



Polimorfismo inserción/delección del gen de la enzima convertidora de angiotensina y enfermedad coronaria en la población de Montería, Córdoba

Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and coronary artery disease in the population of Monteria, Cordoba

Manolo I. Jaramillo, Biólogo, MSc.⁽¹⁾; Lorena Genes, Bióloga⁽¹⁾; Roger J. Tovar, Estadístico⁽²⁾; Gustavo A. Moreno, MD.⁽³⁾; Milton M. Quintana, Biólogo, MSc.⁽¹⁾

Montería, Colombia.

ANTECEDENTES Y OBJETIVO: el polimorfismo inserción/delección del gen de la enzima convertidora de angiotensina, ha sido identificado como un potente factor de riesgo de enfermedad coronaria. Para la población de Montería se desconocen las frecuencias con las que se expresan los alelos de este gen y el carácter de su interacción con condiciones de riesgo cardiovascular. El objetivo de este trabajo fue determinar, para dicha población, la asociación de este polimorfismo y el riesgo de sufrir enfermedad coronaria.

MÉTODO: se llevó a cabo un estudio retrospectivo con 70 casos y 70 controles; como casos se consideraron pacientes con padecimientos coronarios confirmados por electrocardiograma, remitidos a la Organización Cardiodiagnóstico de Córdoba, y como controles individuos voluntarios sin antecedentes cardiovasculares y sin relación filial. El ADN requerido se extrajo a partir de sangre periférica. La caracterización del polimorfismo se hizo mediante reacción en cadena de la polimerasa.

RESULTADOS: la distribución de genotipos de la enzima convertidora de angiotensina en pacientes casos no fue significativamente diferente a la estimada en pacientes controles ($X^2=3.687$, $p=0,1583$). El genotipo más frecuente en la población fue ID (40,72%). En el grupo casos, el genotipo II fue más frecuente que el genotipo DD comparado con el grupo control ($p<0,05$). El modelo de regresión logística múltiple ajustado, indicó no significancia del genotipo DD como factor de riesgo coronario (razón de disparidad = 0,51 $IC_{95\%} = 0,25 - 1,06$).

CONCLUSIÓN: el polimorfismo I/D del gen de la enzima convertidora de angiotensina no mostró ser un factor de riesgo significativo para enfermedad coronaria en la población de Montería.

PALABRAS CLAVE: factores de riesgo cardiovascular, enfermedad coronaria, polimorfismo inserción/delección del gen de la enzima convertidora de angiotensina.

Departamento de Córdoba. Universidad del Sinú - Elías Bechara Zainúm. Montería, Colombia.

(1) Grupo de Investigación Biomédica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Sinú. Montería, Colombia.

(2) Departamento de Matemáticas y Estadística. Universidad de Córdoba. Montería, Colombia.

(3) Cardiodiagnóstico de Córdoba Ltda. Montería, Colombia.

Correspondencia: Dr. Manolo Jaramillo, Calle 38 No. 1W Barrio Juan XXIII, Universidad del Sinú, Grupo de Investigación Biomédica y Biología Molecular, Montería, Colombia. Teléfono: (57-4) 7 84 03 40. Correo electrónico: mjaramillo@gmail.com

Recibido: 16/07/2012. Aceptado: 10/07/2013.

BACKGROUND AND OBJECTIVE: the insertion / deletion polymorphism of the gene for angiotensin converting enzyme has been identified as a potent risk factor for coronary heart disease. For the population of Montería, the frequency with which the alleles of this gene are expressed and the nature of its interaction with cardiovascular risk conditions, are not known. The aim of this work was to determine the association of this polymorphism and the risk of coronary heart disease in this population.

METHODS: a retrospective study of 70 cases and 70 controls was conducted. Cases were the patients with coronary disease confirmed by electrocardiogram, reported to the Córdoba Cardiognosis Organization and the control ones were volunteers without history of cardiovascular disease and without filial relationship. Required DNA was extracted from peripheral blood. Polymorphism characterization was done by the polymerase chain reaction.

