**Análisis genético poblacional de los polimorfismos del gen de la quinasa 4 del receptor dopaminérgico acoplado a proteína G y de la oxido nítrico sintasa endotelial en una muestra poblacional de Bucaramanga**

**FRANCISCO JAVIER LEÓN, MSC**[[1]](#footnote-2)**, FERNANDO RONDÓN, PHD[[2]](#footnote-3), CLARA INÉS VARGAS, MSC**[[3]](#footnote-4)**, MYRIAM ORÓSTEGUI, MSC**[[4]](#footnote-5)**, LEONELO BAUTISTA MD, MPH, DrPH**[[5]](#footnote-6)

 **NORMA CECILIA SERRANO, MSC**[[6]](#footnote-7)**, MARÍA C. PÁEZ, MSC6, ADRIANA CASTILLO, MSC**3

**RESUMEN**

***Introducción:*** A pesar de que cerca del 40% de la variabilidad en la presión arterial es explicada por factores genéticos, la identificación de genes asociados a la hipertensión arterial esencial (HAE) es difícil en poblaciones que están constituidas por subpoblaciones con antecedentes genéticos diferentes; en esta situación, los estudios de alelos específicos podrían ser sesgados, si los casos y los controles provienen de diferentes subpoblaciones indicando que la población podría estar subestructurada. Adicionalmente es necesario evaluar previamente las características genéticas de la población a analizar; porque se ha demostrado que hay variación en la frecuencia de los alelos asociados con la enfermedad entre poblaciones, información relevante para establecer el tamaño de muestra del estudio.

***Objetivo*:** Determinar la estructura genética de la población de Bucaramanga, en relación con los polimorfismos genéticos asociados con la regulación de la presión arterial: 448G>T, 679C>T y 1711C>T del gen de la quinasa 4 del receptor dopaminérgico acoplado a proteína G (GRK4) y Glu298Asp, -786T>C y el VNTR del intrón 4 del gen de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS).

***Metodología:*** Se estudió una muestra aleatoria de 552 individuos no relacionados, seleccionados al azar. A cada muestra se le extrajo el ADN por el método de fenol–cloroformo y se identificaron por medio de análisis de polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas a partir de estas se estableció si estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) y se realizó un análisis molecular de varianza (AMOVA) para determinar el grado de estructura genética de la población; por último se calcularon las frecuencias haplotipicas.

***Resultados:*** El alelo más frecuente en cada polimorfismos fue: 448G>T alelo T (50,7%), 679C>T alelo C (70%), 1711C>T alelo C (69%), -786T>C alelo T (76%), Glu298Asp alelo G (72%) y el intrón 4 alelo 4b (90%); siendo el 448G>T (R65L) el más diverso, con una frecuencia de heterocigotos del 49,9%. Los seis polimorfismos se encontraron en equilibrio HW. El AMOVA no evidenció estructura genética poblacional, dado que el valor del índice de subestructura fue menor de 0,05 (*Fst* = 0,0038). Se identificaron 38 haplotipos siendo GCCTG4b el más frecuente con un 21,2%.

***Conclusión:*** La población estudiada no presenta subestructura genética y todos los polimorfismos tanto del gen GRK4 como del gen eNOS se encontraron en HW, lo que indica que la población se mezcla aleatoriamente y que no existen subgrupos dentro de la misma que puedan afectar los resultados que se obtengan en el estudio de asociación entre estos genes y la HAE.

***Palabras clave:*** *GRK4; eNOS; Hipertensión arterial esencial; Polimorfismos, Genética de poblaciones.*

**ABSTRACT**

Background: Although about 40% of the variability in blood pressure is explained by genetic factors, the identification of genes associated with essential hypertension (PIH) is difficult in populations that are composed of subpopulations with different genetic background; in this situation, studies of specific alleles could be biased if cases and controls from different subpopulations, indicating that the population may be substructure. Additionally it is necessary to assess in advance the genetic characteristics of the population to be analyzed, because it has been shown that there is variation in the frequency of alleles associated with the disease among populations, relevant information to establish the study sample size.

