



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
LABORATORIO DE FARMACOGENÓMICA**

**POLIMORFISMO G-699C EN LA REGIÓN PROMOTORA DEL
RECEPTOR B₁ DE BRADIKININA Y TOS INDUCIDA POR
ENALAPRIL**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO
DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO

CHRISTIAN BURT PENNANEN SAAVEDRA

Profesor patrocinante:
Dr. Sergio Lavandero G.
Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Directores de tesis:
Prof. Ines Ruíz A.
Prof. Rosemarie Mellado
Departamento de Ciencias
y Tecnología Farmacéutica
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

SANTIAGO 2005, CHILE

A Victoria y Allan

AGRADECIMIENTOS

De que otra forma podría comenzar a enumerar a aquellos a quien les debo mi absoluta gratitud si no es empezando por mi familia, pues su apoyo y cariño constituyeron el motor que puso en marcha la determinación de concluir lo empezado.

A Grace, por que su amor y compañía me brindan fuerza y esperanza.

A mis profesores Ines Ruiz, Sergio Lavandero y muy especialmente a Rosemarie Mellado por su apoyo y confianza.

Me es imposible dejar de agradecer a todas las personas que trabajan en el Policlínico de Cardiología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, sin su cariñosa ayuda todo hubiese sido mas difícil y menos grato.

A mis amigos Lalas, Leo, Marcela, Laucha, Chino, Guru-guru, Palermo, Tedy, pues en cada recuerdo ellos siempre están presentes.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
RESUMEN	III
SUMMARY	V
ABREVIATURAS	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Enfermedades cardiovasculares en Chile.....	1
1.2 Sistema Renina - Angiotensina.....	2
1.2.1 Enzima convertidora de angiotensina.....	2
1.2.2 Angiotensinas.....	3
1.3 Sistema calicreína – cininas.....	5
1.3.1 Calicreínas.....	6
1.3.2 Cininas.....	7
1.3.3 Influencia del SCC en el tracto respiratorio.....	8
1.4 Medicamentos antihipertensivos inhibidores de la ECA.....	9
1.5 Farmacogenómica.....	10
1.6 Polimorfismo G-699C en el sitio promotor del RB ₁ BK.....	12
2. HIPÓTESIS	13
3. OBJETIVO GENERAL	13
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
5. MATERIALES Y MÉTODOS	14
5.1 Materiales.....	14
5.1.1 Equipo.....	14
5.1.2 Herramientas.....	14
5.1.3 Materiales utilizados para la toma de muestra.....	14
5.1.4 Reactivos utilizados en la determinación del polimorfismo.....	14
5.1.5 Reactivos utilizados en la elaboración de anticuerpos.....	15
5.2 Métodos.....	16
5.2.1 Criterios de selección de pacientes.....	16
5.2.2 Toma de muestra y recopilación de datos.....	17

5.2.3 Aislamiento y cuantificación del ADN cromosomal.....	17
5.2.4 Determinación del polimorfismo G-699C en el sitio promotor del RB ₁ BK.....	18
5.2.5 Elaboración de anticuerpos.....	21
5.2.6 Expresión de resultados y análisis estadístico.....	22
6. RESULTADOS.....	23
6.1 Caracterización de los pacientes.....	23
6.2 Frecuencia y grado de la reacción adversa.....	25
6.3 Determinación del polimorfismo G-699C en el RB ₁ BK.....	27
6.4 Genotipos del polimorfismo G-699C del RB ₁ BK.....	28
7. DISCUSIÓN.....	30
8. CONCLUSIONES.....	33
9 REFERENCIAS.....	34
10 ANEXO	
10.1 obtención de anticuerpos policlonales mediante protocolo de inmunización.....	39
10.1.1 Formación del antígeno.....	39
10.1.2 Seguimiento del título de anticuerpos.....	40

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de morbilidad y mortalidad en Chile. Según un estudio de morbilidad percibida del país, la hipertensión arterial (HTA) ocupa el primer lugar de causa de consulta a nivel primario, con una prevalencia de un 15%.

Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs), como el enalapril, son un grupo de fármacos ampliamente utilizados para el control de la HTA. Por un lado impiden la conversión de angiotensina I en el péptido vasoactivo angiotensina II y por otro producen acumulación de BK, al impedir su degradación. Como otros medicamentos, los IECAs presentan reacciones adversas que pueden limitar su uso, entre estas reacciones se encuentra la tos y el angioedema. La primera es más frecuente, desarrollándose aproximadamente en un 20% de los pacientes y en algunos casos lleva a la suspensión del tratamiento. Los mecanismos por los cuales se produce la tos no se conocen, pero se piensa que sería relevante la acumulación de BK producida por los IECAs.

La BK es un péptido vasodilatador que ejerce sus efectos a través de dos subtipos de receptores (B1 y B2), pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteína G. El receptor B2 se expresa en condiciones fisiológicas y tiene carácter constitutivo, mientras que el receptor B1 se encuentra generalmente ausente en tejidos normales, pero es rápidamente inducido después de algunos tipos de injurias bajo los efectos de citocinas y factores de crecimiento. Se conoce la existencia de dos polimorfismos para el receptor B1 de BK, uno en el exón 3 A1098G y otro en la región promotora G-699C, este último determina un aumento de la actividad promotora para el gen.

Un estudio reciente postula que los IECA podrían actuar directamente sobre el receptor B1 de BK debido a la existencia en el segundo loop extracelular de una secuencia específica que determina un dominio de unión a zinc (HEXXH). Este tipo de secuencia está presente en el sitio activo de algunas metalopeptidasas como la ECA y se encuentra altamente conservada en el receptor B1 de distintas especies, pero no está presente en el receptor B2. Además otro estudio focalizado a determinar la participación de ambos receptores en la producción de tos por IECAs demostró que el receptor B1 desempeñaría un papel importante. El objetivo del presente estudio, fue investigar la posible relación entre la manifestación de tos, producida por el consumo de enalapril, y la presencia del polimorfismo G-699C, para lo cual se realizó un estudio de casos y controles donde los casos fueron todos aquellos pacientes que presentaron tos atribuible al uso de

enalapril como terapia antihipertensiva, y los controles fueron aquellos pacientes que no presentaron tos por el uso del medicamento. La manifestación de tos se evaluó según los criterios del equipo clínico y se agrupó en grado 1, 2 y 3 de acuerdo a su severidad. La determinación de la presencia del polimorfismo G-699C, se realizó mediante PCR y posterior digestión con enzima de restricción.

Se reclutó un total de 263 pacientes con una edad promedio de $63,8 \pm 10,4$ años, de los cuales 139 fueron casos y 124 fueron controles, además la proporción de mujeres en los casos fue significativamente mayor ($p = 0.018$). El IMC promedio para el total del grupo correspondió al rango de sobrepeso ($28,3 \pm 4,7$ kg/m²).

Los casos presentaron una mayor tendencia a la manifestación de tos en grado 3, donde la proporción de mujeres con este grado fue significativamente mayor ($p = 0.041$). La dosis de enalapril más frecuentemente usada por los casos fue de 20mg/día y las diferencias encontradas entre el grado de tos y la dosis diaria de enalapril, no fueron estadísticamente significativas ($p = 0.346$).

El genotipo GG representó la mayor proporción para el grupo en estudio (93,5%) y al comparar la muestra estudiada con otras investigaciones, se observó una menor proporción para el genotipo GC. El genotipo CC no fue encontrado en ningún paciente.

No se encontró relación entre la presencia del polimorfismo G-699C y la manifestación de tos por enalapril ($p = 0.311$).

En forma paralela a la determinación del polimorfismo, se elaboró, mediante protocolo de inmunización en hembras de conejos New Zealand, anticuerpos anti-BK y anti-ANG, para la determinación plasmática de dichos péptidos y metabolitos asociados en un estudio futuro, obteniéndose títulos adecuados para ambos anticuerpos.

Esta investigación contribuyó a descartar la participación del polimorfismo G-699C en la producción de tos por el consumo de enalapril, sugiriendo que todavía falta mucho camino por investigar

SUMMARY

Cardiovascular diseases are the primary cause of morbidity and mortality in Chile. According to a study of morbidity perceived of the country, arterial hypertension (HTA) occupies first place in consultation moves at primary level, with a prevalence of a 15%.

The inhibitors of the converting enzyme of angiotensin (IECAs), like enalapril, are a drug group widely used for the control of the HTA. In one aspect they prevent the conversion of angiotensin I in the active peptide angiotensin II and by another one they produce accumulation of BK, when preventing its degradation. Like other medicines, the IECAs presents adverse reactions that can limit their use, included these reactions are the cough and angioedema. The former is more frequent, ccurring approximately in a 20% of patients and in some cases leads to the suspension of the treatment. The mechanisms by which the cough takes place are unknown, but it thinks that the accumulation of BK produced by IECAs would be important.

BK is a vasodilator peptide to exerts its effects through two subtypes of receptors (B1 and B2), they belong to the family of G protein-coupled receptors. B2 receptor it's expressed in physiological conditions and has constituent character, while B1 receptor is not in normal tissue generally, but is induced quickly, after some kinds of injuries, under effects of cytokines and growth factors. The existence of two polymorphisms for the B1 receptor of BK are known, one could be found in exón 3 A1098G and the other one in promotional region G-699C, this last one determines an increase of the promotional activity for the gene.

A recent study postulates that IECA could act directly on the B1 receptor of BK, because of the existence in the second extracellular loop of a specific zinc-binding sequence (HEXXH). This type of sequence is in the active site of some metallopeptidasas such as ECA, and is conserved highly in the B1 receptor of different species, but is not present in the B2 receptor. Moreover, other research, focused to determinate the participation of both receptors in cough production by IECA's, shows to B1 receptor would play an important role.

The objective of the present research was to investigate the possible relation between the manifestation of cough, produced by the consumption of enalapril, and the presence of G-699c polymorphism. An study of cases and controls was made, and "cases" were all those patients who presented cough attributable to the use of enalapril, like antihypertensive therapy, and the "controls" were those patients who did not present cough by the use of the medicine. The

manifestation of cough was evaluated according to the criteria of the clinical equipment and it was grouped in degree 1, 2 and 3, according to his severity. The determination of the presence of the G-699C polymorphism was made by PCR, and later digestion with restriction enzyme.

A total of 263 patients was recruited with an average age of $63,8 \pm 10.4$ years, 139 were “cases” and 124 were “controls”. Moreover, the women proportion in cases was significantly greater ($p = 0,018$). IMC average for the total of the group corresponded to the rank of overweight ($28,3 \pm 4,7$ kg/m²).

The cases presented a greater tendency to the manifestation of cough in 3° degree, and the proportion of women with this degree was significantly greater ($p = 0,041$). The dose of enalapril used with more frequency by cases was of 20mg/day and the differences found between the degree of cough and the daily dose of enalapril, were not significant statistically ($p = 0,346$).

GG genotype present the greater proportion for the group in study (93,5%) and when the sample studied was compared with other investigations, was observed a smaller proportion for GC genotype. CC genotype was not found in any patient.

Was not relation between the presence of the G-699c polymorphism and the manifestation of cough by enalapril ($p = 0,311$).

Together with determination of the polymorphism, it was elaborated, by means of protocol of immunization in females of rabbits New Zealand, antibodies anti-BK and anti-ANG, for the plasmatic determination of these peptides and metabolites associated in a future study, obtaining titles appropriated for both antibodies.

This investigation contributed to discard the participation of the G-699c polymorphism in cough production by the enalapril consumption, suggesting lack much way to investigate

ABREVIATURAS

Abs	: Absorbancia
ANG	: Angiotensina
AP	: Aminopeptidasas
APP	: Aminopeptidasa P
BK	: Bradicinina
CAGE	: Chymostatinsensitive ANG II generating enzyme
CAM	: Cininógeno de alto peso molecular
CBM	: Cininógeno de bajo peso molecular
CP	: Carboxipeptidasa
COX	: Ciclooxigenasa
DDD	: Dosis diaria definida
DS	: Desviación estándar
ECA	: Enzima convertidora de angiotensina
ECVs	: Enfermedades cardiovasculares
EPOC	: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
HTA	: Hipertensión arterial
IECAs	: Inhibidores de ECA
KLH	: Hemocianina de loco
KD	: Kalidina
NEP	: Endopeptidasa neutra
RB ₁ BK	: Receptor B ₁ de bradikinina
RIA	: Reacción de inmunoanálisis
SCC	: Sistema calicreína – cininas
SNP	: Polimorfismo de un sólo nucleótido
SRA	: Sistema renina angiotensina
TNF	: Factor de necrosis tumoral

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedades cardiovasculares en Chile

La transición epidemiológica ocurrida en nuestro país, producto de diversos factores, ha puesto a las enfermedades crónicas no transmisibles en un importante lugar desde el punto de vista de salud pública, entre estas destacan en forma preocupante aquellas relacionadas con el sistema cardiovascular¹ lo que queda de manifiesto al observar la altísima prevalencia de los factores de riesgo cardiovascular en nuestra población. A modo de ejemplo podemos mencionar que según la encuesta nacional de salud realizada el año 2004, en las personas de 17 y más años la prevalencia promedio de hipercolesterolemia fue de 35.5%, de hipertensión arterial 33.7% y de sobrepeso y obesidad 60%.^{1,2}

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs) son la principal causa de muerte en ambos sexos, una de cada tres defunciones es de causa cardiovascular. En un estudio realizado el año 1999 se observó una tasa de mortalidad de 149 por 100.000 habitantes destacando la enfermedad isquémica del corazón y la enfermedad cerebrovascular que, en conjunto, representaron el 70% del total de las defunciones para este grupo.³ Cabe destacar que junto con el aumento de la mortalidad cardiovascular en países en vías de desarrollo como el nuestro, se ha producido una disminución de ésta en países desarrollados⁴, esto puede explicarse por un mejor manejo de los factores de riesgo cardiovascular y una participación más activa del Estado en lo que respecta a este tema.