RESULTS: the distribution of genotypes of the angiotensin converting enzyme gene in patients cases was not significantly different from that estimated in control patients ($X^2 = 3.687$, $p = 0.1583$). The most common genotype in the population was ID (40.72%). In the group cases, genotype II was more frequent than the DD genotype compared with the control group ($p < 0,05$). The multiple logistic regression adjusted model indicated no significance of DD genotype as coronary risk factor (odds ratio = 0.51 95% CI = 0.25 to 1.06).

CONCLUSION: I/D polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene did not show to be a significant risk factor for coronary heart disease in the population of Montería.

KEYWORDS: coronary artery disease, polymorphism insertion / deletion of the angiotensin converting enzyme gene, cardiovascular risk factors.

Rev Colomb Cardiol 2013; 20(5): 278-284.

Introducción

En el grupo de las enfermedades cardiovasculares, la enfermedad coronaria constituye un problema mayor de salud; las estadísticas muestran que, como causa única, es el principal autor de muerte en la población mundial (1). En Colombia, conforme a datos del Ministerio de Protección Social, es la primera causa de muerte por enfermedad en personas mayores de 45 años; indicadores básicos muestran que esta enfermedad cobra más de 5.000 muertes anuales en personas con edades entre 45 y 64 años y 20.269 defunciones en personas con edades superiores a los 65 años (2). Esta condición cardiaca se ha asociado tradicionalmente a factores modificables que pueden contribuir a su aparición, dentro de los que se incluyen el consumo de tabaco, el sobrepeso y el sedentarismo. Al mismo tiempo, guarda relación con composiciones genéticas específicas que predisponen a su desarrollo. Dentro de éstas, el polimorfismo del gen de la enzima convertidora de angiotensina, que codifica para la enzima convertidora de angiotensina, se considera un candidato importante como factor de riesgo cardiovascular (3).

Dicha enzima constituye un componente clave dentro de la dinámica del sistema renina-angiotensina-aldosterona, debido a que degrada bradiquinina y cataliza la conversión de angiotensina I en el péptido fisiológi-

camente activo y potente vasoconstrictor, angiotensina II, permitiendo la consecuente regulación de la presión arterial, del tono vascular y del volumen total de sangre (4). El gen de la enzima convertidora de angiotensina, localizado en el brazo largo del cromosoma 17 (17q23), exhibe un polimorfismo caracterizado por la presencia (inserción, I) o ausencia (delección, D) de una secuencia Alu repetitiva de 287 pb en el intrón 16 del gen y tres genotipos reconocibles por métodos moleculares II, ID y DD, asociados a los niveles circulantes de la enzima en plasma (5, 6). Se ha propuesto que la presencia del alelo D se acompaña de concentraciones plasmáticas y tisulares más elevadas de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina que el alelo I (6, 7), lo que podría justificar, desde un punto de vista fisiológico, una mayor incidencia de complicaciones cardiovasculares en los individuos con genotipo DD, debido a la elevación consecuente de los niveles de angiotensina II y al descenso de los de bradiquinina (3).

Múltiples estudios han confirmado la asociación de este polimorfismo con diferentes enfermedades cardiovasculares como infarto del miocardio (8), enfermedad arterial coronaria (9, 10), hipertrofia ventricular izquierda (11) e hipertensión esencial (12); sin embargo, estudios similares en otras poblaciones no lo han demostrado (13-16). En este contexto se podría decir que cada población, sobre la base de su herencia, hábitos y ambiente, presenta

una probabilidad de riesgo inherente dependiente de la interacción entre condiciones de riesgo. Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar la asociación del polimorfismo inserción/delección de la enzima convertidora de angiotensina con el desarrollo de enfermedad coronaria en la población de Montería.

Materiales y métodos

Casos

La población de estudio se conformó con 70 pacientes (24 mujeres, 46 hombres) con enfermedad coronaria confirmada por electrocardiograma, remitidos al Centro de Cardiagnóstico de Córdoba Ltda., con ausencia de antecedentes clínicos de diabetes y/o insuficiencia renal. El estudio fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Sinú (sede Montería).

Controles

La muestra control correspondió a 70 individuos voluntarios (34 mujeres, 36 hombres) con ausencia de antecedentes cardiovasculares y sin ningún tipo de relación filial. Estos se escogieron luego de haber muestreado los individuos casos a fin de parearlos con las edades registradas para esta población. Si bien el número de hombres y mujeres no fue el mismo para ambos grupos, no se consideró necesario un pareo por sexo debido a que sus altas proporciones otorgaron validez estadística.