Objective: To determine the genetic structure of the population of Bucaramanga, in relation to genetic polymorphisms associated with regulation of blood pressure: 448G> T, 679C> T and 1711C> T in the gene for dopamine receptor kinase 4 protein-coupled G (GRK4) and Glu298Asp,-786T> C and intron 4 VNTR gene endothelial nitric oxide synthase (eNOS).

Methods: We studied a random sample of 552 unrelated individuals selected at random. Each sample was extracted the DNA by phenol-chloroform method and identified by analysis of length polymorphism of restriction fragments (RFLP). We calculated allele and genotype frequencies from these established whether they were in Hardy-Weinberg (HW) and an analysis of molecular variance (AMOVA) to determine the degree of population genetic structure, and finally were calculated haplotype frequencies.

Results: The most frequent allele in each polymorphism was: 448G> T allele T (50.7%), 679C> T allele C (70%), 1711C> T allele C (69%),-786T> C allele T ( 76%), Glu298Asp allele G (72%) and intron 4 allele 4b (90%), being the 448G> T (R65L) the most diverse, with a heterozygote frequency of 49.9%. The six polymorphisms were in HW equilibrium. The AMOVA showed no population genetic structure because the sub index value was less than 0.05 (Fst = 0.0038). We identified 38 haplotypes being the most common GCCTG4b with 21.2%.

Conclusion: The study population has no genetic substructure and all GRK4 gene polymorphisms of both eNOS gene as found in HW, which indicates that the population is mixed randomly and that there are subgroups within the same which may affect the results obtained in the study of association between these genes and the EAF.

***Keywords:*** GRK4, eNOS, essential hypertension, polymorphisms, population genetics

Los niveles de presión arterial tienden a agregarse en familias, debido en parte a predisposición genética compartida, de hecho cerca de 4% de la variabilidad en presión arterial es explicada por factores genéticos (1) y el riesgo de desarrollarla, después de los 50 años, se duplica por cada familiar de primer grado con historia de hipertensión (2). La presión arterial es regulada por múltiples mecanismos que involucran multiples genes no-alélicos con efectos aditivos pequeños. Aunque el mecanismo específico alterado no puede ser identificado en cerca del 90% de los casos, las variantes genéticas individuales (alelos) o las combinaciones de alelos (haplotipos) involucrados en la regulación de la presión arterial son los factores genéticos con mayores probabilidades de incrementar el riesgo de desarrollar hipertensión.

 Las variantes o polimorfismos genéticos asociadas a la regulación de la excreción urinaria de sodio y a la regulación del tono vasomotor son factores de riesgo potenciales para el desarrollo de hipertensión. Entre los primeros se encuentran tres polimorfimos (R65L, A142V y A486V) del gen GRK4 que codifica la quinasa 4 de los receptor acoplados a la proteina G. Entre estos receptores se encuentran los receptores D1 y D2 de la dopamina, que median el efecto natriurético de esta catecolamina a nivel del túbulo contorneado proximal de la nefrona (3). Entre los polimorfismos asociados al tono vascular se destacan los del gen que codifica la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), particularmente Glu298Asp, -789T>C e Intrón 4 (4). El óxido nítrico (ON) induce vasodilatación y reducción de la presión arterial por medio de la inhibición de la contracción y crecimiento del músculo liso de la pared arterial (5) (6). Sin embargo, la relación de estos polimorfismos con el riesgo de desarrollar hipertensión es todavía incierta (7). Uno de los obstáculos en la identificación de variantes genéticas asociadas a la hipertensión es la comparación de casos y controles que provienen de poblaciones con diferentes antecedentes genéticos. Este problema se conoce como estructura genética y genera un sesgo de selección, debido a que casos y controles tienen una distribución diferente de los alelos de los polimorfismos asociados a la enfermedad de interés (8). En consecuencia, distintos métodos han sido propuestos para identificar y controlar la estructura poblacional en estudios de asociación genética (9) (10). Nosotros hemos estudiado la distribución de los polimorfismos 448G>T ó R65L (rs2960306), 679C>T ó A142V (rs1024323) y 1711C>T ó A486V (rs1801058) del gen de la quinasa 4 del receptor dopaminérgico acoplado a proteína G (GRK4) y los polimorfismos G894T ó Glu298Asp (rs1799983), -786T>C (rs2070744) y el intrón 4 del gen de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y el grado de estructura genética en la población de Bucaramanga.

