por tanto, un mayor impacto de los factores genéticos sobre la aparición de ECV postrasplante pudiera ser esperado en enfermos sin estos factores de riesgo durante el seguimiento.

A pesar de estas evidencias, algunos estudios no encuentran una clara asociación entre este polimorfismo y la enfermedad cardiovascular en población no trasplantada (248, 249).

Es posible que en el paciente con un injerto renal concurren una serie de circunstancias clínicas que potencien el efecto de un simple factor genético de riesgo. En primer lugar, la ciclosporina estimula el SRA y este sistema activado puede enmascarar los efectos de estos polimorfismos después del trasplante renal. En otras palabras, el genotipo DD tendría un papel permisivo en el desarrollo de las complicaciones cuando los mecanismos de progresión de la ateromatosis están activados. En segundo lugar, tras el trasplante confluyen una ingente suma de factores de riesgo. Por tanto, cabría esperar un mayor efecto negativo de este genotipo sobre las estructuras vasculares. A favor de estos argumentos, está el hecho de que la proporción de fármacos potencialmente protectores de la enfermedad vascular (antiagregantes e IECAs) fue similar en los pacientes con y sin ECV durante el seguimiento. Además, el genotipo DD se asoció al desarrollo de ECV después de excluir a los pacientes que recibían IECAs (OR=2.7; IC 95%: 0.99-7.35; P=0.051). Finalmente, puede haberse dado una acción sinérgica entre los factores ambientales y otros polimorfismos del



SRA, como el gen del receptor AT1 de la angiotensina II.

En efecto, ha sido observado un sinergismo entre los polimorfismos del gen de la ECA y del ATR, previamente, en población europea para el desarrollo de cardiopatía isquémica **(138)**. Similares hallazgos han sido publicados posteriormente **(250)**. Por un mecanismo no muy bien aclarado, los individuos con algún alelo C del polimorfismo del gen del receptor AT1, presentan mayor riesgo de padecer enfermedad cardiovascular. En nuestro estudio, los pacientes con el alelo C mostraron en el análisis univariado un mayor número de complicaciones cardiovasculares y se observó, además, una interacción con el genotipo DD para el desarrollo de ECV. Asimismo, la presencia conjunta del alelo C y el genotipo DD constituyó un factor de riesgo independiente en el análisis multivariado de los enfermos sin diabetes pretrasplante. Aunque meramente especulativo, el alelo C modularía la respuesta del receptor a la acción de la angiotensina II. En otras palabras, este polimorfismo pudiera estar en desequilibrio de ligamiento con una variante funcional que alteraría el down-regulation del gen del receptor AT1 en respuesta a la angiotensina II, la cual presenta concentraciones elevadas en individuos con genotipo DD **(138)**. Alternativamente, una actividad incrementada del receptor AT1 puede estar asociada a una sobre-expresión del gen de la ECA, como ha sido observado en el animal de experimentación **(251)**. Dado que el receptor AT1 de la angiotensina II y la ECA están presentes en las paredes vasculares y en el miocardio, es atractivo especular que la interacción de los genotipos o alelos “desfavorables” de ambos polimorfismos pudiera conferir un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular postrasplante. No obstante, en estos pacientes se requieren estudios a más largo plazo y con mayor número de enfermos para dilucidar estos aspectos.

El polimorfismo M235T del gen del angiotensinógeno se basa en la sustitución del aminoácido metionina por treonina en la posición 235 de la proteína. Unos mayores niveles de angiotensinógeno en los pacientes con algún alelo T (MT ó TT) pudieran ser los responsables de una asociación con la enfermedad cardiovascular (principalmente HTA y la preeclampsia), como fue documentado en un principio **(155, 252)**. En nuestro estudio, sin embargo, no observamos una asociación significativa entre este polimorfismo y las complicaciones cardiovasculares durante el seguimiento, hecho este que también se objetivó en aquellos enfermos sin otros factores de riesgo como la diabetes mellitus pretrasplante. Asimismo, tampoco encontramos un sinergismo con otros polimorfismos del SRA, a la hora de un mayor riesgo cardiovascular. De manera similar, en otros estudios de diseño similar tampoco se ha observado esta asociación **(253, 254)**, especialmente cuando se incrementa el número de mujeres **(255)**.

Por el contrario, en un estudio reciente de nuestra comunidad autónoma se ha observado una asociación positiva entre el genotipo TT del polimorfismo del gen del angiotensinógeno y el riesgo de cardiopatía isquémica, riesgo que aumentó en aquellos individuos que, presentaban además, algún alelo D del polimorfismo del gen de la ECA **(256)**. Esto último también fue evidenciado, previamente, en pacientes de bajo riesgo para el desarrollo de enfermedad isquémica cardíaca **(88)**. Una especulativa interpretación de estas discrepancias lo constituye un posible sesgo con este polimorfismo. Nosotros llevamos a cabo un análisis transversal y es probable que, aquellos pacientes con el alelo T presentasen una muerte prematura de origen cardiovascular. Otra explicación alternativa es que este polimorfismo pudiera estar en desequilibrio de ligamiento con un gen cercano que controlara, con mayor precisión, los mecanismos del SRA, siendo necesario el concurso de ambos junto a factores

ambientales para el desarrollo de ECV. En cualquier caso, un estudio prospectivo en esta población portadora de un injerto renal aclararía dicha situación.

El bloqueo farmacológico de este SRA pudiera constituir una medida atractiva para paliar esta situación. De hecho, el uso de IECAs disminuye el riesgo de eventos cardiovasculares en población no trasplantada **(257)**. En nuestro estudio, la administración de IECAs no proporcionó, por el contrario, una reducción del riesgo de ECV postrasplante. No obstante, este fue un análisis retrospectivo y es posible que la prescripción de estos fármacos se haya realizado en aquellos enfermos con más factores de riesgo. En cualquier caso, en población trasplantada existen pocos estudios prospectivos que confirmen el efecto beneficioso de este bloqueo del SRA. Un estudio reciente de nuestro grupo, mostró que el lisinopril reducía significativamente la masa ventricular frente a placebo tras un año de tratamiento, pero se trataba de pacientes sin diabetes mellitus y sin clara ECV postrasplante que enmascarase los resultados **(75)**.

El polimorfismo de la apolipoproteína E se basa en la combinación de tres alelos ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$ ), que codifican las tres isoformas de la apo E (E2, E3 y E4). Esto confiere que en la población general existan 6 posibles genotipos (E2/2, E2/3, E2/4, E3/3, E3/4 y E4/4), si bien la isoformas con los alelos  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$  son los más comunes ( $\epsilon 2$ : 8%,  $\epsilon 3$ : 78% y  $\epsilon 4$ : 14%) y las que se han asociado con dislipemias más graves (hipercolesterolemias), así como al desarrollo de ateromatosis en la población **(258)**. Dada la escasa frecuencia en nuestro medio del alelo  $\epsilon 2$  y de su poca contribución a los trastornos lipídicos y enfermedad cardiovascular **(196)**, sólo determinamos en nuestros pacientes los genotipos E3/3, E3/4 y E4/4.

En pacientes con enfermedades renales, se ha observado también que la isoforma E4 se asocia a un peor perfil lipídico **(259)**, lo que justificaría un elevado

riesgo cardiovascular en esta población. A pesar de ello, en nuestro estudio no se observó una mayor frecuencia del alelo  $\epsilon 4$  en los pacientes que sufrieron ECV y éste no constituyó un factor independiente de riesgo vascular. Asimismo, el perfil lipídico fue similar en ambos grupos de enfermos y los datos clínicos de los diferentes genotipos de este polimorfismo fueron similares. Es conocida la más baja prevalencia del alelo  $\epsilon 4$  en la población del sur de Europa **(260)**, incluida nuestra comunidad **(196)**, y esto puede ser una de las razones de estas diferencias. Adicionalmente, el efecto negativo de los inmunosupresores sobre el perfil lipídico puede ser más relevante que la acción aislada de un solo polimorfismo sobre el metabolismo de las lipoproteínas. Por último, una proporción importante de pacientes recibía hipolipemiantes en ambos grupos y esto pudo haber creado un sesgo en los resultados.