Tanto para casos como controles se obtuvo firma previa de consentimiento informado para la aprobación de la inclusión en la investigación; así mismo, les fueron registrados datos demográficos que incluyeron: edad, sexo, ocupación, nivel de educación, hipertensión arterial, sedentarismo, índice de masa corporal (IMC), consumo de tabaco y de anticonceptivos. Para el IMC se estimó la obesidad como un índice superior a 30. Se consideró fumador a cualquier individuo que consumiera al menos un cigarrillo por semana y sedentario a aquellos que practicaran actividad física con una frecuencia menor a tres veces por semana.

Determinación del polimorfismo inserción/delección de la enzima convertidora de angiotensina

El ADN genómico se extrajo a partir de leucocitos de sangre periférica empleando el kit DNAzol® BD Reagent (Genomic DNA Isolation Reagent), siguiendo las instrucciones del fabricante. El polimorfismo del gen de la enzima convertidora de angiotensina fue detectado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los

primers: forward 5' CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3' y reverse 5' - GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGAT 3' descritos por Rigat y colaboradores (1992) (6). La reacción fue realizada en un volumen final de 25 μ L, conteniendo 0,2 mM de cada dNTP, 3 mM de MgCl₂, 1X de PCR buffer, 12,5 pmol de cada primer, 1 μ g de ADN y 0,5 unidades de Taq polimerasa.

La amplificación fue corrida en un termociclador MyCycler™ (BioRad, BioRad Laboratories, Richmond, Calif.) bajo las siguientes condiciones: 32 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 minuto, anillamiento a 60°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto. Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1,5% a 90 voltios por 70 minutos y visualizados mediante tinción con bromuro de etidio (figura 1). La interpretación de genotipos se basó en el tamaño de los productos de PCR; para este polimorfismo la PCR genera un fragmento de 190 pb en caso de delección (D) y otro de 490 pb en caso de inserción (I).

Análisis estadístico

Para el análisis de datos se empleó el programa estadístico SAS versión 9,1 para Windows (17). Se consideraron diferencias estadísticas significativas si $p < 0,05$. Las variables categóricas fueron comparadas mediante χ^2 . Las diferencias en las variables continuas se evaluaron con t de Student. Las frecuencias alélicas y genotípicas se obtuvieron de forma manual; el equilibrio de Hardy – Weinberg se evaluó mediante χ^2 .

La distribución de genotipos entre los grupos de estudio se comparó mediante tablas de contingencia de 2 x 3

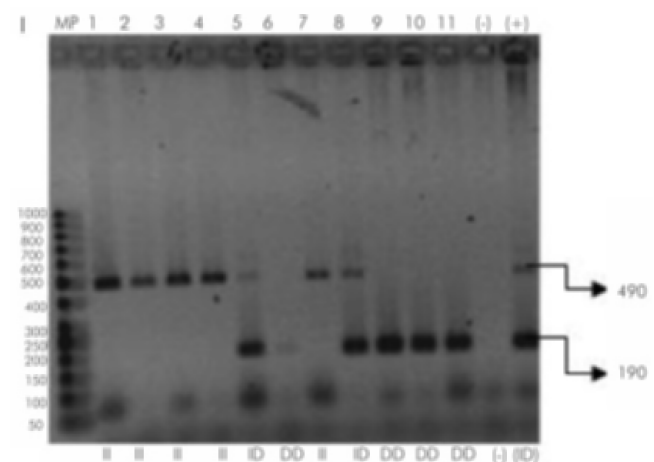


Figura 1. Genotipos polimorfismo inserción/delección del gen enzima convertidora de angiotensina en gel de agarosa al 1,5%.

y análisis X^2 . Se ajustó una regresión logística múltiple a fin de considerar el efecto de determinados factores de riesgo modificables sobre el padecimiento de evento coronario y la cuantificación de este mediante el cálculo de razón de disparidad. En el modelo se introdujeron las variables genotipo de la enzima convertidora de angiotensina, género, rangos de edad, sedentarismo, hipertensión arterial, historia familiar de evento coronario, índice de masa corporal y tabaquismo.