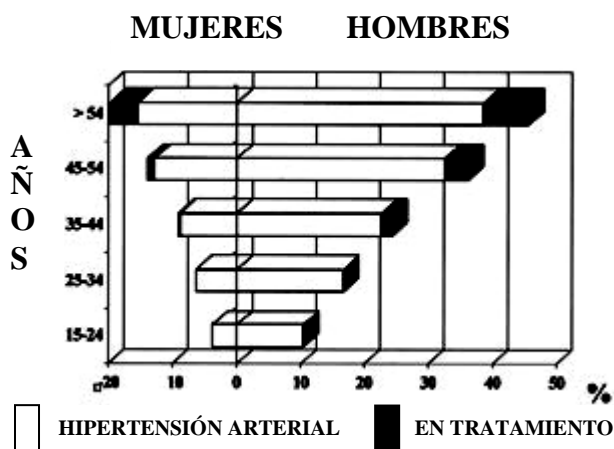


Fig. 1.- Prevalencia de hipertensión arterial en hombres y mujeres según rango de edad.⁴

La hipertensión arterial (HTA), enfermedad cardiovascular de gran prevalencia, ocupa uno de los primeros lugares de causa de consulta a nivel primario y aparece entre las más mencionadas en

los estudios de morbilidad percibida en el país³, el no tratarla significa dar lugar a un riesgo tres veces superior de padecer enfermedad coronaria, fallos cardíacos y accidentes cardiovasculares en general, por otro lado, un tratamiento adecuado reduce en forma importante el riesgo cardiovascular, estimándose que una disminución de 10-14mmHg en la presión sistólica y de 5-6mmHg en la presión diastólica, puede reducir alrededor de un 40% los accidentes cerebrovasculares, un 15% la enfermedad coronaria y un 33% los eventos cardiovasculares en forma global.³ El uso de medicamentos que disminuyan la presión arterial apunta justamente a mantener ese riesgo en el menor nivel posible para lo cual el agente terapéutico debe ser capaz de modificar el curso natural del estado hipertensivo y prevenir las complicaciones de la hipertensión.^{4,5}

1.2 Sistema Renina – angiotensina (SRA)

El desarrollo y evolución de las enfermedades cardiovasculares está ampliamente ligado al SRA que juega un rol importante en la regulación de la presión sanguínea a través de su participación en el balance hidroelectrolítico y en la homeostasis cardiovascular.⁵⁻¹⁰ El fin primario de este sistema es la producción de angiotensina II (ANG II) y se divide en dos grupos principales que son el *SRA sistémico*, donde la ANG II tiene como blancos primarios al riñón, las suprarrenales y vasos sanguíneos, y el *SRA local* que como su nombre lo indica, cumple funciones de tipo paracrino o autocrino.^{7,10}

1.2.1 Enzima convertidora de angiotensina (ECA)

La ECA, también llamada convertasa o cininasa II es una enzima dipeptidil-carboxipeptidasa ubicada en la membrana de la células endoteliales, aunque también existe una isoforma soluble. En la especie humana es una macroproteína de 1.278 aminoácidos con dos sitios activos por molécula y una región de unión a zinc^{5,7,11-13} La forma somática de la ECA se encuentra ampliamente distribuida en el endotelio del lecho vascular pulmonar, en menor escala en todo el lecho vascular, los riñones, el intestino, la placenta, los plexos coroides y en general, en todos aquellos órganos que producen localmente ANG II.⁸

La ECA tiene la habilidad de convertir el péptido inactivo ANG I en el octapéptido vasoactivo ANG II haciéndole perder dos aminoácidos terminales, es capaz de metabolizar la bradicinina 1-9 (BK) a su forma inactiva BK(1,7) y también puede transformar la ANG(1,7) a la forma inactiva ANG(1,5). De esta manera la ECA determina los niveles circulantes de ANGII, BK y ANG(1,7) contribuyendo de manera fundamental en la regulación del tono vascular y la presión arterial, además reconoce como sustrato a otros péptidos pequeños como sustancia P y encefalinas⁷⁻¹⁴, lo que da cuenta de la enorme bioactividad y de la baja especificidad de esta enzima. Recientemente Tipnis y col.¹⁵ y Donoghue y col.¹⁶, han señalado la existencia de una nueva isoforma de ECA, denominada ECA2 o ECAH que se encuentra en riñones, testículos y corazón, ubicándose mayoritariamente en el endotelio coronario, vasos intra-renales y en el epitelio del túbulo renal. La ECA2 cataliza la transformación de ANG I en ANG(1,9), nonapeptido sin actividad vascular, pero que puede ser transformado en el péptido vasodilatador ANG(1,7) por la ECA, además la ECA2 no tiene actividad sobre la bradicinina.^{7,8,11,15,16} Crackower y col.¹⁷ encontraron que la ablación del gen de ECA2 en ratón produce adelgazamiento de la pared muscular y una disminución drástica en la contractibilidad.^{11,17}

1.2.2 Angiotensinas (ANG)

Corresponden a una familia de péptidos involucrados en la respuesta vascular, el primero de ellos es el angiotensinógeno hepático sobre el cual actúa la renina, secretada por el aparato yuxtaglomerular, transformándolo en ANG I que prácticamente carece de acción vascular¹⁶⁻¹⁸. Por acción de la ECA la ANG I es transformada en ANG II, potente vasoconstrictor que ejerce sus efectos fisiológicos a través de la interacción con dos tipos de receptores acoplados a proteína G denominados receptor de angiotensina 1 (AT₁) ampliamente distribuido en tejidos adultos y receptor de angiotensina 2 (AT₂) de distribución más limitada. Los efectos deletéreos asociados a la acción de ANG II, como vasoconstricción, incremento en la contractibilidad cardíaca, acciones proaterogénicas y la participación en diversas patologías renales y vasculares, se deben a la interacción con el receptor AT₁. En forma contrapuesta los receptores AT₂ ejercen un efecto antagónico como vasodilatación y actividad antiproliferativa.^{6,8,11,18,19}

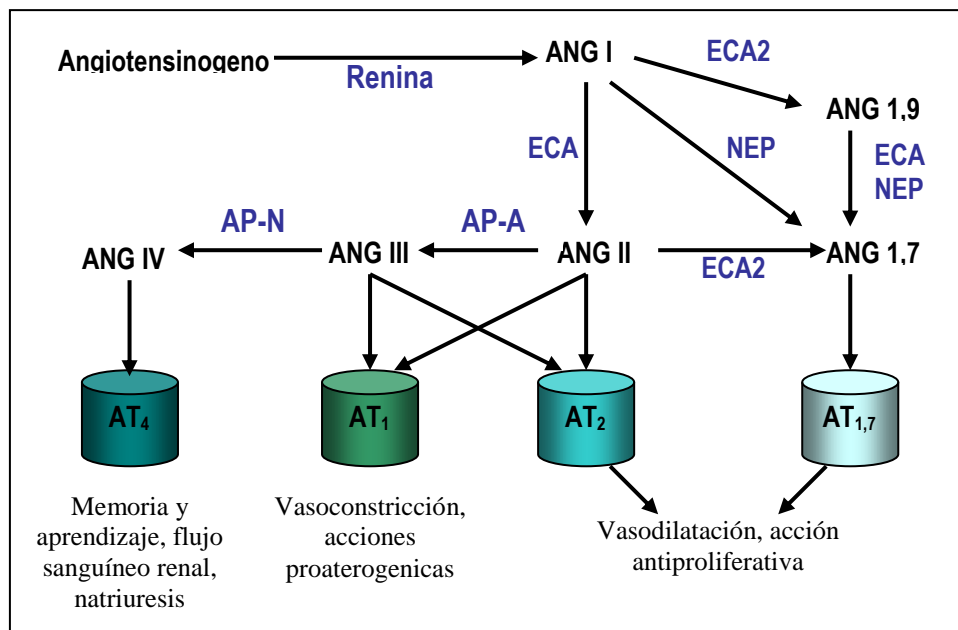


Fig 2.- Metabolismo de la ANG I. A través de diversas rutas metabólicas, la ANG I da origen a los distintos péptidos vasoactivos del SRA. Estos a su vez, interactúan con receptores específicos para generar las diferentes respuestas fisiológicas en el organismo.

Existen vías alternativas para la formación de ANG II independientes de ECA a través de la participación de enzimas como la CAGE (Chymostatin-sensitive Ang II Generating Enzyme), la quimasa y la catepsina G, de las cuales la más predominante es la quimasa que desempeña un papel importante en corazones isquémicos o hipóxicos.^{8,11,20}

La ANG(1,7) es un heptapéptido con actividad vasodilatadora y efectos cardiovasculares benéficos que actúa posiblemente potenciando en forma directa o indirecta la acción de BK, estudios recientes señalan la existencia de un receptor específico para ANG(1,7) (AT_{1,7}) distribuido en corazón y vasos sanguíneos.²⁰ La ANG(1,7) no modula la secreción de aldosterona pero sí libera vasopresina, prostaglandinas y óxido nítrico, también inhibe la proliferación del miocito liso vascular y bloquea la vasoconstricción inducida por ANG II en arterias humanas.^{11,20}

Además de las diferentes especies de angiotensinas ya mencionadas, cabe destacar la presencia de dos péptidos más, la ANG III asociada al control central de la presión sanguínea y la liberación de vasopresina y la ANG IV que periféricamente incrementa el flujo sanguíneo renal, la natriuresis y a nivel del SNC facilita la retención y recuperación de la memoria. Ambas son sintetizadas por la acción de aminopeptidasas (AP) sobre la ANG II.^{8,11,20}

1.3 Sistema calicreína – cininas (SCC)

El rol fisiológico y patológico de este sistema ha sido motivo de estudio durante casi tanto tiempo como el SRA, su descubrimiento se realizó en 1909 a través de la demostración de los efectos hipotensores pertenecientes a la orina humana²¹, desde entonces ha captado el interés científico generándose un gran número de publicaciones sobre él.

Se han descrito dos tipos de SCC en función a la localización y actividad de la enzima más importante involucrada en la síntesis de cininas, la calicreína. Esta enzima puede actuar sobre el cininógeno hepático de alto (CAM) o de bajo (CBM) peso molecular produciendo el nonapéptido bradicinina (BK) o el decapeptido calidina (KD). Es así como existe el SCC plasmático, también denominado de contacto, cuya activación esta intrínsecamente asociada al proceso de coagulación y el SCC tisular, de carácter más simple cuya actividad involucra solamente a la calicreína tisular y su sustrato. Estos sistemas juegan distintos roles fisiopatológicos.²¹⁻²⁴

El producto final del SCC lo constituyen las diversas cininas vasoactivas que ejercen sus efectos a través de 2 tipos de receptores, descritos hace 25 años por Regoli y Barbé²⁵ denominados receptor B1 y B2 de bradicininas (RB₁BK y RB₂BK) que corresponden a la familia de receptores acoplados a proteína G presentando una homología del 36% en la especie humana.²⁵⁻²⁷

El **receptor B₂**, de carácter constitutivo, se ha identificado en muchos tejidos y la mayoría de los efectos producidos por el SCC se pueden atribuir a su activación. Sus principales ligandos son las cininas nativas BK y KD, presentando una alta afinidad por éstas a diferencia de sus metabolitos cuya afinidad es mucho más baja. Cuando el RB₂BK es activado sufre una rápida internalización, perdiéndose de la superficie celular lo que determina una disminución en la habilidad de la célula para responder a futuras exposiciones al ligando.²⁸⁻³⁰

El **receptor B₁**, a diferencia del RB₂, se encuentra muy poco expresado en tejidos normales, pero puede ser inducido en diversos tipos de injurias bajo la acción de estímulos como agentes proinflamatorios, lipopolisacáridos y citocinas como interleucina 1 β y TNF α . Los agonistas endógenos de este receptor están constituidos por los metabolitos de las cininas, teniendo una mayor afinidad por des-Arg¹⁰-KD que por des-Arg⁹-BK y la BK también puede activar al RB₁ pero con una potencia mucho más baja que sus metabolitos.^{26,28,29}

Una vez que el RB₁ ha sido inducido, no puede sufrir fácilmente una regulación negativa, por lo que continuará activando rutas de segundos mensajeros mientras su ligando se encuentre disponible. Los efectos principales mediados por este receptor son la vasodilatación, la extravasación de proteínas plasmáticas, los procesos inflamatorios, la activación de interacciones entre leucocitos y células endoteliales.^{26,30}

El SCC es un sistema complejo, altamente regulado, cuyo mecanismo promotor a su vez, está vinculado con otras importantes rutas metabólicas como el SRA, la coagulación y la cascada del complemento, entre otras.^{6,21-25}

1.3.1 Calicreinas

Las calicreínas son serina-proteasas específicas y existen de dos tipos, la calicreína plasmática de 32 KDa que actúa sobre el CAM para producir el nonapéptido BK y la calicreína tisular de 29 KDa que puede actuar sobre el CAM y CBM, originando el decapeptido calidina (KD o Lys-BK). La actividad de la calicreína surge por la acción de proteasas sobre precalicreínas inactivas.