**MATERIALES Y MÉTODOS**

Se estudiaron 552 participantes en INEFAC (Incidencia de Enfermedades Cardiovasculares y Factores de Riesgo en Colombianos), un estudio de cohorte en una muestra aleatoria de residentes de Bucaramanga, Colombia (11). La muestra incluyó 372 mujeres y 180 hombres entre 16 y 69 años de edad (promedio de 34 años). El estudio fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander y todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito.

El cálculo de la muestra se realizó teniendo en cuenta la frecuencia del alelo de menor prevalencia para los seis polimorfismos estudiados, en diferentes poblaciones, (12) (13) (14) (15); adicionalmente se contemplaron los parámetros de nivel de confianza del 95%, poder de 86%, riesgo relativo esperado (RRE) de 2.0 y relación caso:control 1:1 (16).

El ADN fue extraído por el método de fenol-cloroformo (17) a partir de muestras de sangre total preservadas con EDTA. Las muestras de ADN fueron almacenadas a 4°C hasta la genotipificación de los polimorfismos. Los polimorfismos del gen de la GRK4 y de la eNOS fueron amplificados por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (18) y se identificaron por medio RFLP.

La secuencia genómica de los genes GRK4 y eNOS y las secuencias de los polimorfismos de interés fueron verificadas en las base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de los Estados Unidos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>). Los sitios de corte de cada una de las enzimas fueron verificados con el software RestrictionMapper (<http://www.restrictionmapper.org/>).

Las secuencias de acido nucleicos que sirvieron como puntos de partida para la replicación del ADN (cebadores o *primers*) figuran en el cuadro 1. Para detectar los polimorfismos 679C>T (rs1024323) y 1711C>T (rs1801058), se utilizó la técnica de PCR-RFLP discordante, que consiste en cambiar una base en uno de los cebadores de modo que se genera un fragmento que difiere en una base respecto del ADN molde, como consecuencia el producto amplificado del alelo ancestral adquiere un sitio de restricción que no está presente en el alelo mutando (19).

El montaje de la PCR para los polimorfismos 448G>T (rs2960306), 679C>T (rs1024323) y 1711C>T (rs1801058) contenía 1X Buffer, 3,5 mM de MgCl2,0,5 µM de cada cebador, 0,8 µM de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), 1 U de Taq polimerasa (promega®) y 3,9 ng de ADN en un volumen final de 10µl. El protocolo de amplificación incluyó un paso inicial de 94°C por 5 minutos; seguido de 38 ciclos, denaturación 95°C por 15 segundos, anillamiento 60°C por 15 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos y un paso final a 72°C por 7 minutos. La amplificación de los polimorfismos 448G>T (rs2960306), 679C>T (rs1024323) y 1711C>T (rs1801058) fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. En cada una de las corridas electroforéticas se emplearon controles positivos, negativos y se corrió un marcador de peso molecular de 50 a 500pb. Los amplificados fueron sometidos a restricción empleando el siguiente protocolo: 1X buffer, 0,1ug/µl BSA acetilada, 1U de cada enzima y 0,2ng ADN en un volumen final de 10 µl y la reacción se llevó a cabo durante 10 horas a 37°C (15).

El montaje de la PCR para el polimorfismo Glu298Asp (rs1799983) contenía 1X Buffer-GoTaq® Green Master Mix, 0,4 µM de cada cebador y 2,4 ng de ADN, para un volumen final de 25µl y se le realizó un protocolo de amplificación con un paso inicial de 95°C por 2 minutos; seguido de 35 ciclos, denaturación 95°C por 45 segundos, anillamiento 63°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 45 segundos finalmente paso de 72°C por 5 minutos. La amplificación de estos polimorfismos fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Los amplificados de los polimorfismos -786T>C (rs2070744) y Glu298Asp (rs1799983) fueron sometidos a restricción empleando el siguiente protocolo: 1X buffer, 0,1ug/µl BSA acetilada, 1U de cada enzima y 0,5 ng ADN en un volumen final de 15 µl y la reacción se llevó a cabo durante 14 horas a 37°C (20).