Resultados

La tabla 1 detalla las características demográficas de casos y controles. El promedio del índice de masa corporal de los casos fue de $24,60 \pm 4,17$ y de los controles $24,15 \pm 4,34$. Si bien, las condiciones hipertenso y consumo de cigarrillo no muestran una diferencia significativa entre ambos grupos, los factores de riesgo sedentarismo y antecedentes familiares mostraron una frecuencia mucho mayor en casos respecto al grupo control.

Distribución del polimorfismo de la enzima convertidora de angiotensina

La distribución de los genotipos del polimorfismo de la enzima convertidora de angiotensina y las frecuencias de los alelos I y D se presentan en la tabla 2. Las frecuencias observadas y esperadas tanto para casos como controles se ajustaron al equilibrio de Hardy – Weinberg ($X^2 = 1,54$ $p = 0,05$; $X^2 = 2,78$ $p = 0,05$ respectivamente).

La distribución de los genotipos del polimorfismo de la enzima convertidora de angiotensina en casos no fue significativamente diferente a la estimada en controles ($X^2 = 3,687$, $p = 0,1583$). El genotipo más frecuente en la población total fue ID (40,71%). En pacientes con enfermedad coronaria el porcentaje con el genotipo II fue mayor que el observado en los individuos control (23%); contrario a esto, el genotipo DD presentó un menor

porcentaje en los pacientes con enfermedad coronaria (24%) comparados con los controles (39%), $p < 0,05$.

El efecto de los factores de riesgo cardiovascular, asociados al genotipo, sobre el desarrollo de la enfermedad se muestra en la tabla 3 y en la figura 2.

Respecto al sexo, los hombres tienen 3,25 veces más riesgo de sufrir un evento coronario que las mujeres, presumiblemente por el efecto protector que brindan los estrógenos a las mujeres. Fumar no mostró un aumento estadísticamente significativo del riesgo a sufrir enfermedad isquémica coronaria. Por otra parte, el sedentarismo aumenta 16,35 veces el riesgo de sufrir enfermedad coronaria en relación con personas que se ejercitan regularmente, constituyéndose en el factor de riesgo más influyente en el desarrollo de la enfermedad en la población estudiada.

La hipertensión arterial, al igual que el tabaquismo, no mostró un efecto significativo en el aumento del riesgo a desarrollar esta patología; sin embargo, de acuerdo con el nivel de significancia obtenido, aquellos individuos que sufren de hipertensión tienen 1,20 veces más riesgo de desarrollar un evento coronario. La edad se mostró directamente proporcional al riesgo de sufrir enfermedad isquémica coronaria; las personas con edades entre 40 y 59 años tienen 2 veces más riesgo de sufrir un evento coronario que aquellas menores de 40, así mismo, individuos que presentan edades entre los 60 y 69 años tienen 2,70 veces más riesgo y los mayores de 70 años tienen 3,86 veces más probabilidad de sufrir enfermedad isquémica coronaria que personas menores de 40 años. Adicionalmente, los antecedentes familiares de enfermedad coronaria aumentan en 4,09 veces el riesgo de desarrollar un evento coronario. Por último, se estimó que aumentar el IMC en una unidad incrementa 1,18 veces el riesgo de sufrir enfermedad isquémica coronaria en la población de estudio.

Tabla 1.
CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO.

	Grupo casos	Grupo control
Número	70	70
Sexo (M/F)	46/24	36/34
Antecedentes familiares	54%	27%
Hipertensión arterial	39%	26%
Consumo de cigarrillo	9%	16%
Obesidad (IMC > 30)	10%	10%
Sedentarismo	50%	9%

Tabla 2.
DISTRIBUCIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS EN CASOS Y CONTROLES.

Genotipo	Casos	Controles
DD n (%)	17 (12,14)	27 (19,29)
ID n (%)	30 (21,43)	27 (19,29)
II n (%)	23 (16,43)	16 (11,43)
Frecuencias alélicas		
D	0,457	0,421
I	0,543	0,578

Las razones de disparidad (tabla 4) indican que no existe asociación estadísticamente significativa entre el genotipo DD y el riesgo a sufrir enfermedad isquémica coronaria (razón de disparidad = 0,51, IC_{95%} 0,25 – 1,06). Sin embargo, los genotipos ID e II mostraron que son capaces de incrementar el riesgo a sufrir esta patología. Personas que presentan genotipo II tienen 32% mayor riesgo de sufrir enfermedad isquémica coronaria que aquellas con genotipo DD; a su vez, tienen 55% más riesgo de sufrir un evento isquémico comparados con los heterocigotos (ID).