La precalicreína plasmática, que circula formando un complejo 1:1 con su sustrato el CAM, es una α -globulina secretada principalmente por los hepatocitos y se encuentra presente en el plasma humano y de otras especies con una concentración de 35-50 μ g/ml. La proteasa responsable de la activación de la precalicreína plasmática es el factor de Hageman también conocido como el factor XII, el cual es un componente de la coagulación intrínseca que, a su vez, se activa por contacto con superficies cargadas negativamente como colágeno, lipopolisacáridos bacterianos, heparina, productos plaquetarios y depósito de uratos.^{6,21,24}

La calicreína tisular es una glicoproteína distinta de la plasmática, se encuentra distribuida en el riñón, los vasos sanguíneos, el sistema nervioso central (SNC), el páncreas, los intestinos, las glándulas salivales y sudoríparas, el bazo, las suprarrenales y los neutrófilos. Esta forma de distribuirse sugiere una función paracrina. La calicreína tisular se secreta como precalicreína y es activada por plasminógeno. Su principal sustrato es el CBM sobre el cual actúa originando KD, pero también puede actuar sobre CAM y dar origen a BK.

1.3.2 Cininas

La cininas han sido implicadas en diversos procesos fisiológicos, en virtud a su habilidad para activar células endoteliales, como son la vasodilatación, el aumento de la permeabilidad vascular, la liberación del factor activador de plaminógeno tipo tisular, la producción de óxido nítrico, y la movilización de ácido araquidónico, y también, se han asociado a procesos patológicos como la inflamación.^{21,22,23}

Las cininas provienen de cininógenos por la acción de calicreínas, originando dos tipos de péptidos, la BK y la KD (o Lys-BK), ambos con perfiles farmacológicos muy similares, de modo que la KD no necesita biotransformarse en BK para ejercer su acción. Existen también otros dos péptidos activos provenientes del metabolismo de la cininas antes mencionadas que son la des-Arg⁹-BK y la des-Arg¹⁰-KD. Un factor importante en este sistema es la rápida degradación de BK, principalmente por 4 tipos de enzimas metalopeptidasas, la carboxipeptidasa M y N (CPM y CPN), la aminopeptidasa P (APP), la endopeptidasa neutra 24.11 (NEP) y la ECA. La importancia de cada una de ellas depende de la especie animal, del entorno biológico y del contexto fisiopatológico, pero todas ellas dependen de zinc para realizar su actividad catalítica.^{21,25}

La CPN es una enzima tetramérica sintetizada en el hígado y secretada al plasma a diferencia de su isoforma CPM que se encuentra unida a membrana pero ambas pueden transformar la BK y la KD en des-Arg⁹-BK y en des-Arg¹⁰-KD (o Lys-des-Arg⁹-BK) respectivamente, sugiriendo un rol importante en estados patológicos.

La ECA actualmente es considerada como una cininasa (cininasa II) debido a que tiene mayor afinidad por la BK ($K_m \approx 0.18 \mu\text{M}$) que por la ANG I ($K_m \approx 16 \mu\text{M}$)²¹, es capaz de inactivar BK y des-Arg⁹-BK transformándolas en BK(1,5), y de hecho el 80% al 90% de la BK es destruida en un solo paso por el pulmón⁶. La NEP inactiva BK y des-Arg⁹-BK, generando el metabolito inactivo BK(1-4), es la principal enzima responsable del metabolismo de cininas en el riñón y desempeña un papel importante en el endotelio. Sin embargo, su rol tiene poca significancia en el plasma a diferencia de la ECA. La APP existe en dos formas, la soluble y la unida a membrana, tiene la capacidad de transformar BK y des-Arg⁹-BK en los péptidos inactivos BK(2,9) y BK(2,8), respectivamente y es la más importante en el metabolismo de des-Arg⁹-BK.^{24,25}

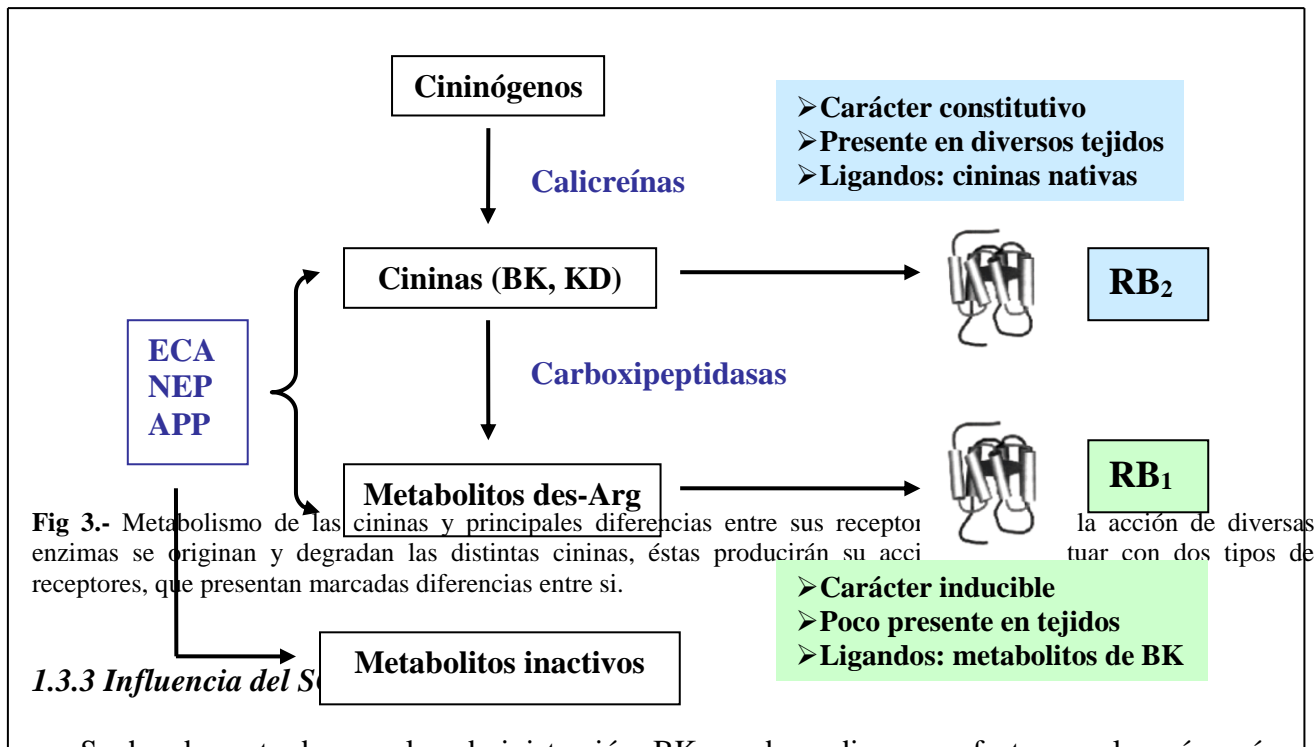


Fig 3.- Metabolismo de las cininas y principales diferencias entre sus receptores. Las cininas se originan y degradan por las distintas enzimas, éstas producirán su acción al unirse a los receptores, que presentan marcadas diferencias entre sí.

1.3.3 Influencia del Sistema Renin-Angiotensina

Se ha demostrado que la administración BK produce diversos efectos en las vías aéreas incluyendo broncoconstricción, aumento de la secreción, estimulación de fibras sensoriales y colinérgicas, tos y edema. Esta serie de respuestas se ha atribuido a la participación de diversos agentes como metabolitos del ácido araquidónico generados por la COX, TNF α , tromboxano A₂ y factor de activación plaquetaria entre otros, todos ellos inducidos en forma directa o indirecta por la acción de BK.^{30,31}

En pacientes asmáticos, la inhalación de BK produce una fuerte broncoconstricción atribuible a la actividad del RB₂BK debido a que agonistas específicos del RB₁BK no demostraron mayor actividad. También se ha descrito que tras la administración endovenosa de BK se desarrollaba broncoconstricción a nivel alveolar, coincidiendo este nivel con la ubicación de los receptores B₂ para BK^{30,31}. Sin embargo, se ha visto que las carboxipeptidasas, enzimas responsables de la formación de los agonistas del RB₁BK, se encuentran presentes durante los procesos alérgicos e inflamatorios del tracto respiratorio, además ciertas citocinas, como el TNF α e interleucina-1 β incrementan la expresión del RB₁BK en el tejido pulmonar humano^{31,32}, por lo que no se debe descartar por completo la participación del RB₁BK en la respuesta de las vías aéreas.

1.4 Medicamentos antihipertensivos inhibidores de la ECA (IECAs)

Los inhibidores de la ECA (IECAs) han sido utilizados por más de 20 años para el tratamiento de la HTA y patologías cardiacas, estos fármacos, al inhibir la ECA impiden la formación de ANG II, estimulan la transformación de la ANG I a ANG(1,7) y además, aumentan la acumulación de cininas potenciando sus efectos hipotensores. Algunos de ellos, como el captopril, se unen a la enzima a través de su grupo sulfidrilo, otros como el fosinopril, ejercen su acción a través de un grupo fosfonilo, pero la mayoría presentan un grupo carbonilo como el enalapril.⁵

Entre los IECAs y los medicamentos antihipertensivos en general, uno de los fármacos más utilizados es el enalapril. En Chile, entre 1998-2001, fue el IECA más vendido a nivel de farmacias, con un consumo que varió entre 8,2 DDD/1.000 hab/día en 1998 y 10,4 DDD/1.000 hab/día en 2001, lo que significa que en el 2001, de cada 1.000 habitantes, cada día, 10 habitantes recibieron una dosis diaria definida (DDD) de enalapril (10 mg).^{33,34}

Pese a los efectos benéficos y la eficacia que presenta este grupo de medicamentos, también poseen efectos adversos entre los que destacan la tos y el angioedema, efectos que se han atribuido a la acumulación de cininas.³⁵ El angioedema es un efecto adverso muy poco frecuente pero de gran importancia debido a su peligrosidad, se ha asociado a una menor degradación de des-Arg⁹-BK producto de la inhibición de la ECA.³⁷ La tos es el efecto adverso más frecuente de los IECAs pudiendo presentarse en el 20% y más de los pacientes que los consumen³² y en algunos casos, llevan a la suspensión del tratamiento. Los mecanismos por los cuales se genera la tos aún son desconocidos, pero se postula la participación de cininas sería relevante.^{38,39}

Estudios recientes proponen un nuevo modelo de acción para los iECAs mediante la activación directa de los RB₁BK por el fármaco que puede explicarse por la existencia en el segundo loop extracelular del RB₁ de una secuencia HEXXH que determina un sitio de unión a zinc. Esta secuencia se encuentra altamente conservada en el RB₁ de distintas especies y está presente en el sitio catalítico de algunas metalopeptidasas incluyendo la ECA, pero no se encuentra en el RB₂BK.^{40,41,42} Sumado a lo anteriormente expuesto, Hirata y col⁴³ observaron un aumento en la expresión de los RB₁ luego de la administración de enalapril por 30 días a un grupo de cobayos, aumento que se vio acompañado por la manifestación de tos. Al grupo en estudio se les administró inhibidores selectivos para los RB₁ y RB₂, observándose una disminución significativa del reflejo⁹ de la tos sólo con los inhibidores del RB₁.

Todos los antecedentes planteados sugieren que el RB₁BK tiene una participación importante en el desarrollo de tos producido por el uso de iECAs

1.5 Farmacogenómica

Hace aproximadamente 40 años que empezó a utilizarse el termino farmacogenética para referirse al estudio de la función que desempeña la variación de los genes individuales en la respuesta a los medicamentos. Sin embargo, el termino farmacogenómica es de origen mucho más reciente e involucra el estudio no de uno sino que de la globalidad de los genes farmacológicamente relevantes, así como de la forma en que dichos genes manifiestan sus variaciones y de qué manera estas variaciones pueden interaccionar para configurar el fenotipo de cada individuo produciendo respuestas distintas frente a los medicamentos⁴⁴. Dicho de otra forma, podemos definir la farmacogenómica como el análisis del genoma (DNA) y de sus productos (RNA y proteínas) y de cómo ellos regulan la respuesta a los medicamentos.⁴⁵ La cifra de los citados genes farmacológicamente relevantes actualmente se estima entre 500 a 1.000⁴⁴, sin embargo aun falta mucho que investigar sobre esta materia.