El montaje de la PCR para el polimorfismo -786T>C (rs2070744) contenía 1X Buffer, 2,5 mM de MgCl2,0,4 µM de cada cebador, 0,8 µM de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), 1 U de Taq polimerasa (promega®) y 2,4 ng de ADN en un volumen final de 25 µl. El protocolo de amplificación incluyó un paso inicial de 94°C por 4 minutos; seguido de 35 ciclos, denaturación 94°C por 30 segundos, anillamiento 63°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto y un paso final a 72°C por 5 minutos. La amplificación fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con una tensión de 60 voltios por 80 minutos (20).

Los productos de las digestiones enzimáticas de los SNPs estudiados se separaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 3% y para la visualización de las bandas se adicionó bromuro de etidio. Los geles se corrieron en una cámara de electroforesis Power Pac 300 (*BioRad®*) en buffer TBE 1X y se aplicó una tensión de 60 voltios por 80 minutos. Los sitios de reconocimiento de las enzimas, los tamaños de los fragmentos esperados y los genotipos asignados se muestran en el cuadro 2.

El montaje de la PCR para el intrón 4, se realizó con el mismo protocolo del polimorfismo -786T>C (rs2070744). Los tamaños de los fragmentos de este polimorfismo, producto de la amplificación, se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% con una tensión de 60 voltios por 80 minutos. En el cuadro 3, se observa el tamaño de los productos de la amplificación (20).

En cada una de las corridas electroforéticas se emplearon controles positivos y negativos y un marcador de peso molecular de 50 a 500pb para establecer el tamaño de los fragmentos amplificados. Los análisis de todas las muestras fueron efectuados en forma enmascarada para evitar sesgos y el 10% de las muestras se procesaron por duplicado sin que se presentara ninguna discrepancia.

Secuenciación
Una vez estandarizada la PCR, se seleccionaron seis muestras de cada polimorfismo para ser secuenciadas con el kit Big Dye terminator (Applied Biosystems®) y las secuencias obtenidas se alinearon con el software Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) para confirmar la correspondencia con los fragmentos esperados.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

### Con los resultados obtenidos de la lectura de las electroforesis se construyeron dos bases de datos en Excel® Microsoft 2007 validadas con la aplicación Data Compare del Software Epi Info versión 3.5.1 (21) y se estableció el genotipo para cada polimorfismo tipificado en en las muestras. Con estos datos se calcularon para cada uno de los polimorfismos estudiados, las frecuencias genotípicas con el programa GenAlex 6.3® (22) y las frecuencias alélicas con el programa arlequín v 3.5 (23). En cada polimorfismo se realizó el test de Hardy-Weinberg (EHW) para establecer si estaban en equilibrio HW, posteriormente se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) para determinar la presencia de estructura genética poblacional, condición verificada mediante el uso del programa Structure v 2.3 (24). Por último se analizaron en conjunto los seis polimorfismos estudiados para obtener los haplotipos y la frecuencia de cada uno de ellos en la población.

**RESULTADOS**Los productos de PCR obtenidos de la amplificación de los polimorfismos 448G>T (rs2960306), 679C>T (rs1024323) y 1711C>T (rs1801058) fueron los esperados (de acuerdo con los resultados obtenidos en la secuenciación) y se muestran en la Figura 1.

La tipificación por RFLP de los diferentes polimorfismos, permitió detectar los tres genotipos posibles de cada uno de ellos en la población estudiada, como se muestra en la figura 2.

A partir de las frecuencias genotípicas se calcularon las frecuencias alélicas para cada uno de los polimorfismos del GRK4 y la ENOS, y se determinó que la población estaba en equilibrio de Hardy-Weinberg, los datos obtenidos se presentan en el cuadro 4.

Análisis de la estructura poblacional

De acuerdo al análisis molecular de varianza (AMOVA), no hay evidencia de estructura genética (Fst=0,0038; *p=0,032*) en la muestra poblacional de Bucaramanga para los polimorfismos del gen de la quinasa 4 y de la eNOS; los valores observados están dentro del rango de 0<Fst<0,005 donde se considera que hay poca diferenciación genética (25) (26).