Por otra parte, en pacientes con injerto renal se ha encontrado una mayor prevalencia del genotipo E3/4, lo que sugiere que este genotipo pudiera estar asociado a una mayor progresión de la enfermedad renal **(204)**. La nefropatía crónica del injerto (NCI) remeda el proceso de la ateromatosis y las alteraciones lipídicas participan en la patogénesis de la misma **(261)**. Con estos argumentos, resulta atractivo pensar en una asociación entre este polimorfismo y la aparición de NCI. Hasta ahora, pocos estudios en población trasplantada habían investigado el efecto de este polimorfismo sobre esta complicación. En esta línea, los enfermos de nuestro estudio con el alelo  $\epsilon 4$  (genotipos E3/4 y E4/4) desarrollaron con mayor frecuencia NCI que aquellos con genotipo E3/3 (61 vs. 39%, respectivamente;  $P=0.015$ ). Para esclarecer mejor esta asociación, los pacientes con lesiones histológicas de NCI fueron comparados con aquellos que, aún sin estudio biopsico, potencialmente no presentaban una NCI (ausencia de proteinuria y creatinina sérica  $< 2.5$  mg/dl).

Como era de esperar, la edad del donante o el número de rechazos fueron factores independientes de riesgo de NCI. Además, los enfermos con NCI mostraron, sorprendentemente, una sobre-expresión del alelo  $\epsilon 4$  y éste confería 3.4 veces más riesgo de sufrir esta complicación. El efecto negativo del alelo  $\epsilon 4$  sobre el metabolismo de las lipoproteínas, junto a la reducción de la actividad del receptor LDL condicionada por la ciclosporina (262), podrían explicar estos hallazgos en nuestros enfermos. De cualquier manera y de confirmarse estos resultados, la identificación precoz de este polimorfismo ayudará a diseñar futuras estrategias terapéuticas encaminadas a disminuir esta complicación.

En resumen, la ECV es muy prevalente tras el trasplante renal y esto se debe a la interacción entre un importante número de factores clásicos de riesgo y factores genéticos. El genotipo desfavorable del polimorfismo del gen de la ECA y la presencia del alelo C del gen del receptor de angiotensina II de tipo 1 (AT1R), juegan un papel importante en el desarrollo de estas complicaciones tras el implante, y esto parece ser más acuciante en enfermos con menor riesgo vascular (ausencia de diabetes pretrasplante y menor tiempo de evolución). Por último, y con las reservas de un estudio retrospectivo, el polimorfismo de la apo E se asocia de forma independiente al desarrollo de nefropatía crónica del injerto en pacientes que reciben ciclosporina.

---

## ***CONCLUSIONES***

1. La enfermedad cardiovascular es muy prevalente tras el trasplante renal y una ingente suma de factores tradicionales de riesgo puede ser la responsable de la misma. El control de algunos factores de riesgo, como la hiperglucemia, la HTA y la dislipemia pudieran contribuir a disminuir esta alarmante situación.
2. Como ocurre en la población general, y con las reservas de un estudio de asociación, los factores genéticos participan en el desarrollo de la ECV postrasplante. El genotipo DD confiere un mayor riesgo vascular en estos enfermos que reciben inmunosupresores (ciclosporina y esteroides), el cual se hace más patente en enfermos de mayor riesgo. En estos pacientes, el bloqueo farmacológico precoz del SRA, así como la individualización del tratamiento inmunosupresor pudieran ser beneficiosos a más largo plazo.
3. En pacientes de menor riesgo vascular (ausencia de diabetes pretrasplante y menos tiempo de evolución), el genotipo DD también contribuye a un mayor riesgo de ECV postrasplante. Sin descuidar el control de otros factores de riesgo, en estos pacientes parece prudente también la administración de IECAs o ARAs para mitigar la ECV.
4. Aunque actualmente se desconocen los mecanismos patogénicos, la presencia del alelo C del polimorfismo del gen AT1R de la angiotensina II se asoció a un mayor riesgo de ECV, y esto se acentuó en pacientes que, además, presentaban el genotipo DD. A falta de futuros estudios

**prospectivos que lo confirmen, se infiere una mayor protección vascular de estos enfermos con fármacos que bloqueen los diferentes pasos enzimáticos del SRA.**

- 5. La presencia del alelo e4 pudiera ser importante en el desarrollo de la nefropatía crónica del injerto. De confirmarse en otros estudios el efecto negativo de este alelo desfavorable épsilon-4, deberían investigarse medidas preventivas para evitar la aparición de esta complicación en los portadores del alelo e4.**



---

## ***BIBLIOGRAFÍA***

1. First MR. Long-term complications after transplantation. *Am J Kidney Dis* 22:477-486, 1993.
2. Kasiske BL. Risk factors for accelerated atherosclerosis in renal transplant recipients. *Am J Med* 84:985-992, 1988.
3. Kasiske BL. Risk factors for cardiovascular disease after renal transplantation. *Miner Electrolyte Metab* 19:186-195, 1993.
4. London GM, Marchais SJ, Guerin AP, Metivier F, Pannier B. Cardiac hypertrophy and arterial alterations in end-stage renal disease: Hemodynamic factors. *Kidney Int* 43 (suppl 41): S42-S49, 1993.
5. Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, Kent GM, Martin CJ, Murray DC, Barre PE. Clinical and echocardiographic disease in patients starting end-stage renal disease therapy: Prevalence, associations and prognosis. *Kidney Int* 47: 186-192, 1995.
6. Silberberg JS, Barre PE, Prichard SS, Sniderman AD. Impact of left ventricular hypertrophy on survival in end-stage renal disease. *Kidney Int* 36: 286-290, 1989.
7. Lai KN, Barnden L, Mathew TH. Effect of renal transplantation on left ventricular function in hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 18: 74-78, 1982.
8. Hüting J. Course of left ventricular hypertrophy and function in end-stage renal disease after renal transplantation. *Am J Cardiol* 70: 1481-1484, 1992.
9. Covic A, Goldsmith DJ, Georgescu G, Venning MC, Ackrill P. Echocardiographic findings in long-term, long-hour hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 45: 104-110, 1996.
10. Meggs LG. The cardiocyte as a target for parathyroid hormone in end-stage renal disease. *J Assoc Acad Minor Phys* 5: 59-61, 1994.

11. Amann K, Tornig J, Flechtenmacher C, Nabokov A, Mall G, Ritz E. Blood-pressure-independent wall thickening of intramyocardial arterioles in experimental uraemia: evidence for a permissive action of PTH. *Nephrol Dial Transplant* 10: 2043-2048, 1995.
12. Lorenzo Sellarés V, Torres Ramírez A, Hernández Marrero D, Ayu JC. *Manual de Nefrología Clínica, Diálisis y Trasplante Renal*. Madrid. Ed. Harcourt Brace, 1998.
13. Luke RG. Hypertension in renal transplant recipients. *Kidney Int* 31:1024-1037, 1987.
14. First MR, Neylan JF, Rocher LL, Tejani A. Hypertension after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 4:S30-S36, 1994.
15. Ventura HO, Lavie CJ, Messerli FH, Valentino V, Smart FW, Stapleton DD, Ochsner JL. Cardiovascular adaptation to cyclosporine-induced hypertension. *J Hum Hypertens* 8: 233-7, 1994.
16. Diederich D, Yang Z, Luscher TF. Chronic cyclosporine therapy impairs endothelium-dependent relaxation in the renal artery of the rat. *J Am Soc Nephrol* 2: 1291-7, 1992.
17. Abassi ZA, Pieruzzi F, Nakhoul F, Keiser HR. Effects of cyclosporin A on the synthesis, excretion, and metabolism of the endothelin in the rat. *Hypertension* 27: 1140-8, 1996.
18. Fishel RS, Eisenberg S, Shai S-Y, Redden RA, Bernstein KE, Berk BC. Glucocorticoids induce angiotensin-converting enzyme expression in vascular smooth muscle. *Hypertension* 25: 343-349, 1995.
19. Dzau VJ. Sistemas de angiotensina tisular en enfermedad cardiovascular. *Heart Disease- Update*. Edited by Eugene Braunwald, 1-9, 1995.

20. Arnadóttir M, and Berg AL. Treatment of hyperlipidemia in renal transplant recipients. *Transplantation* 63, 339-345, 1997.
21. Molkenin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, and Olson EN. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93, 215-228, 1998.
22. Gaston RS, Julian BA, Curtis JJ. Posttransplant erythrocytosis: An enigma revisited. *Am J Kidney Dis* 24: 1-11, 1994.
23. Kendall TJ, Wilson JE, Radio SJ, Kandolf R, Gulizia JM, Winters GL, Costanzo-Nordin MR, Malcom GT, Thieszen SL, Miller LW, et al. Cytomegalovirus and other herpesviruses: do they have a role in the development of accelerated coronary arterial disease in human heart allografts? *J Heart Lung Transplant* 11: S14-20, 1992.
24. Dimény E and Fellström B. Metabolic abnormalities in renal transplant recipients. Risk factors and predictors of chronic graft dysfunction? *Nephrol Dial Transplant* 12: (Editorial Comments) 21-24, 1997.
25. Fernandez-Miranda C, Gomez P, Diaz-Rubio P, Estenoz J, Carillo JL, Andres A, Morales JM. Plasma homocysteine levels in renal transplanted patients on cyclosporine or tacrolimus therapy: effect of treatment with folic acid. *Clin Transplant* 14: 110-114, 2000.
26. Kasiske BL, Chakkerla HA, Koel J. Explained and unexplained ischemic heart disease risk after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 11: 1739-43, 2000.
27. Martinez-Castelao A, Hueso M, Sanz V, Rejas J, Alsina J, Grinyo JM. Treatment of hypertension after renal transplantation: long-term efficacy of verapamil, enalapril, and doxazosin. *Kidney Int* 68 (Suppl): S130-4, 1998.