La variabilidad génica es la piedra angular que sustenta a esta ciencia floreciente, ésta es la que determina las diferentes respuestas que puede manifestar cierto grupo de individuos frente a un mismo medicamento en virtud a mutaciones en su ADN. Dichas mutaciones cuando tienen una prevalencia mayor o igual al 1% se denominan polimorfismos y pueden ser de varios tipos, tales como: 1) polimorfismo de un solo nucleotido (SNP) que se produce por el cambio de una base nitrogenada; 2) de inserción o deleción de una base; 3) por inserción o deleción de un conjunto de bases que pueden ser de cientos a miles y 4) por inserción o deleción, repetidas veces, de una o más bases, constituyendo los denominados microsatélites.^{44,46}

- **Administración**
- **Distribución**
- **Metabolismo**
- **Excreción**

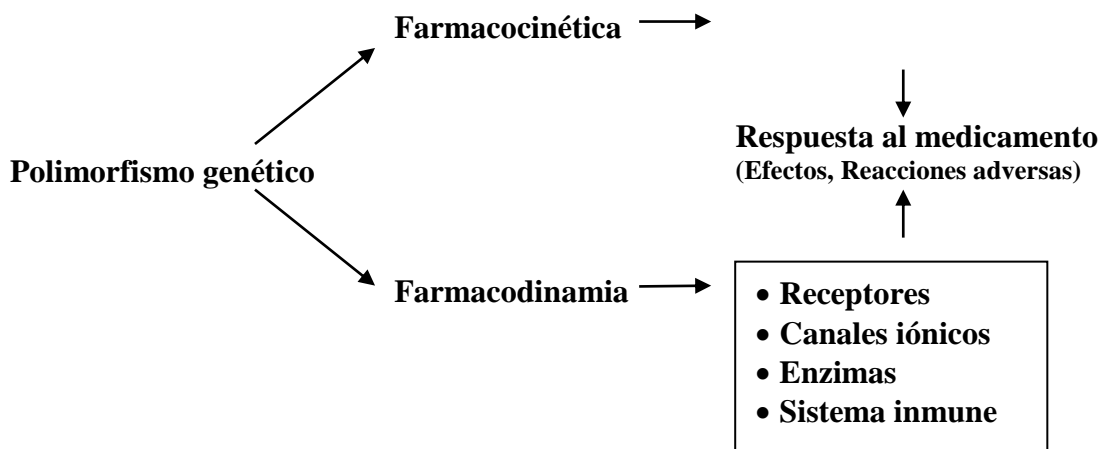


Fig. 4.- Influencia del polimorfismo genético en la respuesta al medicamento.

Un polimorfismo dado puede estar influyendo en la actividad farmacológica de cierto medicamento a cualquier nivel, ya sea en los procesos farmacocinéticos, como en los farmacodinámicos. El hecho de conocer las variantes genéticas y moleculares que determinarán la actividad farmacológica o tóxica de los medicamentos en un individuo, es la base para lo que hoy se conoce como *medicina personalizada*, donde según las características de cada paciente, se escogerá el medicamento más adecuado, a la dosis correspondiente, optimizando la eficacia y la seguridad del tratamiento.⁴⁴⁻⁴⁶

Se han identificado diversos polimorfismos en el SRA implicados en el desarrollo de estados patológicos y cambios en la actividad del sistema, algunos de ellos son la sustitución de metionina por treonina en codón 235 (M235T) que determina niveles mayores de angiotensinógeno⁴⁷; un polimorfismo de I/D en el gen de la ECA que determina casi un 50% de los niveles circulantes de ECA en distintas poblaciones, asociándose el alelo D a altos niveles de ECA y un posible aumento en la morbilidad cardiovascular y renal^{48,49} y en el gen del receptor AT1 para angiotensina II, se conoce un polimorfismo A/C en posición 1166, pero aún no se sabe sus efectos funcionales.⁵⁰

Respecto al RB₂BK se ha confirmado la existencia de tres polimorfismos en su gen, Uno es de inserción/delección en que los alelos se diferencian por 9 pb delección (-) versus la secuencia completa (+) donde el alelo negativo es más estable a la acción de Rnasas, aumenta el nivel de expresión y está presente en la deficiencia del inhibidor C1 (angioedema hereditario).⁵¹ Otro¹¹

polimorfismo T58C, el cual se ha asociado a presencia de tos⁵². y el último es el polimorfismo C181T que se encuentra ubicado en el exón 2.⁵³

1.6 Polimorfismo G-699C en el sitio promotor del RB₁BK

Este polimorfismo corresponde al más frecuente de los dos existentes en el RB₁ y se le ha atribuido una participación relativa en la protección renal. Consiste en la sustitución de una G por una C (G-699C) en la región promotora y determina un aumento significativo en la actividad de esta región.^{26,54-56}. Es importante mencionar que nunca se ha estudiado la relación entre este polimorfismo y la tos inducida por IECAs. Como se mencionó anteriormente existen evidencias de la acción directa del fármaco sobre los RB₁BK, también se ha demostrado la capacidad del enalapril para inducir la expresión de RB₁BK en traquea y laringe de cobayo, además en el mismo estudio se asoció este receptor, y no el RB₂, con la tos producida por el medicamento.

Desde este punto de vista, es de esperar que el aumento de la expresión del RB₁BK en aquellos individuos que presenten el alelo C del polimorfismo G-699C se vea también acompañado de un aumento en la manifestación de tos como efecto adverso al consumo de IECAs. Además, parece interesante investigar la posible relación entre los niveles plasmáticos de BK y la manifestación de tos en aquellos pacientes que consumen IECAs, a modo de proporcionar mayor conocimiento respecto a la etiología de esta reacción adversa, es por esto que en forma paralela, se elaboraron anticuerpos anti-ANG y anti-BK mediante protocolo de inmunización en conejo para ser utilizados en un estudio posterior. El detalle de su elaboración y los resultados obtenidos al respecto pueden ser consultados en el anexo adjunto.

2.- HIPOTESIS

La proporción de pacientes que desarrollan tos por el uso de enalapril es mayor cuando presentan el polimorfismo G-699C en el sitio promotor del gen para el receptor B1 de bradicinina.

3.- OBJETIVOS GENERALES

- Asociar el polimorfismo G-699C del sitio promotor del gen del receptor B1 de bradicinina con el desarrollo de tos producida por enalapril.

4.-OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Caracterizar a la población estudiada en cuanto a sexo, grupo étnico, grado de tos y categoría de riesgo cardiovascular.
- Determinar genotipos y frecuencias alélicas del polimorfismo G-699C del receptor B1 de bradicinina.
- Determinar la frecuencia con que se produce tos en dicha muestra.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Equipos

Termociclador Gene Cyler Bio-Rad, Transluminador Vilber Lourmat, cámara vertical para geles de poliacrilamida, centrífuga Heraeus Suprafuge 220, Speedvac

5.1.2 Herramientas

Para gestionar la inclusión de los pacientes al estudio se diseñaron tres tipos de herramientas utilizadas por el equipo de investigación que consistieron en:

- Informativo destinado al equipo médico, que incluía los criterios de inclusión y exclusión de manera que el profesional discriminara en forma segura, en el momento de la consulta, si el paciente podía participar en el estudio.
- Consentimiento informado aprobado por la comisión de ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, donde se especificaba el objetivo de la investigación, y la participación del paciente. Este consentimiento fue leído y posteriormente firmado por cada una de las personas que se incluyeron en el estudio.
- Ficha especialmente diseñada para el estudio en la cual se recolectaron los datos más relevantes del paciente, en lo que respecta a la investigación.

5.1.3 Materiales utilizados para la toma de muestra

Tubos Vacuteiner estériles de 5ml tratados con EDTA, jeringas de 10 ml, algodón, alcohol 96°, tela adhesiva, guantes quirúrgicos.

5.1.4 Reactivos utilizados en la determinación del polimorfismo

La enzima Taq polimerasa, dNTPs, cloruro de magnesio, y PCR Buffer 10 x se obtuvieron en Invitrogen.

La enzima de restricción Aci I, y el NEBuffer 3 se obtuvieron de BioLabs.

El marcador de ADN de 100pb se obtuvo de Winkler T.

Los partidores utilizados para la amplificación del polimorfismo G-699-C fueron sintetizados por Invitrogen y consistieron en:

Partidor 1.- 5'-AGGGAACACAAGCAAAAGGC-3'

Partidor 2.- 5'-CCAAGTGAAGGCCCTTAC-3'

Soluciones stock

- Partidor G-699C: mezcla compuesta por ambos partidores a una concentración de 2.5 μ M cada uno en agua nanopura.
- dNTPs: mezcla formada por dATP, dGTP, dCTPy dTTP, todos ellos diluidos en agua nanopura a una concentración de 10 mM.
- Cloruro de magnesio: solución acuosa 50 mM de MgCl₂.
- PCR Buffer 10x: solución tampón proporcionada por el proveedor.
- Taq polimerasa: 5 unidades de enzima por cada μ L.
- Aci I: 10,000 unidades de enzima por cada ml.
- NEBuffer 3x: solución tampón pH 7.9 proporcionada por el proveedor compuesta de NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM y DTT 1 mM.

5.1.5 Reactivos utilizados en la elaboración de anticuerpos

- Buffer borato pH 10
- KLH: hemocianina de loco 200 mg/ml (Blue carrier) proporcionado por Biosonda, N° catálogo BC-01
- Glutaraldeído Merck 25% desde el cual se preparo una solución al 0.3%
- Glicina 1M
- Suero fisiológico (NaCl 0,9%) estéril.
- Los péptidos utilizados para la formación de los antígenos (N-Ac-Lys⁹-ANG II y N-Ac-Lys⁹-BK 1-7) fueron sintetizados por Invitrogen
- El coadyuvante de Freund completo e incompleto fue obtenido de Invitrogen
- Todos los otros reactivos como sales, ácidos, compuestos orgánicos, inorgánicos, y solventes fueron de grado analítico y obtenidos en Merck.

5.2.- Métodos

Para determinar los genotipos y frecuencias alélicas del polimorfismo G-699C en el receptor B1 de bradicinina se realizó un estudio de casos y controles. Los casos fueron aquellos pacientes que habían desarrollado tos como efecto adverso al estar en tratamiento con este medicamento y los controles comprendieron aquellos pacientes que no presentaron tos.

5.2.1 Criterios de selección de pacientes

Criterios de inclusión para los casos:

- Pacientes con hipertensión arterial esencial, de ambos sexos.
- Mayores de 18 años.
- Con antecedentes de haber presentado tos por enalapril, que haya motivado la suspensión del medicamento. La tos debió haber desaparecido dentro de las cuatro semanas después de suspendido el fármaco.
- En tratamiento actual con enalapril y que haya desarrollado tos en ausencia de otras causas.

Criterios de inclusión para los controles:

- Pacientes con hipertensión arterial esencial de ambos sexos.
- Mayores de 18 años.
- Pacientes en tratamiento con enalapril por al menos tres meses y que no hayan presentado tos.

Los criterios de exclusión fueron:

- Pacientes con daño pulmonar, tales como, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, secuelas de enfermedades pulmonares crónicas (silicosis y tuberculosis), cáncer pulmonar, tabaquismo severo y alergias que comprometan el aparato respiratorio.
- Pacientes con infección respiratoria aguda.
- Pacientes con insuficiencia cardiaca descompensada (capacidad funcional III y IV).
- Pacientes con insuficiencia renal con creatininemia mayor o igual a 2,0 mg/dl, y en diálisis.

5.2.2 Toma de muestra y recopilación de datos.

Los pacientes fueron reclutados en el Policlínico de Cardiología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. El médico guiado por los criterios de inclusión y exclusión, decidió que pacientes podían participar en el estudio. Tras la aprobación del médico tratante, el paciente fue guiado a un box contiguo, donde se le explicó el objetivo del estudio y su participación, haciendo referencia a los profesionales encargados de la investigación y entregándoles el consentimiento informado para que lo firmasen, además se les realizó una entrevista personal para terminar de completar los datos que ya habían sido revisados el día anterior a la consulta desde la ficha clínica del paciente.

Para aquellos pacientes que aceptaron participar en el estudio, una enfermera del Hospital Clínico de la Universidad de Chile tomó una muestra de 10ml de sangre venosa periférica que luego fueron llevados a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Unidad de Farmacogenómica, almacenándolas a 4°C para la posterior extracción del ADN genómico.

La severidad de la tos fue evaluada según los criterios del equipo clínico y la percepción del propio paciente. Al respecto se determinaron tres grados de severidad:

- Grado 1: el paciente presenta solo carraspera que puede estar acompañada por episodios esporádicos de tos.
- Grado 2: el paciente presenta tos seca de frecuencia intermedia, que por lo general aumenta en la noche
- Grado 3: la tos se hace más severa, es de mayor frecuencia, disminuyendo la calidad de vida del paciente y llevando incluso a la suspensión del tratamiento.

5.2.3 Aislamiento y cuantificación del ADN cromosomal

El ADN se aisló usando el método de precipitación por NaCl, este método consiste en la hemólisis y posterior centrifugación de la muestra de sangre para separar los glóbulos rojos del plasma y poder extraer el DNA presente en los núcleos de las células de la serie blanca mediante la utilización de medios de lisis mas enérgicos. Una vez que el ADN ha sido separado con cloruro de sodio, se precipitó con acetato de sodio y etanol frío y luego fue resuspendido con solución TE.

La concentración del DNA resultante fue determinada espectrofotométricamente en cubetas de cuarzo a partir de la absorbancia a 260 nm utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de ADN } (\mu\text{g/ml}) = (\text{Abs}_{260}) \times (50) \times (\text{factor de dilución})$$

Debido a que los aminoácidos aromáticos absorben a 280nm, la pureza del ADN se evalúa a través de la fórmula: $(\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}) > 1.6$, tomándose un valor óptimo entre 1.8 y 2.0 para esta relación.

5.2.4 Determinación del polimorfismo G-699C en el sitio promotor del *RB₁BK*

Para determinar la relación existente entre el polimorfismo G-699-C del receptor B1 de bradicinina y la tos producida por enalapril se utilizó la metodología descrita por Bachvarov y col⁵³ mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar la zona de interés. Esto involucró la manipulación de los siguientes elementos: Buffer PCR 1x, MgCl₂ 1.5 mM, deoxinucleótidos trifosfatos (dNTP) 200 μM, Taq polimerasa 1UI, partidores específicos para la zona a amplificar: primer 1. 5` - AGG GAA CAC AAG CAA AAG GC – 3` primer 2. 5` - CCA ACT GAA GGC CCC TTA C – 3` y DNA (50 a 300ng).