Discusión

Las enfermedades coronarias constituyen un desorden multifactorial donde la interacción entre el genotipo y el ambiente desempeña un importante papel en su desarrollo. No obstante, el efecto de los diferentes factores genéticos incidentes, difiere entre poblaciones. El polimorfismo I/D del gen de la enzima convertidora de angiotensina ha sido uno de los más estudiados en relación con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares en general. Sin embargo, desde el primer reporte de la enzima convertidora de angiotensina, como marcador de riesgo de infarto del miocardio (3) y pese al gran número de estudios con diferentes diseños y en distintas poblaciones, la relación entre este polimorfismo y las enfermedades coronarias se ha mantenido bajo controversia. Como ya se citó, diversos estudios reportan la presencia del alelo D o del genotipo DD asociada con infarto del miocardio, cardiopatía coronaria y otras patologías cardiovasculares, mientras que otros estudios no han encontrado ningún tipo de asociación.

Los resultados presentados en este estudio sugieren no asociación entre la enfermedad isquémica coronaria y la presencia del genotipo DD o bien del alelo D en la población estudiada. La distribución del polimorfismo ID de la enzima convertidora de angiotensina en los pacientes con enfermedad coronaria no fue significativamente diferente a la del grupo control (tabla 4). En contraste, la frecuencia del alelo D fue menor en el grupo de pacientes que en los controles. Este resultado concuerda con los estudios realizados por Shaffie y colaboradores (18), Keavney y colaboradores (19), van Bockxmeer y colaboradores (20) y Mannami y colaboradores (21), aunque, de acuerdo con Keavney y su equipo (19), el resultado agregado de 35 estudios pequeños ($n < 200$ casos con enfermedad coronaria), es semejante al del estudio que generó la hipótesis sobre el genotipo DD de la enzima convertidora de angiotensina.

Se sugiere que las discrepancias entre los diferentes estudios pueden deberse a una mala documentación de los casos por carencia de angiografías coronarias, a diferentes criterios de selección del grupo control y del grupo de pacientes o a diferencias en el *pool* genético de las poblaciones analizadas (22, 16). En efecto, frente a este último aspecto, un estudio desarrollado por van Brockxmeer y colaboradores (20) con individuos australianos, determinó en primera instancia no asociación en individuos caucásicos, sin embargo, cuando en el análisis se incluyeron aborígenes australianos e individuos asiáticos, el riesgo de enfermedad coronaria fue considerablemente más alto en individuos con genotipo DD (23).

Tabla 3.
ANÁLISIS DE REGRESIÓN LOGÍSTICA MÚLTIPLE AJUSTADO. RAZÓN DE DISPARIDAD DE ENFERMEDAD CORONARIA PARA EL POLIMORFISMO ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA Y FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR TRADICIONALES.

Factor de riesgo	Razón de disparidad	Intervalo de confianza 95%	X ²	p
Genotipo ACE DD vs. II	0,29	0,09 – 0,96	4,12	0,0424
Genotipo ACE ID vs. II	0,50	0,17 – 1,44	1,67	0,1961
Sexo (hombre vs. mujer)	3,25	1,28 – 8,28	6,13	0,0133
Rangos de edad (40-49 vs. menor de 40)	2,00	0,36 – 11,22	0,62	0,4319
Rangos de edad (50-59 vs. menor de 40)	2,01	0,41 – 9,81	0,74	0,3895
Rangos de edad (60-69 vs. menor de 40)	2,70	0,57 – 12,83	1,56	0,2113
Rangos de edad (69+ vs. menor de 40)	3,86	0,70 – 21,23	2,41	0,1207
Sedentarismo	16,35	5,20 – 51,43	22,83	< 0,0001
Hipertensión arterial	1,20	0,45 – 3,20	0,14	0,7084
Historia familiar	4,09	1,60 – 10,43	8,70	0,0032
IMC	1,18	1,02 – 1,35	5,30	0,0213
Tabaquismo	2,18	0,5926 – 8,00	1,37	0,2411