28. Lee DBN. Cyclosporine and the renin-angiotensin axis. *Kidney Int* 52: 248-260, 1997.
29. Warholm C, Wilczek H, Pettersson E. Hypertension two years after renal transplantation: causes and consequences. *Transpl Int* 8: 286-92, 1995.
30. Kasiske BL. Clinical correlates to chronic renal allograft rejection. *Kidney Int* 63 (Suppl): S71-4, 1997.
31. McHugh MI, Tanboga H, Marcen R, Liano F, Robson V, Wilkinson R. Hypertension following renal transplantation: the role of the host's kidney. *Q J Med* 49: 395-403, 1980.
32. Rostaing L, Moreau-Gaudry X, Baron E, Cisterne JM, Monrozies-Bernadet P, Durand D. Changes in blood pressure and renal function following subtotal parathyroidectomy in renal transplant patients presenting with persistent hypercalcemic hyperparathyroidism. *Clin Nephrol* 47: 248-55, 1997.
33. Kasiske BL, Kliuger D. Cigarette smoking in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 11, 753-59, 2000.
34. Aker S, Ivens K, Guo Z, Grabensee B, and Heering P. Cardiovascular complications after renal transplantation. *Transplant Proc* 30: 2039-2042, 1998.
35. Samani NJ. Molecular genetics of susceptibility to development of hypertension. *Brit Med Bull* 50: 260-271, 1994.
36. Puras A, Cooper RS. Marcadores genéticos de la hipertensión arterial: un largo camino ya iniciado. *Med Clin (Barc.)* 104: 780-783, 1995.
37. Textor SC, Canzanello VJ, Taler SJ, Wilson DJ, Schwartz LL, Augustine JE, Raymer JM, Romero JC, Wiesner RH, Krom RA, et al. Cyclosporine-induced hypertension after transplantation. *Mayo Clin Proc* 69: 1182-1193, 1994.

38. Ventura HO, Malik FS, Mehra MR, Stapleton DD, Smart FW. Mechanisms of hypertension in cardiac transplantation and the role of cyclosporine. *Curr Opin Cardiol* 12: 375-81, 1997.
39. Broadhurst P, Kelleher C, Hughes L, Imeson JD, Raftery EB. Fibrinogen, factor VII, clotting activity and coronary artery disease severity. *Atherosclerosis* 85: 169-173, 1990.
40. Yarnel JWG, Baker IA, Sweetnam PM, Bainton D, O'Brian JR, Whitehead PJ, Elwood PC. Fibrinogen, viscosity, and white blood cell count are major risk factors for ischemic heart diseases: the Caerphilly and Speedwall Collaborative Heart Disease Studies. *Circulation* 83: 836-844, 1991.
41. Carter AM, Ossei-Gerning N, Wilson IJ, Grant PJ. Association of the platelet P1<sup>A</sup> polymorphism of glycoprotein IIb/IIIa and the Fibrinogen B $\beta$  448 polymorphism with myocardial infarction and extent of coronary artery disease. *Circulation* 96: 1424-1431, 1997.
42. Leff Todd and Gruber PJ. Cardiovascular Diseases. In *Molecular Biology and Biotechnology*. Edited by Robert Meyers. pp.149-153. VCH Publishers, New York, 1995.
43. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 56:111-128, 1969.
44. Puras A. Factores hereditarios y genéticos en el riesgo cardiovascular. *Hipertensión* 13: 266-274, 1996.
45. Johnston CI. Tissue angiotensin converting enzyme in cardiac and vascular hypertrophy, repair, and remodeling. *Hypertension* 23: 258-68, 1994.

46. Hernández D, Torres A y Salido E. Polimorfismo del gen de la enzima de conversión de la angiotensina y riesgo cardiovascular. *Hipertensión* 13: 262-265, 1996.
47. Tamargo Menéndez J. Recuerdo fisiológico del sistema renina-angiotensina-aldosterona. *Medicine* (ed. española)7: 829-835, 1996.
48. Erdos EG. Angiotensin I-converting enzyme and the changes in our concepts through the years. *Hypertension* 16: 363-370, 1990.
49. Iyer SN, Ferrario CM, Chappell MC. Angiotensin-(1-7) contributes to the antihypertensive effects of blockade of the renin-angiotensin system. *Hypertension* 31: 356-361, 1998.
50. Nishimura H, Hoffmann S, Baltatu O, Sugimura K, Ganten D, and Urata H. Angiotensin I converting enzyme and chymase in cardiovascular tissues. *Kidney Int* 49 (suppl. 55): S18-S23, 1996.
51. Clauser E, Curnow KM, Davies E, Conchon S, Teutsch B, Vianello B, Monnot C and Corvol P. Angiotensin II receptors: protein and gene structures, expression and potential pathological involvements. *Eur J Endocrinol* 134: 403-11, 1996.
52. Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 45: 205-251, 1993.
53. Klahr S, Morrissey J. Angiotensin II and gene expression in the kidney. *Am J Kidney Dis* 31: 171-176, 1998.
54. Regitz-Zagrosek V, NeuB M, Holzmeister J, Warnecke C, Fleck E. Molecular biology of angiotensin receptors and their role in human cardiovascular disease. *J Mol Med* 74: 233-251, 1996.

55. Dzau Vj, Re R. Tissue angiotensin system in cardiovascular medicine: A paradigm shift?. *Circulation* 89: 493-98, 1994.
56. Funck RC, Wilke A, Rupp H, Brilla CG. Regulation and role of myocardial collagen matrix remodeling in hypertensive heart disease. *Adv Exp Med Biol* 432: 35-44, 1997.
57. Pratt RE. Angiotensin II and the control of cardiovascular structure. *J Am Soc Nephrol* 10 (suppl. 11): S120-8, 1999.
58. Itoh H, Mukoyama M, Pratt RE, Gibbons GH, Dzau VJ. Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 91: 2268-74, 1993.
59. Koibuchi Y, Lee WS, Gibbons GH, Pratt RE. Role of transforming growth factor-beta 1 in the cellular growth response to angiotensin II. *Hypertension* 21: 1046-50, 1993.
60. Cody RJ. The integrated effects of angiotensin II. *Am J Cardiol* 79: 9-11, 1997.
61. Munzenmaier DH, Greene AS. Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. *Hypertension* 27: 760-5, 1996.
62. Ritchie RH, Schiebinger RJ, LaPointe MC, Marsh JD. Angiotensin II-induced hypertrophy of adult rat cardiomyocytes is blocked by nitric oxide. *Am J Physiol* 275: H1370-4, 1998.
63. Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction and inhibition of converting enzyme. *Eur Heart J* 19 (suppl. J): J7-15, 1998.
64. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium: fibrosis and renin angiotensin-aldosterone system. *Circulation* 83: 1849-1865, 1991.



65. Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, Weber KT. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiol* 26: 809-820, 1994.
66. Sadoshima J-I, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts: Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res* 73: 413-423, 1993.
67. Alderman MH, Madhavan S, Ooi WL, Cohen H, Sealy JE, Laragh JH. Association of the renin-sodium profile with the risk of myocardial infarction in patients with hypertension. *N Engl J Med* 324: 1098-1104, 1991.
68. Tamargo Menéndez J. Farmacología clínica de los inhibidores de la enzima de conversión. *Medicine* (ed. española)7: 836-843, 1996.
69. Tedesco MA, Ratti G, Aquino D, Caccavale A, Acitorio M, Rocereto A, Cosimi R, Coppolino P, Iarussi D, Iacono A. The effectiveness and tolerability of losartan and effect on left ventricular mass in patients with essential hypertension (abstract). *Cardiologia* 43: 53-9, 1998.
70. Hayashida W, Donckier J, Van Mechelen H, Charlier AA, Pouleur H. Diastolic properties in canine hypertensive left ventricular hypertrophy: effects of angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin II type-1 receptor blockade. *Cardiovasc Res* 33: 54-62, 1997.
71. Nunez E, Hosoya K, Susic D, Frohlich ED. Enalapril and losartan reduced cardiac mass and improved coronary hemodynamics in SHR. *Hypertension* 29: 519-24, 1997.
72. Yoshida H, Mitarai T, Kawamura T, Kitajima T, Miyazaki Y, Nagasawa R, Kawaguchi Y, Kubo H, Ichikawa I, and Sakai O. Role of the deletion polymorphism