La evidencia de no estructura fue confirmada por el análisis realizado con el software Structure v 2.3, al evaluar con K=2 (posibles ancestros) y con 10.000 replicas asumiendo el modelo de mezcla. Los resultados mostraron muy pocos individuos que eventualmente pueden pertenecer a otro grupo poblacional, además de evidenciar la ausencia de estructura genética en la muestra poblacional analizada. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3 (A y B).

**Análisis de haplotipos**

Se calcularon las frecuencias haplotipicas para los seis polimorfismos estudiados 448G>T (rs2960306), 679C>T (rs1024323), 1711C>T (rs1801058), Glu298Asp (rs1799983), -786T>C (rs2070744) e intrón 4, siendo el más frecuente el GCCTG4b (21%) de un total de 38 haplotipos detectados en 1104 cromosomas analizados. Los haplotipos se muestran en el cuadro 5.

**DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

De acuerdo con los valores obtenidos para las frecuencias alélicas en la población estudiada, el alelo más frecuente para cada polimorfismo del gen GRK4 fue: 448G>T (rs2960306) alelo T (50,7%), 679C>T (rs1024323) alelo C (70%), 1711C>T (rs1801058) alelo C (69%), en un estudio previo realizado en población hispana, los resultados coinciden para los polimorfismos 679C>T (rs1024323) y 1711C>T (rs1801058) y difieren para el polimorfismo 448G>T (rs2960306) (27). El alelo más frecuente en cada polimorfismo del gen ENOS fue: -786T>C (rs2070744) alelo T (76%), Glu298Asp (rs1799983) alelo G (72%) y el intrón 4 alelo 4b (90%), estos resultados coinciden con los hallados en un estudio previo realizado en población bumanguesa (28).

En el presente estudio se hallaron 38 combinaciones de haplotipos, siendo GCCTG4b el más frecuente con 21%, no se encontraron publicaciones en poblaciones donde se reporten frecuencias haplotipicas para estos seis polimorfismos, en población hispana ni colombiana, convirtiendo el presente estudio en el primer reporte de las mismas.

Todos los polimorfismos estudiados se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg lo que indica que la población está conformada por individuos que se mezclan al azar, al igual que lo reportado en estudios previos en población bumanguesa (28) y en población hispana (27).

Adicionalmente no se encontró estructura poblacional en la muestra analizada, lo que coincide con lo hallado en un estudio previo realizado en esta población, con otros marcadores genéticos polimórficos (29).

**CONCLUSIONES**

Los resultados hallados confirman que la población estudiada se encontró en EHW para todos los sistemas estudiados y no presenta subestructura poblacional, lo que permite adelantar un estudio de asociación de estos polimorfismos con la hipertensión arterial esencial, puesto que es claro que las asociaciones entre genes candidatos a desarrollar enfermedades multifactoriales deben ser interpretadas dentro del contexto de la estructura genética de la población que está siendo estudiada.

**Conflicto de intereses.** Los autores declaran que no hay conflicto de intereses en el presente manuscrito.

**AGRADECIMIENTOS**Los autores manifiestan su agradecimiento al Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología Francisco José de Caldas y a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial Santander (UIS). A la Dra Leonor Gusmao, investigadora senior del Instituto de Patología e Inmunología Molecular de la Universidad de Oporto (IPATIMUP) y al Dr. Henry Bautista del Departamento de virología e Inmunología de Southwest Foundation for Biomedical Research.

**FUENTES DE FINANCIACIÓN:**Colciencias proyecto código 110240820434 de la convocatoria 408 de 2007 y la Vicerrectoría de investigación y extensión de la Universidad Industrial de Santander.

# Bibliografía

1. **Harrap, SB; Stebbing, M; Hopper, JL; Hoang, HN; Giles, GG.** *Familial patterns of covariation for cardiovascular risk factors in adults: The Victorian Family Heart Study.* 8, 2000, Am J Epidemiol, Vol. 152, pp. 704-715.

2. **Hopkins, PN; Hunt, SC.** *Genetics of hypertension.* 6, 2003, Genet Med, Vol. 5, pp. 413-429.