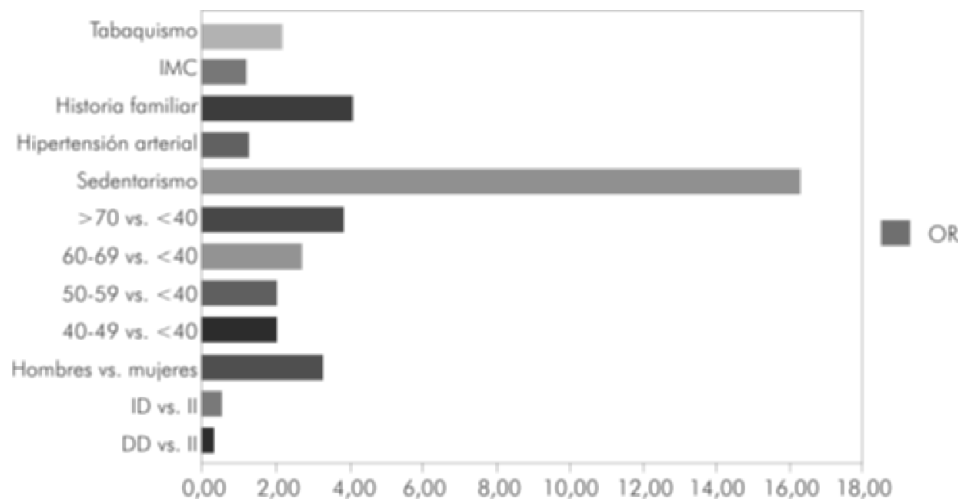


Figura 2. Comportamiento de las razones de disparidad para enfermedad isquémica coronaria de acuerdo con los genotipos de enzima convertidora de angiotensina y factores de riesgo cardiovascular.

Tabla 4.
RAZÓN DE DISPARIDAD PARA ENFERMEDAD ISQUÉMICA CORONARIA ASOCIADA A LOS GENOTIPOS DE ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA.

Genotipo	Casos n (%)	Controles n (%)	Razón de disparidad (IC _{95%})
II	23 (32,9)	16 (22,9)	1,65 (0,78 – 3,49)
ID	30 (42,9)	27 (38,6)	1,19 (0,61 – 2,34)
DD	17 (24,3)	27 (38,6)	0,51 (0,25 – 1,06)

El análisis simultáneo de varios factores de riesgo cardiovascular convencionales, indicó que el sedentarismo, los antecedentes familiares de enfermedad coronaria y la edad constituyen factores de riesgo independientes para enfermedad coronaria en la población estudiada. El tabaquismo y la hipertensión arterial no mostraron un efecto significativo sobre la frecuencia de los genotipos II y DD. Esta no significancia podría estar influenciada por factores genéticos inherentes al individuo que enmascaran el efecto de estos factores de riesgo y no permiten observar el efecto real de estas variables sobre la enfermedad.

Conclusiones

En contraste con múltiples reportes de asociación entre la variable D del polimorfismo inserción/delección del gen de la enzima convertidora de angiotensina y diferentes enfermedades cardiovasculares, este estudio sugiere

que en la población de Montería no existe asociación entre el genotipo DD y el desarrollo de complicaciones coronarias.

Agradecimientos

Los autores agradecen especialmente a cada uno de los pacientes e individuos controles que voluntariamente hicieron parte del estudio. Así mismo, a los doctores Vanessa Otero Jiménez, Francisco Alberto Buelvas y María Mónica Cermeño por su colaboración en la toma de muestras.

Bibliografía

1. Organización Mundial de la Salud (sede Web). Centro de prensa. Enfermedades cardiovasculares, Nota informativa. Septiembre de 2011. Fecha de acceso: 9 de abril de 2012. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/index.html>
2. Ministerio de la protección social. Norma técnica para la Prevención de enfermedad crónica y mantenimiento de la salud en el individuo sano mayor de 45 años. Bogotá, Colombia. 2008.
3. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature*. 1992; 359 (6396): 641-4.
4. de la Serna F, Peral de Bruno M. Fisiopatología de la insuficiencia cardíaca: Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona. En: de la Serna F. *Insuficiencia Cardíaca Crónica*. 3a. Edición. Argentina: Federación Argentina de Cardiología; 2010. p. 49-82.
5. Mattei MG, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Roeckel N, Corvol P, Soubrier F. Angiotensin-I converting enzyme gene is on chromosome 17. *Cytogenet Cell Genet*. 1989; 51: 1041.
6. Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (deipeptidyl carboxypeptidase 1). *Nucleic Acids Res*. 1992; 20 (6): 1433.
7. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotevlev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell*. 1992; 71 (1): 169-80.