Se programaron los ciclos de temperatura iniciando con 3 minutos a 95°C para producir la denaturación de la doble hebra de DNA cromosomal seguido por 36 ciclos de:

- 1) 94°C por 1 min para denaturación del DNA..
- 2) 60°C por 1 min para alineación de los partidores.
- 3) 72°C por 1 min para extensión.

Finalizando con 10 minutos a 72°C.

Los productos de la amplificación se trataron con una enzima de restricción específica (ACI 1). Luego de la digestión, se observó una banda a los 191 bp para el genotipo GG, en el genotipo CC se producen dos cortes uno a los 135bp y otro a los 56bp, por lo tanto los heterocigotos (genotipo GC) mostraron las tres bandas. Los distintos genotipos se visualizaron en transluminador UV con bromuro de etidio luego de ser separados por cromatografía en geles de poliacrilamida al 8.5%.

Protocolo para la amplificación del polimorfismo G-699C

Se preparó una solución madre con una concentración de 150 mM para cada uno de los partidores y luego, mediante dilución de la solución madre, se elaboró la solución de trabajo que contenía una mezcla de ambos partidores, cada uno con concentración de 2.5 μ M.

Para realizar la amplificación del DNA previamente extraído, se estandarizaron diferentes protocolos con el objeto de calcular las concentraciones óptimas de magnesio y partidores, las cuales se confirmaron al observar los resultados en gel de poliacrilamida al 8%, además también se estandarizó la cantidad de enzima de restricción a utilizar en la digestión.

Una vez calculadas las condiciones óptimas para realizar la amplificación, se procedió a elaborar un cóctel que contenía los diferentes reactivos necesarios, en cantidades que variaban según el número de muestras, tal como se expone a continuación:

Reactivos	Número de muestras						
	1x(μ l)	2x(μ l)	3x(μ l)	4x(μ l)	5x(μ l)	10x(μ l)	20x(μ l)
Buffer 10x	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	25,0	50,0
MgCl ₂	0,3	0,6	0,9	1,2	1,5	3,0	6,0
DNTPs 10mM	0,15	0,3	0,45	0,6	0,75	1,5	3,0
Partidor 2.5 μ M	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	20,0	40,0
Taq polimerasa	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	2,0	4,0
Agua nanopura	15,85	31,7	47,55	63,4	79,25	158,5	317,0
Volumen total	24,0	48,0	72,0	96,0	120,0	240,0	480,0

Para realizar la amplificación se mezclaron en vortex cada uno de los reactivos en volúmenes de acuerdo con el número de muestras a utilizar en un tubo eppendorf, teniendo cuidado de agregar en último lugar la enzima polimerasa y sin retirarla demasiado del sitio de almacenaje a -20°C para evitar la denaturación de ésta, además se agregó 1 μ l de suspensión del DNA extraído desde la sangre periférica de los pacientes en tubos de PCR de 200 μ l que fue mezclado con 24 μ l del cóctel de amplificación elaborado previamente, llevando la solución a un volumen total de 25 μ l. Cada uno de los tubos de PCR fue llevado a un termociclador donde se programaron los ciclos de temperatura. Una vez finalizado el PCR se separaron 15 μ l de la solución amplificada y se mezclaron con 5 μ l de solución Stop Mix para ser llevados a un gel de poliacrilamida al 8% (p/v)

con el objeto de verificar el proceso de amplificación mediante electroforesis en TBE 0.5x, el gel fue teñido con bromuro de etidio y las bandas de amplificación se visualizaron en un transluminador ultravioleta a los 191 pb.

Protocolo para la digestión del polimorfismo G-699C del RB₁BK

Para determinar los genotipos de este polimorfismo fue necesario el uso de la enzima de restricción Aci I que poseía el siguiente sitio de reconocimiento:



Como se muestra en el siguiente esquema se preparó un cóctel de digestión de acuerdo al número de muestras a digerir.

Reactivos	Número de muestras						
	1x(μl)	2x(μl)	3x(μl)	4x(μl)	5x(μl)	10x(μl)	20x(μl)
Amplificado	10	20	30	40	50	100	200
Neb buffer	2	4	6	8	10	20	40
Aci I	1	4	3	4	5	10	20
H ₂ O	7	14	21	28	35	70	140
Volumen tot.	20	40	60	80	100	200	400

Una vez confirmada la amplificación mediante electroforesis, se tomaron 10 μl del amplificado y se mezclaron con los distintos reactivos señalados en el esquema, la enzima de restricción debió agregarse en último lugar, al igual que la Taq polimerasa en el proceso de amplificación, y sin retirarla demasiado de la zona de almacenaje.

La mezcla del cóctel de digestión más el amplificado se dejó toda la noche a 37°C, posteriormente el producto de la digestión se mezcló con 5μl de Stop Mix y se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% en TBE 0.5x

5.2.5 Elaboración de anticuerpos

Conjugación de péptidos con KLH a través de glutaraldehído

En un frasco de vidrio pequeño, se agregaron 16 µl del stock de 200 mg/mL de KLH y 48.66µl de una solución al 2% p/v de N-Ac-Lys⁹-ANG II o bien, 43µl de N-Ac-Lys⁹-BK 1-7 a la misma concentración (KLH:péptido 1:100). Luego se agregaron 0,5 mL de buffer borato (pH 10) y se disolvió mezclando suavemente con un pequeño agitador.

En forma muy pausada se agregaron 1,2 mL de preparado fresco de solución de glutaraldehído 0,3% mientras se agitó constantemente a temperatura ambiente por 2 horas. Luego se agregaron 0,25 mL de glicina 1M para bloquear el glutaraldehído libre (la solución se vuelve amarilla) y se dejó reaccionar durante 1 hora más sin dejar de agitar.

Posteriormente se completó un volumen de 3 ml mediante la incorporación de suero al conjugado y se dializó en un cassette de diálisis Pierce de 10.000 mwco obtenido de Biosonda, contra 1 litro de solución de suero fisiológico 0,9% en un vaso de precipitado con agitador magnético durante toda la noche a 4°C.

El antígeno obtenido fue repartido para cuatro conejos.

Protocolo de inmunización

Se obtuvieron 8 Hembras de conejo New Zealand en el Instituto de Salud Pública y se mantuvieron en el bioterio de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Se repartieron en dos grupos, cada uno constituido por 4 conejos, inmunizándose cada grupo con el antígeno obtenido por la conjugación con glutaraldehído.

El protocolo de inmunización, consistió en la obtención del suero preinmune el primer día. Para realizar la primera inmunización se mezcló el conjugado con coadyuvante de Freund completo y se inyectaron al conejo vía intradérmica. Dos semanas después se realizó la segunda inmunización, pero esta vez con coadyuvante incompleto de Freund. Al realizar la tercera inmunización se obtuvo la primera sangre inmune extrayendo de la oreja del conejo 3 ml de sangre para medir el título de anticuerpo a través de RIA. Se siguió inmunizando cada dos semanas hasta llegar a un título de anticuerpo adecuado para realizar la sangre a blanco.

Al momento de realizar la sangría final, se extrajo la mayor cantidad posible de sangre por la vena de la oreja, previa aplicación de anestesia al animal para evitar complicaciones y optimizar el tiempo. Una vez que no existió más flujo sanguíneo por esta vía, el conejo se abrió mediante incisión abdominal y se punzó la arteria renal con una jeringa gruesa, intentando sacar la mayor cantidad de sangre antes que comenzara la coagulación. También se utilizó una micropipeta p1000 con las puntas cortadas para sacar los coágulos. Una vez agotada la arteria renal, se siguió probando con vasos de grueso calibre.

La sangre se dejó en tubos de centrifuga 10 minutos a temperatura ambiente y otros 10 a 4°C para provocar la retracción del coágulo, luego el coágulo se despegó de las paredes del tubo mediante la utilización de pipeta Pasteur previamente flameada y se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos a 4°C. El suero se separó del precipitado y se guardó a -20°C.

5.2.6 Expresión de resultados y análisis estadístico

Para evaluar la relación entre la presencia del polimorfismo en los casos y la manifestación de tos como reacción adversa, se utilizó la prueba de chi-cuadrado. Dicha prueba estadística también fue usada para verificar la asociación entre diversas características presentes en los casos como: sexo, dosis de enalapril y grado de tos, considerándose como significativos aquellos resultados que presentaron un valor de $p < 0.05$.

Se utilizó la ecuación de Hardy-Weinberg ($p^2+2pq+q^2$) para evaluar el equilibrio poblacional en la muestra estudiada, considerándose valores cercanos a 1 característicos de una población que ha alcanzado un estado de inercia evolutiva.

Algunos de los resultados se expresaron en porcentajes y otros como promedio \pm desviación estándar ($x \pm DS$).

6.- RESULTADOS

6.1 Caracterización de los pacientes

Se reclutó un total de 263 pacientes de los cuales 139 fueron casos y 124 fueron controles. Como se muestra en la Tabla 1 en el grupo de los hombres se observó una mayor cantidad de controles (47 pacientes v/s 34 para los casos). La mayor cantidad de pacientes fueron de sexo femenino con un 69,6%, además la proporción de mujeres en los casos fue significativamente mayor ($p = 0,018$).

Con respecto a la distribución de edad para casos y controles (*Tabla 2*), se pudo observar gran similitud para ambos grupos al igual que para la distribución según sexo, encontrándose que la edad promedio para el total de los pacientes presentó un valor superior a los 63 años ($63,8 \pm 10,4$).

Cabe destacar que pese al amplio margen que muestra el rango de edades en la tabla, la mayor cantidad de pacientes se distribuyó entre los 60 a 80 años.

Los valores promedio para todos los pacientes en cuanto a peso, talla e IMC agrupados según sexo se muestran en la *Tabla 3*. Al respecto, las mujeres presentaron un IMC muy similar al observado en los varones ($28,4 \pm 4,9$ y $27,9 \pm 4,4$ respectivamente) y podemos apreciar que el valor promedio del IMC para el total del grupo corresponde al rango de sobrepeso.

Tabla 1. Distribución de casos y controles según sexo.

Sexo	Tipo de pacientes		Total
	Casos	Controles	
Hombres	34 (24,5%)	47 (37,9%)	81 (30,8 %)
Mujeres	105 (75,5%)	77 (62,1%)	182 (69,2%)
Total	139 (52,9%)	124 (47,1%)	263 (100%)

$$\chi^2 = 5,557; \text{ g.l} = 1; \text{ p} = 0,018$$

Las columnas muestran el número de pacientes para casos y controles, mientras que las filas determinan la cantidad de pacientes según sexo. Los valores incluidos entre paréntesis, corresponden al porcentaje de los totales parciales de cada columna y al porcentaje del total absoluto para los valores parciales.

Tabla 2. Promedio de edad para casos y controles.

Pacientes	Edad promedio \pm DS		
	Hombres	Mujeres	Total
Casos	63,1 \pm 10,2	64,5 \pm 9,6	64,2 \pm 9,7
Controles	66,0 \pm 9,4	61,8 \pm 11,8	63,4 \pm 11,1
Total	64,8 \pm 9,8	63,4 \pm 10,6	63,8 \pm 10,4
Rango de edad	41-82 años	32-87 años	32-87 años

La tabla muestra la edad promedio \pm desviación estándar de los pacientes agrupada según sexo y criterios de inclusión. El rango de edad muestra los valores extremos de las edades para cada grupo y para el total.

Tabla 3. Caracterización según peso, estatura e IMC.

Parámetros	Promedio \pm DS		
	Hombres	Mujeres	Total
Peso (Kg)	77,1 \pm 12,4	69,6 \pm 12,6	71,9 \pm 12,9
Estatura (m)	1,6 \pm 7,2	1,6 \pm 8,6	1,6 \pm 8,6
IMC (Kg/m ²)	27,9 \pm 4,4	28,4 \pm 4,9	28,3 \pm 4,7

La tabla muestra los valores de peso, talla e IMC \pm desviación estándar agrupados según sexo. El IMC fue calculado utilizando la fórmula peso/estatura².

6.2 Frecuencia y grado de la reacción adversa

En la *Tabla 4* se puede apreciar el grado de tos producido por el consumo de enalapril. Se observa que los valores finales para el total de los casos demuestran una mayor tendencia a presentar tos en grado 3, sin embargo cabe destacar que la proporción de mujeres con tos en ese mismo grado fue significativamente más alta a la presentada por los hombres que mostraron mayor tendencia a la manifestación de tos en grado 1. Por otra parte tanto para hombres como para mujeres, la tos con severidad grado 2 incluyó la minoría de los pacientes abarcando solamente alrededor del 18% del total.

La relación entre el grado de tos y la dosis recibida de enalapril al día en los casos se muestra en el *Gráfico 1*, apreciándose que la dosis más frecuentemente usada por los casos fue de 20 mg/día (72%), seguida por 40mg/día (13,6%). Las dosis de 50, 60 y 80mg/día no se consideraron debido a que fueron utilizadas por un paciente en cada caso, los cuales mostraron tos en grado 2, 1 y 3 respectivamente.

La presencia de tos con grado 3 representó un porcentaje importante para todas las dosis mostradas en el gráfico, exceptuando la dosis de 30mg donde no se encontró, posiblemente por la baja cantidad de pacientes que recibió esta dosis.