3. **Premont, Richard T; Macrae, Alexander D.; Stoffel, Robert H.; Chung, Namjin; Pitcher, Julie A.; Ambrose, Christine; Inglese, James; MacDonald, Marcy E.; Lefkowitz, Robert J.** *Characterization of the G Protein-coupled Receptor Kinase GRK4. Identification Of Four Splice Variants.* 11, March 1996, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 271, pp. 6403–6410.

4. **Casas, JP; Cavalleri, GL; Bautista, LE; Smeeth, L; Humphries, SE; Hingorani, AD.** *Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms and Cardiovascular Disease: A HuGE Review.* 10, Am J Epidemiol : s.n., 2006, Vol. 64, pp. 921-935.

5. **Bautista, LE.** *Inflammation, endothelial dysfunction, and the risk of high blood pressure: Epidemiologic and biological evidence.* 4, 2003, J Hum Hypertens, Vol. 17, pp. 223-230.

6. **Hingorani, Aroon D.** *Endothelial Nitric Oxide Synthase Polymorphisms and Hypertension.***.** 2003, Current Hypertension Reports, Vol. 5, pp. 19–25.

7. **Casas, JP; Cavalleri, GL; Bautista, LE; Smeeth, L; Humphries, SE; Hingorani, AD.** *Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms and Cardiovascular Disease: A HuGE Review.* 10, 2006, Am J Epidemiol, Vol. 164, pp. 921-935.

8. **Marchini, J; Cardon, LR; Phillips, MS; Donnelly, P.** *The effects of human population structure on large genetic association studies.* 5, 2004, Nat Genet, Vol. 36, pp. 512-517.

9. **Pritchard, JK; Stephens, M; Donnelly, P.** *Inference of population structure using multilocus genotype data.* 2, 2000, Genetics, Vol. 155, pp. 945-959.

10. **Marchini, J; Cardon, LR; Phillips, MS; Donnelly, P.** *The effects of human population structure on large genetic association studies.* 5, 2004, Nat Genet, Vol. 36, pp. 512-517.

11. **Orostegui, M; Vera, L M; Velandia, L; López, N; Bautista, LE.** *Prevalencia de factores de Riesgo para enfermedad Cardiovascular en la Población de 18 y más años de Bucaramanga.* Bucaramanga : s.n., 2006. CIE. Sin publicar.

12. **Bengra, C; Mifflin, TE; Khripin, Y; Manunta, P; Williams, SM; Jose, PA; Felder, RA.** *Genotyping of Essential Hypertension Single-Nucleotide Polymorphisms by a Homogeneous PCR Method with Universal Energy Transfer Primers.* 12, 2002, Clinical Chemistry, Vol. 48, pp. 2131–2140.

13. **Speirs, HJ; K, Katyk; Kumar, NN; Benjafield, AV; Wang, WY; Morris, BJ.** *Association of G-protein-coupled receptor kinase 4 haplotypes, but not HSD3B1 or PTP1B polymorphisms, with essential hypertension.* 2004, Journal of Hypertension, Vol. 22, pp. 931-936.

14. **Williams, SM; Ritchie, MD; Phillips, JA; Dawsone, E; Prince, M; Dzhura, E; Willis, A; Semenya, A; Summar, M; White, BC; Addy, JH; Kpodonu, J; Wong, L-E; Felder, RA; Jose, PA; Moore, JH.** *Multilocus Analysis of Hypertension: A Hierarchical Approach.* 2004, Hum Hered, Vol. 57, pp. 28–38. DOI: 10.1159/000077387.

15. **Wang, Y; Li, B; Zhao, W; Liu, P; Zhao, Q; Chen, S; Li, H; Gu, D.** *Association study of G protein-coupled Receptor Kinasa 4 gene variants with essential hypertension in Northern Han Chinese.* 2006, Ann H Genet, Vol. 70, pp. 1-6.

16. **Marroni, A; Metzger, I; Souza-Costa, D; Nagassaki, S; Sandrim, V; Correa, R; Rios-Santos, F; Tanus-Santos, J.** *Consistent interethnic differences in the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide synthase genetic polymorphisms.* 2005, Nitric Oxide, Vol. 12, pp. 177–182.