8. Mehri S, Baudin B, Mahjoub S, Zaroui A, Bénéteau-Burnat B, Mechmeche R, et al. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion gene polymorphism in a Tunisian healthy and acute myocardial infarction population. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2010; 14 (1): 85-91.
9. Vargas-Alarcón G, Zamora J, Sánchez-García S, Rodríguez-Pérez JM, Cardoso G, Carlos Posadas-Romero. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) insertion/deletion polymorphism in Mexican patients with coronary artery disease. Association with the disease but not with lipid levels. *Experimental and Molecular Pathology* 2006; 81: 131-135.
10. Shafiee SM, et al. Angiotensin converting enzyme DD genotype not associated with increased risk of coronary artery disease in the Iranian population. *Pathophysiology* 2010; 17: 163-167.
11. Schunkert H, Hense HW, Holmer SR, Stender M, Perz S, Keil U, et al. Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med*. 1994; 330 (23): 1634-8.
12. Srivastava K, Sundriyal R, Meena PC, Bhatia J, Narang R, Saluja D. Association of angiotensin converting enzyme (insertion/deletion) gene polymorphism with essential hypertension in northern Indian subjects. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2012; 16 (3): 174-7.
13. Li Y. Angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and essential hypertension in the Chinese population: a meta-analysis including 21,058 participants. *Intern Med J*. 2012; 42 (4): 439-44.
14. Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. ACE gene polymorphism in cardiovascular disease: meta-analyses of small and large studies in whites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20 (2): 484-92.
15. Canavy I, Henry M, Morange PE, Tiret L, Poirier O, Ebagosti A, et al. Genetic polymorphisms and coronary artery disease in the south of France. *Thromb Haemost*. 2000; 83 (2): 212-6.
16. Pfohl M, Koch M, Prescod S, Haase KK, Häring HU, Karsch KR. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism, coronary artery disease and myocardial infarction. An angiographically controlled study. *Eur Heart J*. 1999; 20 (18): 1318-25.
17. Barr AJ, Goodnight JH. *Statistical Analysis Systems Version 9.1*; North Carolina State University Raleigh: Department of Statistics; 1972.
18. Shafiee SM, Firoozrai M, Salimi S, Zand H, Hesabi B, Mohebbi A. Angiotensin converting enzyme DD genotype not associated with increased risk of coronary artery disease in the Iranian population. *Pathophysiology*. 2010; 17 (3): 163-7.
19. Keavney B, McKenzie C, Parish S, Palmer A, Clark S, Youngman L, et al Large-scale test of hypothesised associations between the angiotensin-converting-enzyme insertion/deletion polymorphism and myocardial infarction in about 5000 cases and 6000 controls. *International Studies of Infarct Survival (ISIS) Collaborators. Lancet*. 2000; 355 (9202): 434-42.
20. van Bockxmeer FM, Mamotte CD, Burke V, Taylor RR. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and premature coronary heart disease. *Clin Sci (Lond)*. 2000; 99 (3): 247-51.
21. Mannami T, Katsuya T, Baba S, Inamoto N, Ishikawa K, Higaki J, Ogihara T, Ogata J. Low potentiality of angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism as a useful predictive marker for carotid atherogenesis in a large general population of a Japanese city: the Suita study. *Stroke*. 2001; 32 (6): 1250-6.
22. Wang XL, McCredie RM, Wilcken DE. Genotype distribution of angiotensin-converting enzyme polymorphism in Australian healthy and coronary populations and relevance to myocardial infarction and coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996; 16 (1): 115-9.
23. Bautista LE, Ardila ME, Gamarra G, Vargas CI, Arenas IA. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and risk of myocardial infarction in Colombia. *Med Sci Monit*. 2004; 10 (8): CR473-9.