Un total de 17 pacientes que recibían dosis de 20mg/día tuvieron que suspender el medicamento debido a la manifestación de tos en grado máximo, al igual que 5 pacientes que recibían dosis de 40 mg/día.

Las diferencias encontradas entre el grado de severidad del efecto adverso y la dosis de enalapril, no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,346$).

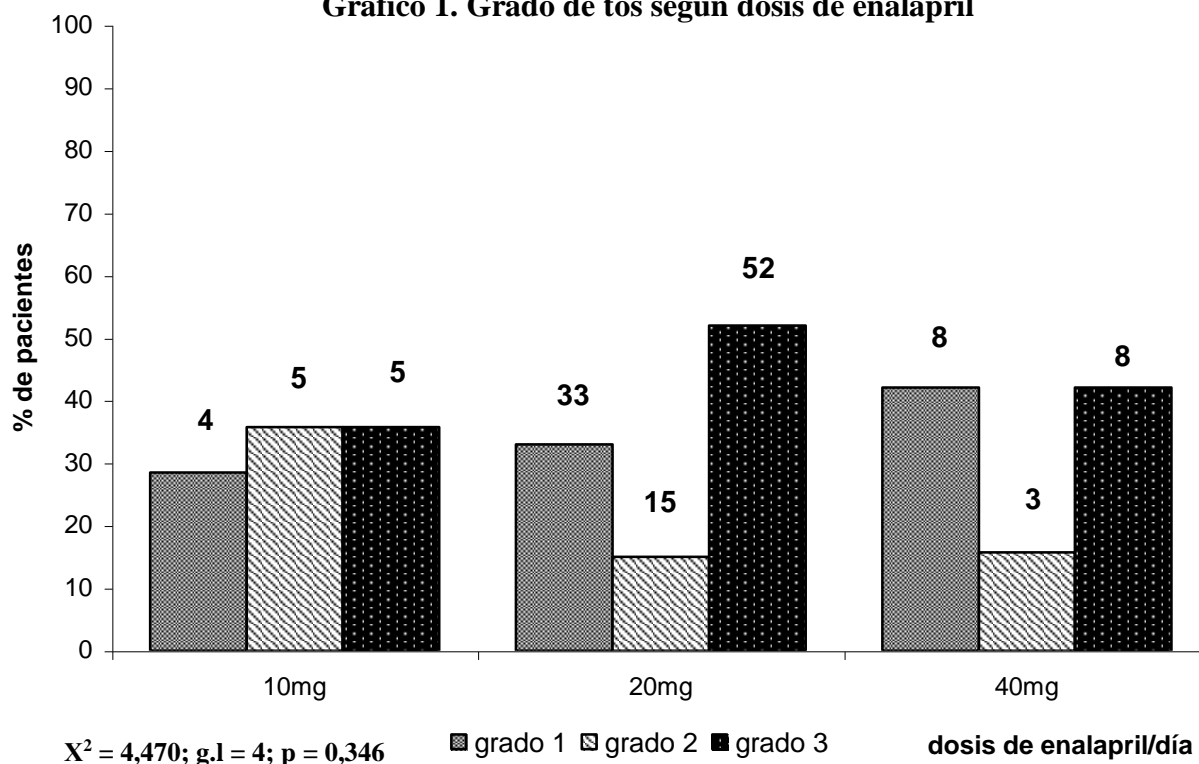
Tabla 4. Grado de tos en casos

Grado de tos	N° de pacientes		
	Hombres	Mujeres	Total
1	17 (50,0%)	31 (29,5%)	48 (34,5%)
2	7 (20,6%)	18 (17,2%)	25 (18,0%)
3	10 (29,4%)	56 (53,3%)	66 (47,5%)
Total	34	105	139

$\chi^2 = 6,383; g.l = 2; p = 0,041$

Esta tabla fue elaborada a partir de los datos obtenidos del grupo casos. Las columnas muestran la cantidad de pacientes agrupados según sexo y las filas indican el grado de tos, los valores entre paréntesis corresponden al porcentaje para el total de cada columna.

Gráfico 1. Grado de tos según dosis de enalapril



El gráfico muestra el grado de tos asociado a la dosis de enalapril. Las distintas barras de cada grupo (de izquierda a derecha), indican el porcentaje de pacientes que manifestó tos en grado 1, 2 y 3 a la dosis diaria de enalapril indicada en la parte inferior. Sobre cada barra se encuentra indicada la cantidad de pacientes contándose un total de 14, 100 y 19 pacientes para las dosis de 10, 20 y 40 mg/día respectivamente.

6.3 Determinación del polimorfismo G-699C en el RB₁BK

Una vez establecidas las condiciones adecuadas, se procedió a realizar la amplificación y digestión de las muestras, para determinar la presencia del polimorfismo en los pacientes.

Luego de realizar la digestión, la hebra de DNA amplificada es cortada en distintas secciones por acción de la enzima de restricción, siempre y cuando exista la zona de reconocimiento para esta enzima, lo cual involucra la presencia del polimorfismo en al menos uno de los dos alelos. Las bandas de menor tamaño se desplazan más rápidamente por el gel ubicándose en la parte inferior de este, mientras que las de tamaño mayor se desplazan más lento y se ubican en zonas superiores del gel.

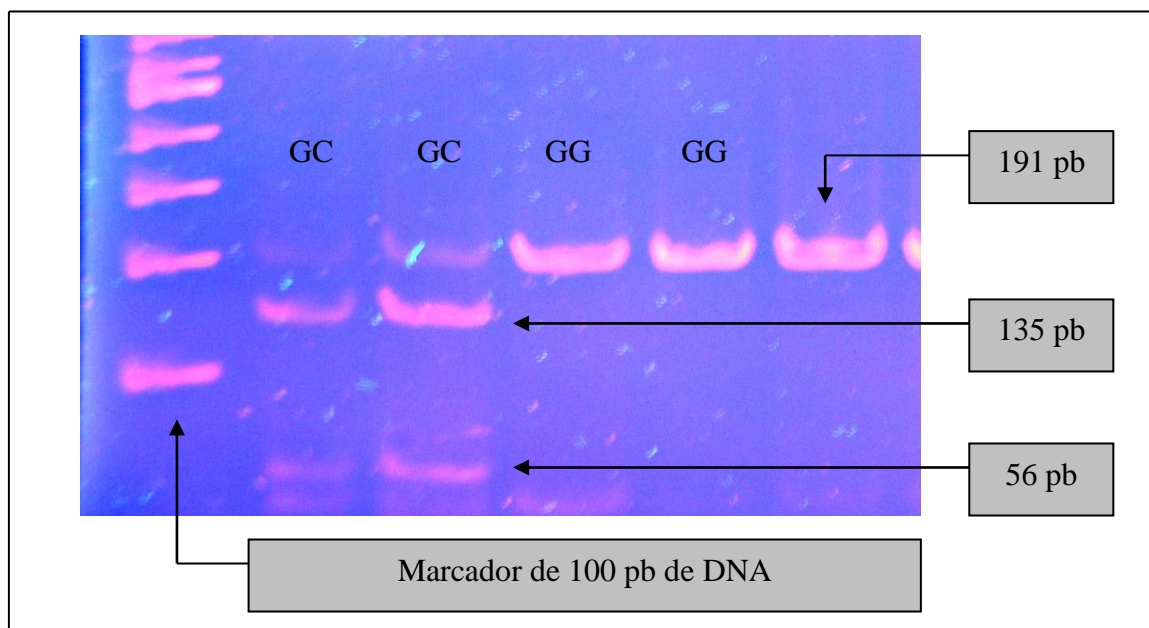


Fig. 5.- Digestión con enzima AciI en gel de poliacrilamida al 8%.

Como se observa en la figura 6, luego de la digestión, electroforesis y posterior tinción con bromuro de etidio del gel de poliacrilamida, las bandas se observan a los 191 pb para el genotipo GG (homocigoto silvestre) y con tres bandas a los 191, 135 y 56 pb para el genotipo GC (heterocigoto). El genotipo CC (homocigoto mutado o polimórfico) debiera presentar 2 bandas a los 135 y 56 pb, pero en la figura no se muestra debido a que no se encontró este genotipo en el estudio.

6.4 Genotipos del polimorfismo G-699C del RB₁BK

En la *tabla 5* se muestra la distribución genotípica para este polimorfismo, apreciándose la gran diferencia encontrada en los porcentajes para el homocigoto silvestre GG (93,53%) que prácticamente abarcó la totalidad del grupo y el heterocigoto GC que figura con un modesto 6,5%.

Los porcentajes de la frecuencia alélica para casos y controles se muestran en la *tabla 6*, como era de esperar el alelo G representó la gran mayoría del porcentaje encontrándose con una frecuencia mayor en los casos (50,8%) que en los controles (46,0%), el alelo C se encontró más distribuido en los casos y representó apenas el 3,2% del total.

Al observar la *tabla 7* se distingue que el porcentaje obtenido para el genotipo GC es más bajo en comparación con otros estudios, además se puede observar que el genotipo CC para la población Canadiense y Alemana se encuentra en una muy pequeña proporción.

El valor de la ecuación de Hardy-Weinberg para este estudio dio el siguiente resultado:

$$p^2+2pq+q^2 = (0,9676)^2 + 2(0,9676)(0,0324) + (0,0324)^2 = 1,00$$

Esto nos indica que existe una situación de equilibrio evolutivo entre las frecuencias alélicas para la población estudiada.

Tabla 5. Distribución genotípica para el polimorfismo G-699C del RB₁BK

G-699C	Genotipos		
	GG	GC	Total
Casos	128	11	139 (52,8%)
Controles	118	6	124 (47,2%)
Total	246 (93,5%)	17 (6,5%)	263

$$\chi^2 = 1,025; \text{ g.l} = 1; \text{ p} = 0,311$$

La tabla muestra la distribución encontrada para los genotipos del polimorfismo G-699C, según criterios de inclusión. El genotipo CC no se muestra debido a que no fue encontrado en ninguno de los pacientes que participaron en el estudio.

Tabla 6. Distribución de la frecuencia alélica del polimorfismo G-699C

G-699C	Alelo G	Alelo C	Total (%)
Casos	50,8%	2,1%	52,8
Controles	46,0 %	1,1%	47,2
Total (%)	96,8	3,2	100

El total de cada columna muestra la frecuencia de los alelos en porcentaje, las filas permiten apreciar el aporte de los dos grupos de estudio a la frecuencia alélica.

Tabla 7. Comparación de la distribución genotípica obtenida con otros estudios

Muestra	Genotipos			n
	GG	GC	CC	
Chilena	246 (93,5%)	17 (6,5%)	—	263
Canadiense ⁱ	296 (76,1%)	88 (22,6%)	5 (1,3%)	389
Alemana ⁱⁱ	938 (81,8%)	200 (17,4%)	9 (0,8%)	1147

Los datos incluidos como muestra canadiense y alemana, fueron obtenidos de dos estudios distintos que tenían como objetivo demostrar los efectos del polimorfismo G-699C sobre un grupo de pacientes con enfermedad renal. La distribución genotípica mostrada en ambas investigaciones, fue comparada con la distribución en la muestra chilena obtenida en el presente estudio.

ⁱ Bachvarrov et al. (55)

ⁱⁱ Knigge et al. (56)

7. DISCUSIÓN

Los medicamentos inhibidores de la ECA (iECAs) son ampliamente utilizados para el tratamiento de la Hipertensión y patologías cardiacas, entre estos destaca el uso de enalapril siendo el más consumido en Chile (33,34).

Pese a los efectos benéficos que presentan este grupo de medicamentos, al igual que otros fármacos también poseen efectos adversos, siendo la tos el más frecuente pudiendo presentarse en más del 20% de los pacientes y disminuyendo la calidad de vida en tal grado que incluso pueden llevar a la suspensión del tratamiento. Los efectos por los cuales se produce esta reacción adversa aun no han sido esclarecidos pero se sospecha que la acumulación de cininas estaría relacionada (38,39).

El polimorfismo G-699C en el sitio promotor del receptor B₁ de bradicinina produce un aumento en la actividad promotora del gen, por otro lado se demostró un aumento en la expresión del receptor B₁ en modelos animales tras la administración de enalapril, asociándose la tos a este receptor y no al receptor B₂, también se ha postulado un nuevo modelo de acción para los iECAs en el que éstos actuarían directamente sobre el receptor B₁ y se ha descrito que en los procesos alérgicos e inflamatorios de las vías respiratorias aumentan los niveles de carboxipeptidasas, enzimas responsables de la síntesis de los agonistas endógenos del RB₁BK (31,32,40-42,43).

Todos estos antecedentes motivaron a especular sobre la posible participación de este polimorfismo en la producción de tos como efecto adverso al tratamiento con enalapril. Para determinar si esta relación se cumplía se realizó un estudio de casos y controles donde se reclutaron pacientes hipertensos en tratamiento con enalapril de los cuales se obtuvo una muestra de sangre periférica para determinar los genotipos y frecuencias alélicas de este polimorfismo, los pacientes también fueron caracterizados en cuanto a sexo edad y grado de tos.

Cabe destacar que para este estudio los pacientes no fueron randomizados, sin embargo, se determinaron cuidadosamente los criterios de inclusión para casos y controles, descartando que las probabilidades y condiciones relacionadas con la manifestación de tos, fueran distintas a la provocada por el medicamento.