17. **Valverde, E; Cabrero, C; Cao, R; Rodríguez-Calvo, M S; Díez, A; Barros, F; Alemany J, Carracedo, C.** *Population genetics of three VNTR polymorphisms in two different Spanish populations.* 5, 1993, International Journal of Legal Medicine, Vol. 105.

18. **Bartlett, JM; Stirling, D.** *A short history of the polymerase chain reaction.* 6, 2003, Methods Mol. Biol, Vol. 3, p. 226.

19. **Kwok, S; Chang, S Y; Sninsky, J J; Wang, A.** *A guide to the design and use of mismatched and degenerate primers.* 1994, Genome Research, Vol. 3, pp. S39-S47.

20. **Serrano, N; Casas, J; Diaz, L; Paez, C.** *Endothelial NO Synthase Genotype and Risk of Preeclampsia A Multicenter Case-Control Study.* 2004, Hypertension, Vol. 44, pp. 702-707.

21. **Dean, A G; Arner, T G; Sunki, G G; Friedman, R; Lantiga, M; Sangam, S; Zubieta, J C; Sullivan, K M; Brendel, K A; Gao, Z; Fontaine, N; Shu, M; Fuller, G; Smith, DC; Nitschke, D A; Fagan, R F.** *Epi Inf version 3.5.1, a database and statistics program for public health professionals.* Atlanta : s.n., 2007.

22. **Peakall, R; Smouse, P. E.** *GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research.* 2006, Molecular Ecology Notes, Vol. 6, pp. 288-295.

23. *Arlequin ver. 3.5: Anintegrated software package for population genetics data analysis.* **Excoffier, L; Laval, G; Schneider, S.** 2005, Evolutionary Bioinformatics Online, Vol. 1, pp. 47-50.

24. **Pritchard, JK; Stephens, M; Donnelly, P.** *Inference of population structure using multilocus genotype data.* 2000, Genetics, Vol. 155, pp. 945-59.

25. **Hartl, D; Clark, AC.** *Principles of populations genetics.* Massachusetts : Publishers Sinauer associates, 1997, pp. 71-109.

26. **Weir, B; Cockerham, C.** *Estimating F-statistics for the analysis of population structure.* 38, 1984, Evolution, Vol. 6, pp. 1358-1370.

27. **Lohmueller, K; Wong, L; Mauney, M; Jiang, L; Felder, R; Jose, P; Williams, S.** *Patterns of Genetic Variation in the Hypertension Candidate Gene GRK4: Ethnic Variation and Haplotype Structure.. 70, s.l. : University College London.* 2005, Annals of Human Genetics, pp. 27–41. doi: 10.1111/j.1529-8817.2005.001.

28. **Serrano, Norma C; Díaz, Luis A; Casas, Juan P; Hingorani , Aroon D ; Moreno de Lucca, Daniel ; Páez, María C.** *Frequency of eNOS polymorphisms in the Colombian general population.* 2010, BMC genetics, Vol. 11. 54.

29. **Hincapié, M L; Gil, A M; Pico, A L; Gusmão, L; Rondon, Fernando; Castillo, A.** *Análisis de la estructura genética en una muestra poblacional de Bucaramanga, departamento de Santander.* 9, octubre-diciembre 2009, Colombia Médica, Vol. 40, pp. 361-372.

1. Estudiante de Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Universidad Industrial de Santander. Escuela de Medicina. Grupo de investigación en genética humana. Bucaramanga, Colombia. [↑](#footnote-ref-2)
2. Docente, Universidad Industrial de Santander, Escuela de Biología. Bucaramanga, Colombia. [↑](#footnote-ref-3)
3. Docente, Universidad Industrial de Santander. Escuela de Medicina. Grupo de Investigación en Genética Humana. Bucaramanga, Colombia. E-mail castillo@uis.edu.co [↑](#footnote-ref-4)
4. Docente, Universidad Industrial de Santander. Escuela de Medicina. Observatorio Epidemiológico de Enfermedades Cardiovasculares. Bucaramanga, Colombia. [↑](#footnote-ref-5)
5. Profesor Asociado, Universidad de Wisconsin. Escuela de Medicina y Salud Pública. Madison. Wisconsin, USA. [↑](#footnote-ref-6)
6. Docente, Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Autónoma de Bucaramanga, Colombia [↑](#footnote-ref-7)