- of the angiotensin converting enzyme gene in the progression and therapeutic responsiveness of IgA nephropathy. *J Clin Invest* 96: 2162-2169, 1995.
73. Moriyama T, Kitamura H, Ochi S, Izumi M, Yokoyama K, Yamauchi A, Ueda N, Kamada T, Imai E. Association of angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism with susceptibility to antiproteinuric effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitors in patients with proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 6: 1676-1678, 1995.
74. Sasaki M, Oki T, Iuchi A, Tabata T, Yamada H, Manabe K, Fukuda K, Abe M, Ito S. Relationship between the angiotensin converting enzyme gene polymorphism and the effects of enalapril on left ventricular hypertrophy and impaired diastolic filling in essential hypertension: M-mode and pulsed Doppler echocardiographic studies. *J Hypertens* 14: 1403-8, 1996.
75. Hernández D, Lacalzada J, Linares J, Barragán A, Higuera L, Lorenzo V, Laynez I, Rodríguez A, Salido E, García S, Torres A. Regression of left ventricular hypertrophy (LVH) by lisinopril after renal transplantation (RT). Role of angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphism. *Kidney Int* 58: 889-97, 2000.
76. Jacobsen P, Rossing K, Rossing P, Tarnow L, Mallet C, Poirier O, Cambien F, Parving HH. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and ACE inhibition in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 53: 1002-1006, 1998.
77. Parving HH, Jacobsen P, Tarnow L, Rossing P, Lecerf L, Poirier O, Cambien F. Effect of deletion polymorphism of angiotensin converting enzyme gene on progression of diabetic nephropathy during inhibition of angiotensin converting enzyme: observational follow up study. *BMJ* 313: 591-4, 1996.

78. Cambien F, Alhenc-Gelas F, Herbeth B, Andre JL, Rakatovao R, Gonzales MF, Allegrini J, Bloch C. Familial resemblance of plasma angiotensin-converting enzyme level: the Nancy study. *Am J Hum Genet* 43: 774-780, 1988.
79. Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Hubert C, Allegrini J, John M, Tregear G, Corvol P. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9386-9390, 1988.
80. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 86: 1343-1346, 1990.
81. Hunley TE, Julian BA, Phillips JA III, Summar ML, Yoshida H, Horn RG, Brown NJ, Fogo A, Ichikawa I, Kon V. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism: Potential silencer motif and impact on progression in IgA nephropathy. *Kidney Int* 49: 571-577, 1996.
82. Nakai K, Itoh C, Miura Y, Hotta K, Musha T, Itoh T, Miyakawa T, Iwasaki R, Hiramori K. Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese. *Circulation* 90: 2199-2202, 1994.
83. Castellano M, Muiesan ML, Rizzoni D, Beschi M, Pasini G, Cinelli A, Salvetti M, Porteri E, Bettoni G, Kreutz R, Lindpaintner K, Rosei EA. Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism and arterial wall thickness in a general population. The Vobarno Study. *Circulation* 91: 2721-2724, 1995.
84. Hernández D, Lacalzada J, Rufino M, Torres A, Martín N, Barragán A, Barrios Y, Macía M, de Bonis E, Lorenzo V, Rodríguez A, González-Posada JM, and Salido E.

- Prediction of left ventricular mass changes after renal transplantation by polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene. *Kidney Int* 51: 1205-1211, 1997.
85. Tiret L, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, Cambien F, Soubrier F. Evidence from combined segregation and linkage analysis that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE. *Am J Hum Genet* 51: 197-205, 1992.
86. Costerousse O, Allegrini J, Lopez M, Alhenc-Gelas F. Angiotensin I converting enzyme in human circulatory mononuclear cells: Genetic polymorphism of expression in T lymphocytes. *Biochem J* 290: 33-40, 1993.
87. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou J-P, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Ricard S, Tiret L, Amouyel P, Alhenc-Gelas F and Soubrier F. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 359:641-644, 1992.
88. Ludwig EH, Borecki IB, Ellison RC, Folsom AR, Heiss G, Higgins M, Lalouel JM, Province MA, Rao DC. Associations between candidate loci angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen with coronary heart disease and myocardial infarction: the NHLBI Family Heart Study. *Ann Epidemiol* 7:1, 3-12, 1997.
89. Cambien F, Costerousse O, Tiret L, Poirier O, Lecerf L, Gonzales MF, Evans A, Arveiler D, Cambou JP, Luc G, Rakotavao R, Ducimetiere P, Soubrier F, Alhenc-Gelas F. Plasma level and gene polymorphism of angiotensin-converting enzyme in relation to myocardial infarction. *Circulation* 90:669-676, 1994.
90. Erwin L, Corneli PS, Anderson JL, Marshall HW, Lalouel J-M, Ward RH. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with myocardial

- infarction but not with development of coronary stenosis. *Circulation* 91: 2120-2124, 1995.
91. Mattu RK, Needham EWA, Galton DJ, Frangos E, Clark AJL, Caufield M. A DNA variant at the angiotensin-converting enzyme gene locus associates with coronary artery disease in the Caerphilly heart study. *Circulation* 91: 270-274, 1995.
92. Lindpaintner K, Pfeffer MA, Kreutz R, Stampfer MJ, Grodstein F. A prospective evaluation of an angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and the risk of ischaemic heart disease. *N Engl J Med* 332: 706-711, 1995.
93. Samani NJ, O'Toole L, Martin D, Rai H, Fletcher S, Lodwick D, Thompson JR, Morice AH, Channer K, Woods KL. Insertion/deletion polymorphisms of the angiotensin converting enzyme gene and risk of prognosis after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 28: 338-344, 1996.
94. Bohn M, Berge KE, Bakken A, Erikssen J, Berg K. Insertion/deletion (I/D) polymorphism at the locus for the angiotensin converting enzyme gene and myocardial infarction. *Clin Genet* 44: 292-97, 1993.
95. Samani NJ, Thompson JR, O'Toole L, Channer K, Woods KL. A meta-analysis of the association of the deletion allele of the angiotensin-converting enzyme gene with myocardial infarction. *Circulation* 94: 708-712, 1996.
96. Schunkert H, Hense H-W, Holmer SR, Stender M, Perz S, Keil U, Lorell BH, Riegger GAJ. Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med* 330:1634-1638, 1994.

97. Clarkson PB, Prasad N, MacLeod C, et al. Influence of the angiotensin converting enzyme I/D gene polymorphisms on left ventricular diastolic filling in patients with essential hypertension. *J Hypertens* 15: 995-1000, 1997
98. Montgomery HE, Clarkson P, Dollery CM, Prasad K, Losi MA, Hemingway H, Statters D, Jubb M, Girvain M, Varnava A, World M, Deanfield J, Talmud P, McEwan JR, McKenna WJ, Humphries S. Association of angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism with change in left ventricular mass in response to physical training. *Circulation* 96: 741-747, 1997.
99. Celentano A, Mancini FP, Crivaro M, Palmieri V, Ferrara LA, De Stefano V, Di Minno G, de Simone G. Cardiovascular risk factors, angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism, and left ventricular mass in systemic hypertension. *Am J Cardiol* 83: 1196-1200, 1999.
100. Schunkert H. Controversial association of left ventricular hypertrophy and the ACE I/D polymorphism- is the mist clearing up? *Nephrol Dial Transplant* 13: 1109-1112, 1998.
101. Lindpaintner K, Lee M, Larson MG, Rao VS, Pfeffer MA, Ordovas JM, Schaefer EJ, Wilson AF, Wilson PWF, Vasan RS, Myers RH, and Levy D. Absence of association or genetic linkage between the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular mass. *N Engl J Med* 334: 1023-28, 1996.
102. Kupari M, Perola M, Koskinnen P, Virolainen J, Karkunen PJ. Left ventricular size, mass and function in relation to angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in humans. *Am J Physiol* 267: H1107-11, 1994.