Las mujeres representaron alrededor del 70% del total, además también constituyeron la gran mayoría de los casos (75.54%) presentando una clara tendencia a la manifestación de tos en grado 3 ($p = 0.041$), sin embargo, existe la probabilidad que estos resultados se deban a la mayor proporción de mujeres incluidas en el estudio.

La dosis diaria más utilizada de enalapril fue la de 20mg/día, abarcando el 72% de los casos, seguida por 40 y 10 mg/día. No se encontró relación entre el grado de tos y la dosis diaria de enalapril ($p = 0.346$), además del total de los casos, 25 suspendieron el medicamento por la presencia del efecto adverso.

Se comparó la distribución genotípica del polimorfismo G-699C obtenida, con estudios realizados en Canadá y Alemania, observándose una distribución más baja del genotipo GC para la muestra analizada. El genotipo CC no fue encontrado en ningún paciente, es esto no resulta tan extraño si se compara con las frecuencias obtenidas en otros estudios donde apenas bordea el 1% y donde el número de pacientes, para ambos estudios, fue mayor.

Pese a los antecedentes antes mencionados y en concordancia con la baja frecuencia (0.0324) encontrada para el alelo C de este polimorfismo, no se encontró relación entre la manifestación de tos producida por el consumo de enalapril y la presencia del polimorfismo G-699C en el sitio promotor del receptor B₁ de bradicinina ($p = 0.311$), descartándose la participación de éste en el desarrollo del efecto adverso.

En forma paralela a la determinación del polimorfismo G-699C, se realizó la elaboración de anticuerpos policlonales para la determinación, en un estudio futuro, de los niveles plasmáticos de ANG y BK. Al respecto, la mitad de los conejos asignados a cada grupo presentaron una respuesta satisfactoria frente a la inoculación con el antígeno, mostrando niveles finales de anticuerpo adecuados. Cabe destacar lo variable que puede ser esta respuesta dependiendo principalmente del sistema inmune del animal. Para reafirmar lo anteriormente dicho, basta sólo con analizar los distintos tiempos que tardó cada conejo en llegar a la sangría final tomando como ejemplo el conejo 1 (anticuerpo anti-ANG) que tardó 13 sangrías (26 semanas) y el conejo 6 (mismo anticuerpo) que demoró 24 sangrías (48 semanas) y presentó un título menor (anexo).

El presente estudio, a través de sus resultados, contribuyó a descartar la participación del polimorfismo G-699C en la manifestación de la reacción adversa antes descrita, además es importante mencionar, que la facilidad para encontrar pacientes que cumplieran con los criterios de inclusión para el grupo de casos, puede sugerir que la tos producto del consumo de enalapril, se presenta en una proporción mayor a la descrita en literatura.

Gracias a la caracterización de los pacientes pudieron conocerse las frecuencias alélicas del polimorfismo estudiado en una muestra de la población chilena y se cumplió con las expectativas propuestas para la elaboración de anticuerpos policlonales mediante protocolo de inmunización en conejos. Sin embargo los mecanismos y factores implicados en la manifestación de tos como efecto adverso al consumo de IECAs aún no han podido ser aclarados totalmente, dejando el desafío abierto para futuras investigaciones.

8. CONCLUSIONES

- No se encontró relación entre la presencia del polimorfismo G-699C del receptor B₁ de bradicinina y la manifestación de tos como efecto adverso al consumo de enalapril.
- No se encontró relación entre el grado de tos y la dosis diaria administrada de enalapril.
- Las mujeres representaron el 75.54% de los casos, manifestando una clara tendencia a desarrollar tos en grado 3.
- 25 pacientes (18% de los casos y 9.5% del total) debieron suspender la administración del medicamento debido a la manifestación de tos.
- La muestra analizada presentó una menor distribución del alelo C al compararla con dos estudios realizados en distintos países.
- Dos conejos de cada grupo lograron producir anticuerpos en niveles satisfactorios, esto demuestra que la preparación del antígeno y que el manejo de los animales fueron adecuados.

9. REFERENCIAS

1. Mizón C, Atalah E. Transición epidemiológica en Chile: lecciones aprendidas del proyecto North Karelia. *Rev. chil. nutr.* v.31 n.3 Santiago dic. 2004.
2. http://epi.minsal.cl/epi/html/invest/ENS/ENS_mayo2004.pdf, encuesta nacional de salud, Ministerio de Salud de Chile, año 2004, página consultada el 20 de septiembre del 2005.
3. Escobar M, Maíz A, Soto N, et al. Reorientación de los programas de hipertensión y diabetes, Ministerio de Salud de Chile, año 2002.
4. Lanas F, Del Solar J, Maldonado M, et al. Prevalencia de factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en una población de empleados chilenos. *Rev Méd Chile.* 2003; 131: 129-134.
5. Flóres J, Armijo J, Mediavilla A. *Farmacología humana*, 3ª edición, Masson S.A, Barcelona, 1998, pp: 343-348.
6. Kim S, Hiwao H. Molecular and cellular mechanisms of Angiotensin II - mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol rev.* 2000; 52: 11-34.
7. Sibinga N, Ware A. A Pair of ACEs, for Openers?. *Circ Res.* 2000; 87:e1– e9
8. Turner A, Hooper N. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *TIPS* 23 No.4 April 2002.
9. Paillard F, Chansel D, Brand E, et al. Genotype-Phenotype Relationships for the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in a Normal Population. *Hypertension.* 1999; 34:423-429.
10. Grant G. Possible Involvement of the Local Renin-Angiotensin System in Exocrine Pancreas Responses to Food Components. *J Pancreas.* 2001; 2: 43-49.
11. De la Serna F. Insuficiencia cardíaca crónica. Cap 4: sistema renina-angiotensina. Actualización 2004. pp: 29-43.
12. Kramers C, Danilov S, Deinum J, et al. Point Mutation in the Stalk of Angiotensin-Converting Enzyme Causes a Dramatic Increase in Serum Angiotensin-Converting Enzyme But No Cardiovascular Disease. *Circulation.* 2001; 104: 1236-1240.
13. Alfalah M, Parkin E, Jacob R, et al. A Point Mutation in the Juxtamembrane Stalk of Human Angiotensin I-converting Enzyme Invokes the Action of a Distinct Secretase. *J Biol Chem.* 2001; 276: 21105-21109.
14. Morice A, Turkley A, Linton K. Human ACE gene polymorphism and distilled water induced cough. *Thorax.* 1997; 52: 111–113.

15. Tipnis S, Hooper N, Hyde R, et al. A Human Homolog of Angiotensin-converting Enzyme. *J Biol Chem.* 2000; 275: 33238-43.
16. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, et al. A Novel Angiotensin-Converting Enzyme–Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2000; 87: e1-e9.
17. Crackower M, Sarao R, Oudit G, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature.* 2002; 20: 822-8.
18. Brown B, May A. Renin-Angiotensin System Modulation: The Weight of Evidence. *AJH.* 2005; 18: 127S–133S.
19. Baudin B. Angiotensin II receptor polymorphisms in hypertension. Pharmacogenomic considerations. *Pharmacogenomics.* 2002; 3: 65-73.
20. Ferreira A, Santos R. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Brazilian J Med Biol Res.* 2005; 38: 499-507.
21. Moreau M, Garbacki N, Molinaro G, et al. The Kallikrein-Kinin System: Current and Future Pharmacological Targets. *J Pharmacol Sci.* 2005; 99: 6 – 38.
22. Murphey L, Hachey D, Oates J, et al. Metabolism of bradykinin in vivo in humans: identification of BK 1-5 as a stable plasma peptide metabolite. *J pharm exp therap.* 2000; 294: 263-269.
23. Tan Y, Hutchison F, Jaffa A. Mechanism of angiotensin II induced expression of B2 kinin receptors. *Am J physiol heart circ.* 2004; 286: 926-932.
24. Schmaier A. The kallikrein-kinin and the renin-angiotensin systems have a multilayered interaction. *Am J Physiol Regul.* 2003; 285: R1–R13.
25. Regoli D, Barbé J. Pharmacology of Bradykinin and Related Kinins. *Pharmacol rev.* 1980; 32: 1-46.
26. Marceau F, Hess J, Bachvarov D. The B1 Receptors for Kinins. *Am soc pharm exp ter.* 1998; 50: 357-386.
27. Souza D, Lomez E, Pinho V, et al. Role of bradykinin B2 and B1 receptors in the local, remote, and systemic inflammatory responses that follow intestinal ischemia and reperfusion injury. *J immunology.* 2004; 172: 2542-2548.
28. Medeiros R, Cabrini D, Ferreira J, et al. Bradykinin receptor expression induced by tissue damage in the rat portal vein. *Circ res.* 2004; 94: 1375-1382.

29. Fox A, Wotherspoon G, McNair K, et al. Regulation and function of spinal and peripheral neuronal B1 bradykinin receptors in inflammatory mechanical hyperalgesia. *Pain*. 2003; 104: 683-691.
30. Ellis K, Fozard J. Species differences in bradykinin receptor mediated responses of the airways. *Auton autac pharm*. 2002; 22: 3-16.
31. Zhang Y, Adner M, Cardell L. Up-regulation of bradykinin receptors in a murine in-vitro model of chronic airway inflammation. *Eur J Pharm*. 2004; 489: 117-126.
32. Reynolds C, Togias A, Proud D. Airway neural responses to kinins. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 159: 431-438.
33. U, Grimsson A, Wahba A, Westerholm B(eds): Studies in drug utilization. methods and applications. regional publication, European series N° 8. Copenhagen: World Health Organization, Regional Office for Europe, 1979.
34. Anatomical Therapeutic Chemical (ATC).Classification index: WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology, Oslo, Norway, 1996
35. Lama A, Oliva L. Conceptos actuales en hipertensión arterial. *Rev Méd Chile*. 2001; 129: 107-114.
36. Junot C, Menard J, Gonzales M, et al. In Vivo Assessment of Captopril Selectivity of Angiotensin Converting Enzyme Inhibition: Differential Inhibition of Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro and Angiotensin I Hydrolysis. *J Pharm Exp Ther*. 1999; 289: 1257-1261.
37. Molinaro G, Cugno M, Perez M, et al. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor-Associated Angioedema Is Characterized by a Slower Degradation of des-Arginine⁹-Bradykinin. *J pharm exp therap*. 2002; 303: 232-237.
38. Dykewicz M. Cough and angioedema from angiotensin-converting enzyme inhibitors: new insights into mechanism and management. *Curr opin allergy clin immunol*. 2004; 4: 267-270.
39. Emanuelli C, Grady E, Madedu P, et al. Acute ACE Inhibition Causes Plasma Extravasation in Mice That is Mediated by Bradykinin and Substance P. *Hypertension*. 1998; 31: 1299-1304.
40. Ignjatovic T, Tan F, Brovkovich V, et al. Novel mode of action of angiotensin I converting enzyme inhibitors. *J biol chem*. 2002; 277: 16847-16852.
41. Fortin J, Gobeil F, Adam A, et al. Do angiotensin convertin enzyme inhibitors directly stimulate the kinin B1 receptor?. *Am J Physiol*. 2002; 285: 277-282.
42. Ignjatovic T, Tan F, Brovkovich V, et al. Activation of bradykinin b1 receptor by ACE inhibitors. *International immunopharm*. 2002; 2: 1787-1793.

43. Hirata R, Nabe T, Kohno S. Augmentation of spontaneous cough by enalapril through up-regulation of bradykinin B₁ receptors in guinea pigs. *Eur J of Pharm.* 2003; 474: 255-260.
44. Avedaño M, Tamargo J. Nuevos avances en medicamentos. Realigraf S.A, Madrid. 2004. pp: 167-197.
45. Roses A. Pharmacogenetics. *Human molecular genetics.* 2001; 10: 2261-2267.
46. Evans W, Relling M. Pharmacogenomics: Translating Functional Genomics into Rational Therapeutics. *Science.* 1999; 286:487-491.
47. Agachan B, Ibir T, Yilmaz H, et al. Angiotensin converting enzyme I/D, angiotensinogen T174M-M235T and angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphism in turkish hypertensive patients. *Exp mol med.* 2003; 35: 645-649.
48. Kee S, Cho E, Park H, et al. Renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphism as a risk factor of coronary in stent restenosis. *Yonsei Med J.* 2002; 43: 461-472.
49. Jalil J, Piddo A, Cordova S, et al. Prevalence of the angiotensin I converting enzyme insertion/deletion polymorphism, plasma angiotensin converting enzyme activity, and left ventricular mass in a normotensive Chilean population. *Am J Hypertens.* 1999; 12:697-704.
50. Baudin B. Angiotensin II receptor polymorphisms in hypertension. Pharmacogenomic considerations. *Pharmacogenomics.* 2004; 3: 65-73.
51. Braun A, Maier E, Kammerer S, et al. A novel sequence polymorphism in the promoter region of the human B2-bradykinin receptor gene. *Hum Genet.* 1996; 97: 688-689.
52. Mukae S, Aoki S, Iwata T, et al. Bradykinin B2 receptor gene polymorphism is associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor -related cough. *Hypertension.* 2000; 36: 127-131.
53. Zee R, Rao V, Paster R, et al. Three candidate genes and angiotensin-converting enzyme inhibitor-related cough. *Hypertension.* 1998; 31: 925-928.
54. Houle S, Landry M, Audet R, et al. Effect of allelic polymorphism of the B1 and B2 receptor gene on the contractile responses of the human umbilical vein to kinins. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 294: 45-51.
55. Bachvarov D, Landry M, Houde I. Characterization of two polymorphic sites in the human kinin b1 receptor gene: altered frequency of an allele in patients with a history of end-stage renal failure. *Soc nephrol.* 1998; 9: 598-604.
56. Knigge H, Bluthner M, Bruntgens A, et al. G-699C polymorphism in the bradykinin-1 receptor gene in patients with renal failure. *Nephrol Dial Transp.* 2000; 15: 586-588.