103. Kario K, Kanai N, Nishiuma S, Fujii T, Saito K, Matsuo T, Shimada K. Hypertensive nephropathy and the gene for angiotensin-converting enzyme. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 252-256, 1997.
104. Pontremoli R, Sofia A, Tirota A, Ravera M, Nicoletta C, Viazzi F, Bezante GP, Borgia L, Bobola N, Ravazzolo R, Sacchi G, Deferrari G. The deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with target organ damage in essential hypertension. *J Am Soc Nephrol* 7: 2550-2558, 1996.
105. O'Donnell CJ, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, Ordovas JM, Schaefer EJ, Myers RH, Levy D. Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study. *Circulation* 97: 1766-1772, 1998.
106. Harrap SB, Davidson HR, Connor JM, Soubrier F, Corvol P, Fraser R, Foy CJ, Watt GC. The angiotensin-converting enzyme gene and predisposition to high blood pressure. *Hypertension* 21: 455-60, 1993.
107. Gu XX, Spaepen M, Guo C, Fagard R, Amery A, Lijnen P, Cassiman JJ. Lack of association between a insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and essential hypertension in a Belgian population. *J Hum Hypertens* 8: 683-685, 1994.
108. Elshat YI, Obineche EN, Lestringent GG, Frossard PM. An angiotensin-converting enzyme gene polymorphism does not correlate with hypertension in an Arab population from the United Arab Emirates. *Am J Hum Genet* 57: 1379, 1995.
109. Berge KE, Berg K. No effect of insertion/deletion polymorphism at the ACE locus on normal blood pressure level or variability. *Clin Genet* 45:169-174, 1994.

110. Missouris CG, Barley J, Jeffery S, Carter ND, Singer DRJ and MacGregor GA. Genetic risk for renal artery stenosis: Association with deletion polymorphism in angiotensin 1-converting enzyme gene. *Kidney Int* 49:534-537, 1996.
111. Markus HS, Barley J, Lunt R, Bland JM, Jeffery S. Angiotensin-converting enzyme gene deletion polymorphism – new risk factor for lacunar stroke but not carotid atheroma. *Stroke* 26: 1326-1333, 1995.
112. Margaglione M, Celentano E, Grandone E, Vecchione G, Cappaucci G. Deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene in patients with a history of ischaemic stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 304-9, 1996.
113. Agerholm-Larsen B, Tybjærg-Hansen A, Frikke-Schmidt R, Grønholdt MLM, Jensen G and Nordestgaard BG. ACE gene polymorphism as a risk factor for ischemic cerebrovascular disease. *Ann Intern Med* 127: 346-355, 1997.
114. Baboolal K, Ravine D, Daniels J, Williams N, Holmans P, Coles GA, Williams JD. Association of the angiotensin I converting enzyme gene deletion polymorphism with early onset of ESRF in PKD1 adult polycystic kidney disease. *Kidney Int* 52: 607-13, 1997.
115. Tarnow L, Glud Ch and Parving H-H. Diabetic nephropathy and the insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene. *Nephrol Dial Transplant* 13: 1125 -1130, 1998.
116. Marre M, Bernadet P, Gallois Y, Savagner F, Guyene TT, Hallab M, Cambien F, Passa P, Alhenc Gelas F. Relationships between angiotensin I converting enzyme gene polymorphism, plasma levels, and diabetic retinal and renal complications. *Diabetes* 43: 384-388, 1994.



117. Vleming LJ, van der Pijl JW, Lemkes HH, Westendorp RG, Maassen JA, Daha MR, van Es LA, van Kooten C. The DD genotype of the ACE gene polymorphism is associated with progression of diabetic nephropathy to end stage renal failure in IDDM. *Clin Nephrol* 51: 133-40, 1999.
118. Kuramoto N, Iizuka T, Ito H, Yagui K, Omura M, Nozaki O, Nishikawa T, Tsuchida H, Makino H, Saito Y, Kanatsuka A. Effect of ACE gene on diabetic nephropathy in NIDDM patients with insulin resistance. *Am J Kidney Dis* 33: 276-81, 1999.
119. Lee DY, Kim W, Kang SK, Koh GY, Park SK. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in patients with minimal-change nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Nephron* 77: 471-3, 1997.
120. Fernandez-Llama P, Poch E, Oriola J, Botey A, Coll E, Darnell A, Rivera F, Revert L. Angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism in essential hypertension and nephroangiosclerosis. *Kidney Int* 53: 1743-7, 1998.
121. Broekroelofs J, Stegeman CA, Navis G, Tegzess AM, De Zeeuw D, De Jong PEJ. Risk factors for long-term renal survival after renal transplantation: a role for angiotensin-converting enzyme (insertion/deletion) polymorphism? *J Am Soc Nephrol* 9: 2075-81, 1998.
122. Takayanagi R, Ohnaka K, Sakai Y, Nakao R, Yanase T, Haji M, Inagami T, Furuta H, Gou D-F, Nakamuta M, Nawata H. Molecular cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding human type-1 angiotensin II receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 183: 910-915, 1992.

123. Bergsma DJ, Ellis C, Kumar C, Nuthulaganti P, Kersten H, Elshourbagy N, Griffin E, Stadel JM, Aiyar N. Cloning and characterization of a angiotensin II type1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 183: 989-995, 1992.
124. Aiyar N, Baker E, Wu HL, Nambi P, Edwards RM, Trill JJ, Ellis C, Bergsma DJ. Human AT1 receptor is a single copy gene: characterization in a stable cell line. *Mol Cell Biochem* 131: 75-86, 1994.
125. Davies E, Bonnardeaux A, Lathrup GM, Corvol P, Clauser E, Soubrier F. Angiotensin II (type 1) receptor locus: CA repeat polymorphism and genetic mapping. *Hum Mol Genet* 3: 838, 1994.
126. Su B, Martin MM, Beason KB, Miller PJ, Elton TS. The genomic organization and functional analysis of the promoter for the human angiotensin II type 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 204: 1039-1046, 1994.
127. Guo D, Furuta H, Mizukoshi M, Inagami T. The genomic organization of human angiotensin II type 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 313-319, 1994.
128. Curnow KM, Pascoe L, White PC. Genetic analysis of the human type-1 angiotensin II receptor. *Mol Endocrinol* 6: 1113-1118, 1992.
129. Bonnardeaux A, Davies E, Jeunamaitre X, Féry I, Charru A, Clauser E, Tiret L, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. Angiotensin II type I receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension* 24: 63-69, 1994.
130. Doria A, Warram JH, Krolewski AS. Ddel polymorphism in the AGTR1 gene. *Hum Mol Genet* 3: 1444, 1994.
131. Rolfs A, Kallisch H, Weber I, Regitz-Zagrosck V, Fleck E. A MnlI polymorphism at base pair 570 of the human angiotensin II, subtype 1 receptor gene. *Hum Mol Genet* 3: 213-214, 1994.

132. Rolfs A, Weber-Rolfs I, Regitz-Zagrosck V, Kallisch H, Riedel K, Fleck E. Genetic polymorphisms of the angiotensin II type 1 (AT1) receptor gene. *Eur Heart J* 15 (suppl D): 108-112, 1994.
133. Williams GH, Dluhy RG, Lifton RP, Moore TJ, Gleason R, Williams R, Hunt SC, Hopkins PN, Hollenberg NK. Non-modulation as an intermediate phenotype in essential hypertension. *Hypertension* 20: 788-796, 1992.
134. Wang WY, Zee RY, Morris BJ. Association of angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism with essential hypertension. *Clin Genet* 51:31-34, 1997.
135. Berge KE, Bakken A, Bohn M, Erikssen J, Berg K. A DNA polymorphism at the angiotensin II type 1 receptor (AT1R) locus and myocardial infarction. *Clin Genet* 52: 71-76, 1997.
136. Amant C, Hamon M, Bauters C, Richard F, Helbecque N, McFadden EP, Escudero X, Lablanche JM, Amouyel P, Bertrand ME. The angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism is associated with coronary artery vasoconstriction. *J Am Coll Cardiol* 29: 486-490, 1997.
137. Nakauchi Y, Suehiro T, Yamamoto M, Yasuoka N, Kumon Y, Hamashige N, Hashimoto K. Significance of angiotensin I-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms as risk factors for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 125: 161-169, 1996.
138. Tiret L, Bonnardeaux A, Poirier O, Ricard S, Marques-Vidal P, Evans A, Arveiler D, Luc G, Kee F, Ducimetière P, Soubrier F, Cambien F. Synergistic effects of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type I receptor gene polymorphisms on risk of myocardial infarction. *Lancet* 344: 910-913, 1994.

139. Hamon M, Amant C, Bauters C, Richard F, Helbecque N, McFadden E, Lablanche JM, Bertrand M, Amouyel P. Association of angiotensin converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor genotypes with left ventricular function and mass in patients with angiographically normal coronary arteries. *Heart* 77: 502-505, 1997.
140. Gould AB, and Green B. Kinetics of the human renin and human renin substrate reaction. *Cardiovasc Res* 5: 86-89, 1971.
141. Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation* 87: 1816-1828, 1993.
142. Lee MA, Bohn M, Paul M, Ganten D. Tissue renin angiotensin systems: their role in cardiovascular disease. *Circulation* 87 (suppl 4): IV-7-IV-13, 1993.
143. Eggena P, Barrett JD. Regulation and functional consequences of angiotensinogen gene expression. *J Hypertens* 10: 1307-1311, 1992.
144. Eggena P, Barrett JD, Sambhi MP, Fredal AM. Renin substrate and the renin angiotensin system in hog tissue. *Biochem Med Metab Biol* 36: 82-90, 1986.
145. Baker KM, Chernin MI, Wixson SK, Aceto JF. Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. *Am J Physiol* 259: H324-H332, 1990.
146. Finckh M, Hellmann W, Ganten D, Furtwangler A, Allgeier J, Boltz M, Holtz J. Enhanced cardiac angiotensinogen gene expression and angiotensin converting enzyme activity in tachypacing-induced heart failure in rats. *Basic Res Cardiol* 86: 303-16, 1991.
147. Schunkert H, Ingelfinger JR, Hirsch AT, Tang SS, Litwin SE, Talsness CE, Dzau VJ. Evidence for tissue-specific activation of renal angiotensinogen RNAm

- expression in chronic stable experimental heart failure. *J Clin Invest* 90: 1523-9, 1992.
148. Fasola AF, Martz BL, and Helmer OM. Plasma renin activity during supine exercise in offspring of hypertensive parents. *J Appl Physiol* 25: 410-415, 1968.
149. Walker WG, Welton PK, Saito H, Rusell RP, and Hermann J. Relation between blood pressure and renin, renin substrate, angiotensin II, aldosterone and urinary sodium and potassium in 574 ambulatory subjects. *Hypertension* 1: 287-291, 1979.
150. Corvol P and Jeunemaitre X. Molecular Genetics of human hypertension: role of angiotensinogen. *Endocrine Reviews* 18: 662-677, 1997.
151. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevstev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, Hunt SC, Hopkins PN, Williams RR, Lalouel JM, and Corvol P. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 71: 169-180, 1992.
152. Hegele RA, Brunt JH, Connelly PW. A polymorphism of AGT gene associated with variation in BP in a genetic isolate. *Circulation* 90: 2207-2212, 1994.
153. Katsuya T, Koike G, Yee TW, Sharpe N, Jackson R, Norton R, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ, MacMahon S. Association of angiotensinogen gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease. *Lancet* 345: 1600- 03, 1995.
154. Bloem LJ, Foroud TM, Ambrosius WT, Hanna MP, Tewksbury DA, Pratt JH. Association of the angiotensinogen gene to serum angiotensinogen in blacks and whites. *Hypertension* 29: 1078-1082, 1997.
155. Caulfield M, Lavender P, Newell-Price J, Farrall M, Kamdar S, Daniel H, Lawson M, De Freitas P, Fogarty P, and Clark AJL. Linkage of the angiotensinogen gene locus to human essential hypertension in African Caribbeans. *J Clin Invest* 96: 687-692, 1995.

156. Jeunemaitre X, Charru A, Chatellier G, Dumont C, Sassano P, Soubrier F, Menard J, Corvol P. M235T variant of the human angiotensinogen gene in unselected hypertensive patients. *J Hypertens Suppl* 11 (suppl 5): S80-S81, 1993.
157. Hopkins PN, Lifton RP, Hollenberg NK, Jeunemaitre X, Hallouin MC, Skuppin J, Williams CS, Dluhy RG, Lalouel JM, Williams RR, Williams GH. Blunted renovascular response to AngII is associated with a common variant of the AGT gene and obesity. *J Hypertens* 14: 199-207, 1996.
158. Jeunemaitre X, Inoue I, Williams C, Charru A, Tichet J, Powers M, Sharma AM, Gimenez-Roqueplo AP, Hata A, Corvol P, Lalouel JM. Haplotypes of angiotensinogen in essential hypertension. *Am J Hum Genet* 60: 1448-60, 1997.
159. Caulfield M, Lavender P, Farrall M, Munroe P, Lawson M, Turner P, and Clark A. Linkage of the AGT gene to essential hypertension. *N Engl J Med* 330: 1629-1633, 1994.
160. Staessen JA, Kuznetsova T, Wang JG, Emelianov D, Vlietinck R, Fagard R. M235T angiotensinogen gene polymorphism and cardiovascular renal risk. *J Hypertens* 17: 9-17, 1999.
161. Hara A, Namikawa C, Sasaki M, Sato K, Nakamura T, Tamura K, Lalouel JM. Angiotensinogen as a risk factor for essential hypertension in Japan. *J Clin Invest* 93: 1285-1287, 1994.
162. Kamitani A, Rakugi H, Higaki J, Yi Z, Mikami H, Miki T, Ogihara T. Association analysis of a polymorphism of the angiotensinogen gene with essential hypertension in Japanese. *J Hum Hypertens* 8: 521-524, 1994.
163. Winkelmann BR, Russ AP, Nauck M, Klein B, Bohm BO, Maier V, Zotz R, Matheis G, Wolf A, Wieland H, Gross W, Galton DJ, Marz W. Angiotensinogen

- M235T polymorphism is associated with plasma angiotensinogen and cardiovascular disease. *Am Heart J* 137: 698-705, 1999.
164. Marre M, Jeunemaitre, Gallois Y, Rodier M, Chatellier G, Sert C, Dusselier L, Kahal Z, Chaillous L, Halimi S, Sackmann H, Bauduceau B, Bled F, Passa P, and Alhenc-Gelas F. Contribution of genetic polymorphism in the renin-angiotensin system to the development of renal complications in insulin-dependent diabetes. Génétique de la Néphropathie Diabétique (GENEDIAB) Study Group. *J Clin Invest* 99: 1585-1595, 1997.
165. Urata H, Healy RW, Stewart FM, Bumpus and Husain A. Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts. *Circ Res* 66: 883-890, 1990.
166. Urata H, Kinoshita KS, Misono FM, Bumpus and Husain A. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem* 265: 22348-22357, 1990.
167. Kinoshita A, Urata H, Bumpus FM and Husain A. Multiple determinants for the high substrate specificity of an angiotensin II-forming chymase from the human heart. *J Biol Chem* 266: 19192-19197, 1991.
168. Pfeufer A, Osterziel K-J, Urata H, Borck G, Schuster H, Wienker T, Dietz R, and Luft FC. Angiotensin-converting enzyme and heart chymase gene polymorphisms in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 78: 362-364, 1996.
169. Pfeufer A, Busjahn A, Vergopoulos A, Knoblauch H, Urata H, Osterziel KJ, Menz M, Wienker TF, Faulhaber HD, Steinmetz A, Schuster H, Dietz R, and Luft FC. Chymase gene locus is not associated with myocardial infarction and is not linked to heart size or blood pressure. *Am J Cardiol* 82: 979-981, 1998.

170. Meade TW, North WRS. Population based distributions of haemostatic variables. *Br Med Bull* 33: 283-288, 1977.
171. Meade TW, Chakrabarti R, Haines AP, North WRS, Stirling Y. Characteristics affecting fibrinolytic activity and plasma fibrinogen concentrations. *BMJ* 1: 153-56, 1979.
172. Meade TW, Imeson J, Stirling Y. Effects of changes in smoking and other characteristics on clotting factors and the risk of ischaemic heart disease. *Lancet* ii : 986-988, 1987.
173. Smith EB, Keen GA, Grant A, Stirk C. Fate of fibrinogen in the human intima. *Atherosclerosis* 10: 263-275, 1990.
174. Lowe GDO. Blood viscosity and cardiovascular disease. *Thromb Haemostas* 67: 494-498, 1992.
175. Chung DW, Harris JE, Davie EW. Nucleotide sequence of the 3 genes coding for human fibrinogen. In: Liu CY, Chien S, eds. *Thrombosis, Coagulation and Fibrinolysis*. New York, NY: Plenum Publishing Corporation 39-48, 1990.
176. Behague I, Poirier O, Nicaud V, Evans A, Arveiler D, Luc G, Cambou JP, Scarabin PY, Bara L, Green F, Cambien F.  $\beta$  Fibrinogen gene polymorphisms are associated with plasma fibrinogen and coronary artery disease in patients with myocardial infarction. The ECTIM Study. *Circulation* 93: 440-449, 1996.
177. Humphries SE. Genetic regulation of fibrinogen. *Eur Heart J* 16 (Supplement A): 16-20, 1995.
178. Humphries SE, Ye S, Talmud PJ, Bara L, Wilhelmsen L, Tiret L. European Atherosclerosis Research Study: genotype at the fibrinogen locus (G-455-A  $\beta$ -gene) is associated with differences in plasma fibrinogen levels in young men and women