10. ANEXO

10.1 Obtención de anticuerpos policlonales mediante protocolo de inmunización

Se elaboraron anticuerpos policlonales para la determinación, en un estudio futuro, de los niveles plasmáticos de ANG, BK y péptidos asociados, para esto se inmunizaron 8 hembras de conejos New Zealan que fueron repartidos en 2 grupos, 4 para ANG y 4 para BK.

10.1.1 Formación del antígeno

La formación del antígeno consistió básicamente en la unión del péptido de interés con una molécula capaz de proporcionarle características inmunogénicas al complejo. Para esto se utilizó hemocianina de loco (KLH), la cual fue acoplada mediante glutaraldehído que reacciona con los grupos NH_2 de ambas partes para producir la unión. Antes del acoplamiento debió realizarse la modificación de los péptidos mediante la adición de un grupo N-Ac y una Lys en posición 9 generando N-Ac-Lys⁹-ANG II y N-Ac-Lys⁹-BK 1-7 con el objeto de dirigir el acoplamiento mediante glutaraldehído al grupo NH_2 de la Lys en ambos péptidos. En la *figura 3* se muestra el acoplamiento para N-Ac-Lys⁹-BK 1-7, el proceso para la formación de N-Ac-Lys⁹-ANG II es similar.

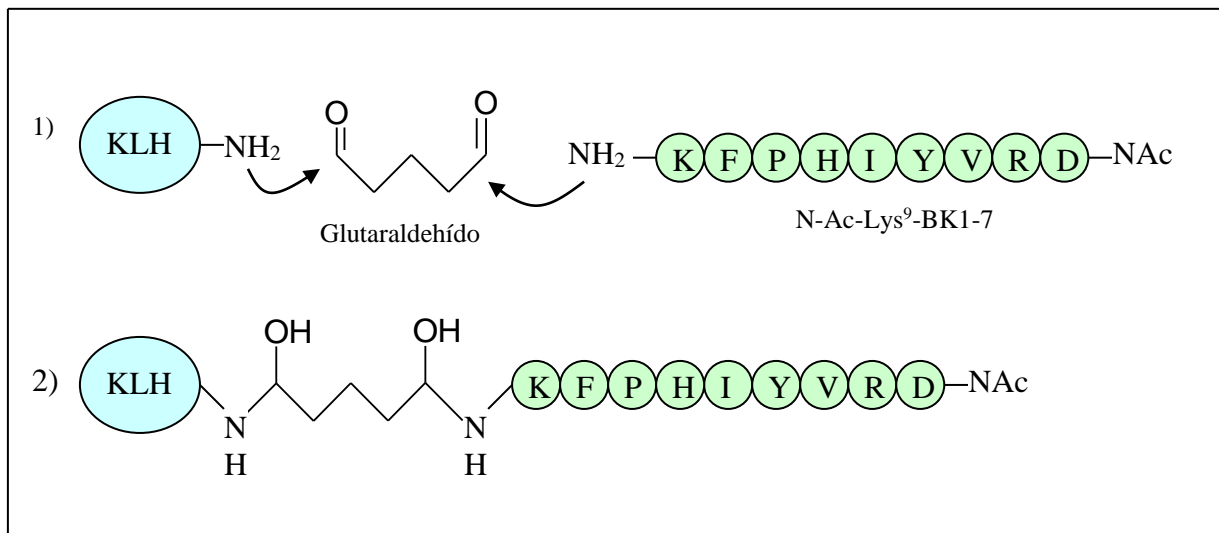


Fig. 6.- Acoplamiento del péptido y KLH mediante Glutaraldehído, 1) formación del complejo KLH-glut-BK
2) antígeno constituido, nótese que el glutaraldehído forma parte del antígeno.

El antígeno obtenido fue mezclado con coadyuvante de Freund y se inyectó, vía intradérmica, a cada grupo de experimentación. A contar de la tercera inmunización comenzó a obtenerse pequeñas cantidades de suero inmune para realizar un seguimiento del título de anticuerpos mediante RIA.

10.1.2 Seguimiento del título de anticuerpos

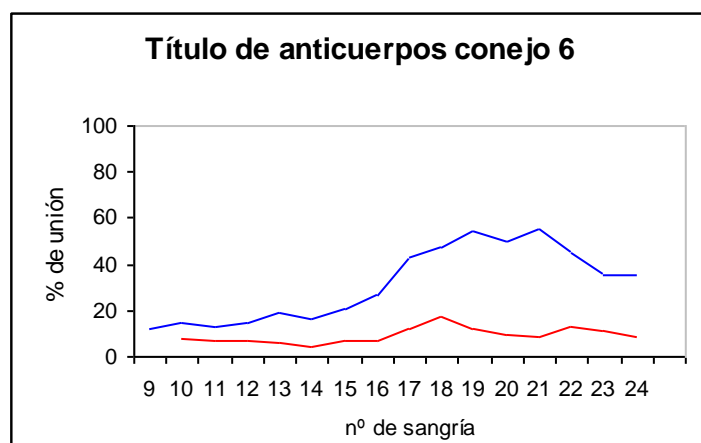
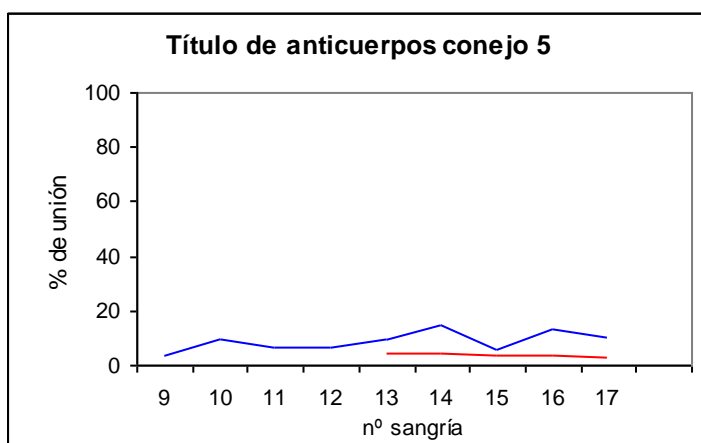
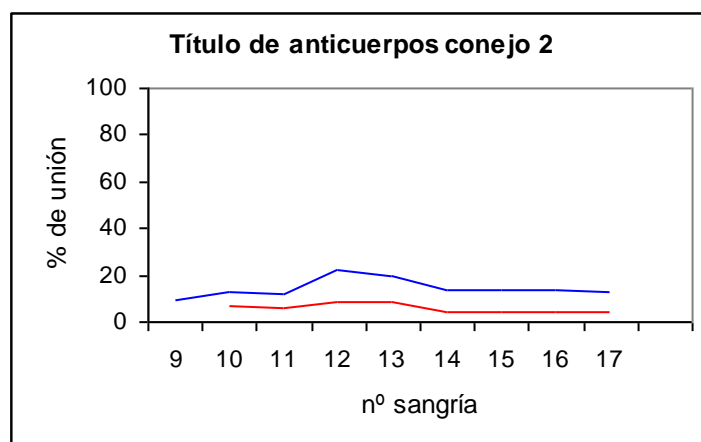
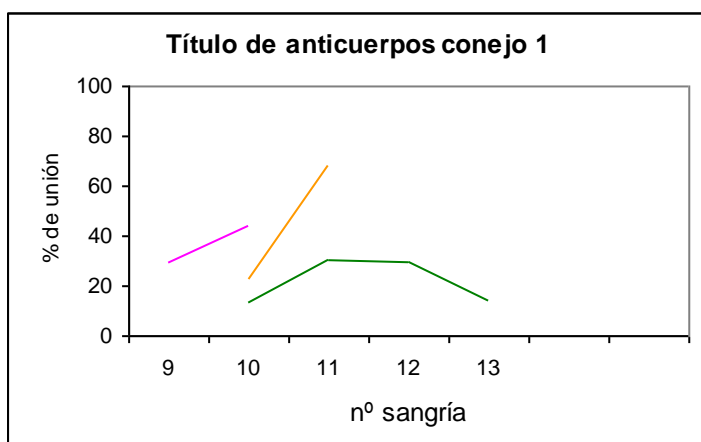
La distribución de los conejos para formar los dos grupos de estudio se muestra en la *tabla 8*.

Tabla 8. Distribución de los grupos de estudio

ANG	BK
Conejo 1	Conejo 3
Conejo 2	Conejo 4
Conejo 5	Conejo 7
Conejo 6	Conejo 8

A continuación se detalla el seguimiento del título de anticuerpos para cada conejo, a excepción del conejo nº 7 que se descartó tempranamente del estudio por no responder al antígeno.

En la elaboración de anticuerpos para ANG los resultados fueron:



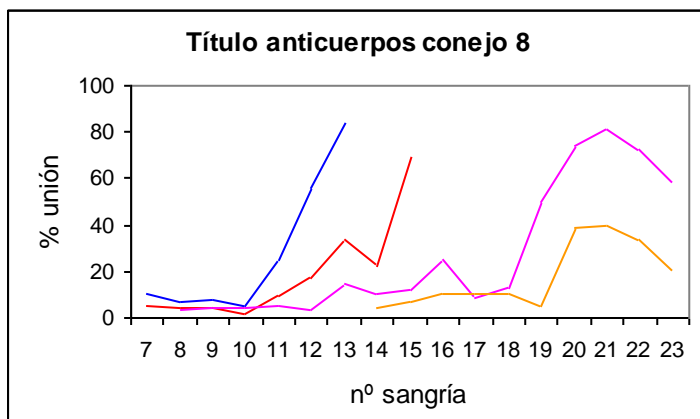
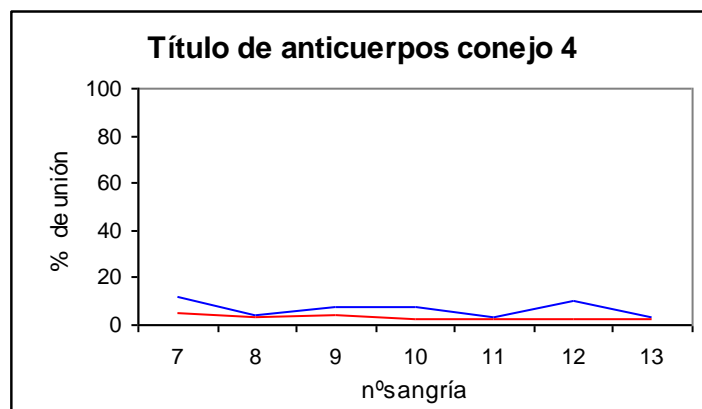
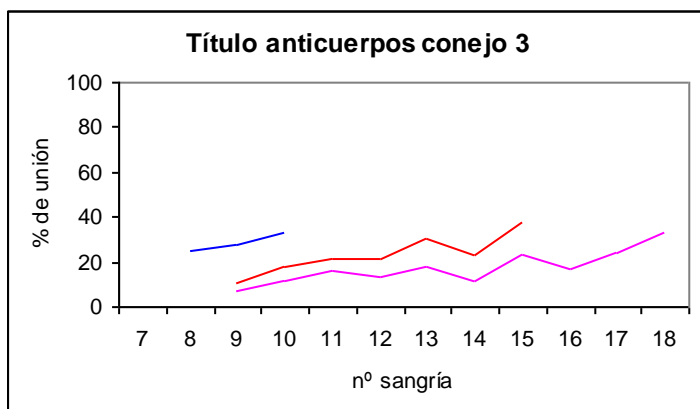
Dilución:

— 1/1000 — 1/5000 — 1/10000 — 1/30000 — 1/50000

El conejo n° 1 rápidamente alcanzó elevados títulos de anticuerpos siendo el primero en llegar a la sangría final, los conejos 2 y 5 no mostraron un aumento en su título por lo que abandonaron el estudio luego del análisis de la sangría 17 y el conejo 6 presentó un título mucho mas bajo en comparación con el conejo 1.

Existió una amplia diferencia de tiempo para obtener el suero final entre los conejos 1 y 6, para el primero el proceso concluyo luego de la sangría 13 (26 semanas) y para el segundo fue después de la sangría 24 (48 semanas).

En la elaboración de anticuerpos para BK los resultados fueron:



Dilución:

- 1/1000
- 1/5000
- 1/10000
- 1/20000

El bajo título de anticuerpos mantenido por el conejo 4 fue motivo de la eliminación de éste después de la sangría 13, el conejo 3 alcanzó su título máximo en la sangría 18 y se puede observar la oscilación en el título del conejo 8 que comenzó a decaer luego de la sangría 21.

La tabla 10 muestra los porcentajes y diluciones finales para la sangría a blanco.

Tabla 10. Porcentajes y diluciones finales

N° de conejos	% de unión	Dilución
1 (ANG)	36	1/5.000
3 (BK)	33	1/10.000
6 (ANG)	13	1/5.000
8 (BK)	34	1/5.000

Así los sueros obtenidos en la etapa final del proceso, fueron almacenados a – 80°C, para su posterior utilización.