- from different regions in Europe: Evidence for gender-genotype-environment interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 96-104, 1995.
179. Thomas AE, Green FR, Humphries SE. Association of genetic variation at the beta-fibrinogen gene locus and plasma fibrinogen levels; interaction between allele frequency of the G/A-455 polymorphism, age and smoking. *Clin Genet* 50: 184-190, 1996.
180. Tybjærg-Hansen A, Agerholm-Larsen B, Humphries SE, Abildgaard S, Schnohr P, and Nordestgaard BG. A common mutation (G-455→A) in the  $\beta$ -fibrinogen promoter is an independent predictor of plasma fibrinogen, but not of ischemic heart disease. *J Clin Invest* 99 : 3034 -3039, 1997.
181. Carter AM, Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ.  $\beta$ -fibrinogen gene -455G/A polymorphism and fibrinogen levels. Risk factors for coronary artery disease in subjects with NIDDM. *Diabetes Care* 19: 1265-1268, 1996.
182. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary arterie disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 326: 242-50, 1992.
183. Nyman I, Larsson H, Wallentin L. Prevention of serious cardiac events by low-dose aspirin in patients with silent myocardial ischemia: the Research Group on Instability in Coronary Artery Disease in Southeast Sweden. *Lancet* 340: 497-501, 1992.
184. Juul-Moller S, Edvardsson N, Jahnmatz B, Rosen A, Sorenson S, Omblus R. Double-blind trial of aspirin in primary prevention of myocardial infarction in patients with stable chronic angina pectoris: the Swedish Angina Pectoris Aspirin Trial (SAPAT) Group. *Lancet* 340: 1421-25, 1992.

185. Calvete JJ. On the structure and function of platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, the fibrinogen receptor. *Proc Soc Exp Biol Med* 208: 346-360, 1995.
186. Newman PJ, Derbes RS, Aster RH. The human platelet alloantigens, PlA1 and PlA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J Clin Invest* 83: 1778-81, 1989.
187. Zotz RB, Winkelmann BR, Nauck M, Giers G, Maruhn-Debowski B, Marz W, Scharf RE. Polymorphism of the platelet membrane glycoprotein IIIa: human platelet antigen 1b (HPA-1b/PlA2) is an inherited risk factor for premature myocardial infarction in coronary artery disease. *Thromb Haemost* 79: 731-735, 1998.
188. Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Shulman SP, Kickler TS, Becker LC, Weiss JL, Gerstenblith G, and Goldschmidt-Clermont PJ. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med* 334: 1090-94, 1996.
189. Carter AM, Ossei-Gerning, Grant PJ. Platelet glycoprotein IIIa PlA polymorphism in young men with myocardial infarction. *Lancet* 348 (letter): 485-486, 1996.
190. Anderson JL, King GJ, Bair TL, Elmer SP, Muhlestein JB, Habashi J, Carlquist JF. Associations between a polymorphism in the gene encoding glycoprotein IIIa and myocardial infarction or coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 33: 727-33, 1999.
191. Salido E, Martín B, Barrios Y, Linares JD, Hernández D, Cobos M, Checa MD, Fernández A, García JJ, Torres A. The PlA2 polymorphism of the platelet

- glycoprotein IIIa gene as a risk factor for acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 10: 2599-605, 1999.
192. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC Jr, Weisgraber KH, Taylor JM. Apolipoprotein E: genetic variants provide insights into its structure and function. *Curr Opin Lipidol* 1: 87-95, 1990.
193. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240: 622-30, 1988.
194. Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 8: 1-21, 1988.
195. Eto M, Watanabe K, Ishii K. Reciprocal effects of apolipoprotein E (epsilon 2 and epsilon 4) on plasma lipid levels in normolipidemic subjects. *Clin Genet* 29: 477-84, 1986.
196. Muros M, Rodríguez-Ferrer C. Apolipoprotein E polymorphism influence on lipids, apolipoproteins and Lp(a) in a Spanish population underexpressing apo E4. *Atherosclerosis* 121:1, 13-21, 1996.
197. Stengard JH, Zerba KE, Pekkanen J, Ehnholm C, Nissinen A, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism predicts death from coronary heart disease in a longitudinal study of elderly Finnish men. *Circulation* 91: 265-9, 1995.
198. Wang XL, McCredie RM, Wilcken DE. Polymorphisms of the apolipoprotein E gene and severity of coronary artery disease defined by angiography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 8: 1030-4, 1995.
199. Nakata Y, Katsuya T, Rakugi H, Takami S, Ohishi M, Kamino K, Higaki J, Tabuchi Y, Kumahara Y, Miki T, Ogihara T. Polymorphism of the apolipoprotein E

- and angiotensin-converting enzyme genes in Japanese subjects with silent myocardial ischemia. *Hypertension* 6: 1205-9, 1996.
200. Cattin L, Fisicaro M, Tonizzo M, Valenti M, Danek GM, Fonda M, Da Col PG, Casagrande S, Pincetri E, Bovenzi M, Baralle F. Polymorphism of the apolipoprotein E gene and early carotid atherosclerosis defined by ultrasonography in asymptomatic adults. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 91-94, 1997.
201. Kessler C, Spitzer C, Stauske D, Stadlmuller J, Walther R, Rettig R. The apolipoprotein E and beta-fibrinogen G/A-455 gene polymorphisms are associated with ischemic stroke involving large-vessel disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 2880-2884, 1997.
202. Nakata Y, Katsuya T, Rakugi H, Takami S, Sato N, Kamide K, Ohishi M, Miki T, Higaki J, Ogihara T. Polymorphism of angiotensin converting enzyme, angiotensinogen, and apolipoprotein E genes in a Japanese population with cerebrovascular disease. *Am J Hypertens* 10: 1391-1395, 1997.
203. Imura T, Kimura H, Gejyo F. Apolipoprotein E phenotypes in hemodialysis patients. *Kidney Int* 71 (Suppl): S245-7, 1999.
204. Roussos L, Florin C, Carlson J, Svensson PJ, Wallmark A, Ekberg H. Increased prevalence of apolipoprotein E3/E4 genotype among Swedish renal transplant recipients. *Nephron* 83: 25-30, 1999.
205. De Knijff P, Stalenhoef AF, Mol MJ, Gevers Leuven JA, Smit J, Erkelens DW, Schouten J, Frants RR, Havekes LM. Influence of apo E polymorphism on the response to simvastatin treatment in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 83: 89-97, 1990.

206. Carmena R, Roederer G, Mailloux H, Lussier-Cacan S, Davignon J. The response to lovastatin treatment in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia is modulated by apolipoprotein E polymorphism. *Metabolism* 42: 895-901, 1993.
207. Yamada M. Influence of apolipoprotein E polymorphism on bezafibrate treatment response in dyslipidemic patients. *J Atheroscler Thromb* 4: 40-4, 1997.
208. Sanllehy C, Casals E, Rodriguez-Villar C, Zambon D, Ojuel J, Ballesta Am, Ros E. Lack of interaction of apolipoprotein E phenotype with the lipoprotein response to lovastatin or gemfibrozil in patients with primary hypercholesterolemia. *Metabolism* 47: 560-5, 1998.
209. Rolland PH, Friggi A, Barlatier A, Piquet P, Latrille V, Faye MM, Guillou J, Charpiot P, Bodard H, Ghiringhelli O, et al. Hyperhomocysteinemia-induced vascular damage in the mini-pig. Captopril-hydrochlorothiazide combination prevents elastic alterations. *Circulation* 91: 1161-1174, 1995.
210. Stamler J, Slivka A. Biological Chemistry of thiols in the vasculature, and in vascular related disease. *Nutr Rev* 54: 1-30, 1996.
211. Selhub J, Miller JW. The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am J Clin Nutr* 55: 131-138, 1992.
212. Kang SS, Zhou J, Wong P, Kowalysin J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 43: 414-21, 1988.
213. Mudd SH, Levy HL, Skovby F. Disorders of transsulfuration. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WL, Valle D (eds): *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (6<sup>th</sup> edn). New York, McGraw-Hill Book Co, pp 693-734, 1989.

214. Goyette P, Summer J, Milos R, Duncan M, Rosenblatt D, Matthews R, Rozen R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 7:195-200, 1994.
215. Soo-Sang K, Passen E, Ruggie N, Wong P, Sora H. Thermolabile defect of methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation* 88: 1463-1469, 1993.
216. Fodinger M, Wolf G, Fischer G, Rasoul-Rockenschaub S, Schmid R, Horl WH, Sunder-Plassmann G. Effect of MTHFR 677C>T on plasma total homocysteine levels in renal graft recipients. *Kidney Int* 55: 1072-80, 1999.
217. Farreras, Rozman. Medicina Interna (14ª ed.). Ed. Doyma, Madrid, 2000.
218. Margaglione M, Cappucci G, Colaizzo D, Giuliani N, Vecchione G, Grandone E, Pennelli O, Di Minno G. The PAI-1 gene locus 4G/5G polymorphism is associated with a family history of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 152-156, 1998.
219. Grubic N, Stegnar M, Peternel P, Kaider A, Binder BR. A novel G/A and the 4G/5G polymorphism within the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 gene in patients with deep vein thrombosis. *Thrombosis Research* 84: 431-443, 1996.
220. Dawson SJ, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S, Henney AM. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. *J Biol Chem* 268: 10739-10745, 1993.

221. Eriksson P, Kallin B, van't Hooft FM, Bavenholm P, Hamsten A. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor-1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1851-5, 1995.
222. Kimura H, Gejyo F, Suzuki Y, Suzuki S, Miyazaki R, and Arakawa M. Polymorphisms of angiotensin converting enzyme and plasminogen activator inhibitor-1 genes in diabetes and macroangiopathy. *Kidney Int* 54: 1659-1669, 1998.
223. González-Posada JM, Castro MCG, Losada M, Lorenzo V, Torres A, Hernández D, Maceira B, Salido E. Monoclonal analysis of fine-needle aspiration biopsy in kidney allografts. *Nephrol Dial Transplant* 5: 226-231, 1992.
224. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: The Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* 44: 411-422, 1993.
225. The sixth report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Arch Intern Med* 157: 2413-2446, 1997.
226. Culleton BF, Larson MG, Kannel WB, Levy D. Serum uric acid and risk for cardiovascular disease and death: The Framingham heart study. *Ann Intern Med* 131: 7-13, 1999.
227. Devereux R, Reichek N. Echocardiographic determination of left ventricular mass in man. Anatomic validation of the method. *Circulation* 55: 613-618, 1977.
228. Davis LG, Dibner MD, Battey JF. Basic methods in molecular biology. Elsevier. New York. 44-46, 1986.

229. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-91, 1988.
230. Russ AP, Maerz W, Ruzicka V, Stein U and GroB W. Rapid detection of the hypertension-associated Met<sup>235</sup> → Thr allele of the human angiotensinogen gene. *Hum Mol Genet* 2: 609-610, 1993.
231. Kasiske BL. Epidemiology of cardiovascular disease after renal transplantation. *Transplantation* 72 (6 Suppl): S5-8, 2001.
232. USRDS 1998 Annual Data Report. Renal Transplantation: Access and outcomes. *Am J Kidney Dis* 32 (Suppl 1): S89-97, 1998.
233. Kasiske BL. Ischemic heart disease after renal transplantation. *Kidney Int* 61: 356-69, 2002.
234. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 32 (5 Suppl 3): S112-9, 1998.
235. Kasiske BL, Guijarro C, Massy ZA, Wiederkehr MR, Ma JZ. Cardiovascular disease after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 7: 158-65, 1996.
236. Hernández D, Linares J, Salido E, Cobo M, Rodríguez A, Lorenzo V, Jiménez A, González-Posada J and Torres A. Role of ACE gene polymorphism on cardiovascular complications after renal transplantation. *Transplant Proc* 33: 3686-3687, 2001.
237. Aakhus S, Dahl K and Wideroe E. Cardiovascular morbidity and risk factors in renal transplant patients. *Nephrol Dial Transplant* 14: 648-654, 1999.



238. Wilson PWF, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, and Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 97: 1837-1847, 1998.
239. Lowe LP, Greenland P, Ruth KJ, Dyer AR, Stamler R, Stamler J. Impact of major cardiovascular disease risk factors, particularly in combination, on 22-year mortality in women and men. *Arch Intern Med* 158: 2007-14, 1998.
240. Koomans HA, Ligtenberg G. Mechanisms and consequences of arterial hypertension after renal transplantation. *Transplantation* 72 (Suppl 6): S9-12, 2001.
241. Florijn KW, Chang PC, van der Woude FJ, van Bockel JH, van Saase JL. Long-term cardiovascular morbidity and mortality in autosomal dominant polycystic kidney disease patients after renal transplantation. *Transplantation* 57: 73-81, 1994.
242. Massy ZA. Hyperlipidemia and cardiovascular disease after organ transplantation. *Transplantation* 72 (Suppl 6): S13-15, 2001.
243. Viberti G. Diabetes mellitus: a major challenge in transplantation. *Transplant Proc* 33 (Suppl 5A): 3S-7S, 2001.
244. Markell M. Clinical impact of postransplant diabetes mellitus: *Transplant Proc* 33 (Suppl 5A): 19S-22S, 2001.
245. Herzog CA, Ma JZ, Collins AJ. Long-term survival of renal transplant recipients in the United States after acute myocardial infarction. *Am J Kidney Dis* 36: 211-13, 2000.
246. Erkelens DW. Insulin resistance syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 11: 38J-42J, 2001.

247. Fishel RS, Eisenberg S, Shai YS, Redden RA, Bernstein KE, Berk BC. Glucocorticoids induce angiotensin-converting enzyme expression in vascular smooth muscle. *Hypertension* 25: 343-349, 1995.
248. Crisan D and Carr J. Angiotensin I-Converting Enzyme. Genotype and Disease Associations. *JMD* 2: 105-115, 2000.
249. Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. ACE gene polymorphism in cardiovascular disease: meta-analyses of small and large studies in whites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 484-92, 2000.
250. Alvarez R, Reguero JR, Batalla A, Iglesias-Cubero G, Cortina A, Alvarez V, Coto E. Angiotensin-converting enzyme and angiotensin II receptor 1 polymorphisms: association with early coronary disease. *Cardiovasc Res* 40: 375-9, 1998.
251. Schieffer B, Wirger A, Meybrunn M, Seitz S, Holtz J, Riede UN, Drexler H. Comparative effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade on cardiac remodeling after myocardial infarction in the rat. *Circulation* 89:2273-282, 1994.
252. Ward K, Hata A, Jeunemaitre X, Helin C, Nelson L, Namikawa C, Farrington PF, Ogasawara M, Suzumori K, Tomoda S, et al. A molecular variant of angiotensinogen associated with preeclampsia. *Nat Genet* 4:59-61, 1993.
253. Brand E, Chatelain N, Keavney B, Caulfield M, Citterio L, Connell J, Grobbee D, Schmidt S, Schunkert H, Schuster H, Sharma AM, Soubrier F. Evaluation of the angiotensinogen locus in human essential hypertension: a European study. *Hypertension* 31:725-9, 1998.
254. Wang WY, Glenn CL, Zhang W, Benjafield AV, Nyholt DR, Morris BJ. Exclusion of angiotensinogen gene in molecular basis of human hypertension: sibpair linkage

- and association analyses in Australian anglo-caucasians. *Am J Med Genet* 87: 53-60, 1999.
255. Sethi AA, Tybjaerg-Hansen A, Gronholdt ML, Steffensen R, Schnohr P, Nordestgaard BG. Angiotensinogen mutations and risk for ischemic heart disease, myocardial infarction, and ischemic cerebrovascular disease. Six case-control studies from the Copenhagen City Heart Study. *Ann Intern Med* 134: 941-954, 2001.
256. Rodriguez-Perez JC, Rodriguez-Esparragon F, Hernandez-Perera O, Anabitarte A, Losada A, Medina A, Hernandez E, Fiuza D, Avalos O, Yunis C, Ferrario CM. Association of angiotensinogen M235T and A(-6)G gene polymorphisms with coronary heart disease with independence of essential hypertension: the PROCAGENE study. Prospective Cardiac Gene. *J Am Coll Cardiol* 37: 1536-1542, 2001.
257. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. *N Engl J Med* 342: 145-53, 2001.
258. Wilson PW, Myers RH, Larson MG, Ordovas JM, Wolf PA, Schaefer EJ. Apolipoprotein E alleles, dyslipidemia, and coronary heart disease. The Framingham Offspring Study. *JAMA* 272: 1666- 71, 1994.
259. Oda H, Yorioka N, Ueda C, Kushihata S, Yamakido M. Apolipoprotein E polymorphism and renal disease. *Kidney Int* 71 (suppl): S25-27, 1999.
260. Tiret L, de Knijff P, Menzel HJ, Ehnholm C, Nicaud V, Havekes LM. ApoE polymorphism and predisposition to coronary heart disease in youths of different European populations. The EARS Study. European Atherosclerosis Research Study. *Arterioscler Thromb* 14: 1617-24, 1994.

261. Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolkoﬀ-Rubin N, Cosimi AB. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med* 346: 580-590, 2002.
262. Moore R, Hernandez D, Valantine H. Calcineurin inhibitors and posttransplant hyperlipidemias. *Drug Saf* 24: 775-766, 2001.