

Relación entre la enzima convertidora de angiotensina, polimorfismo I/D, y obstrucción coronaria en una población del Quindío, Colombia

Andrea Cardona-Barreto¹, Alejandra María Giraldo^{1,3}, Nelsy Loango^{1,2}, Hugo Castaño¹, Patricia Landazuri¹

¹Grupo de Investigación en Enfermedades Cardiovasculares y Metabólicas. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad del Quindío. Armenia-Quindío, Colombia.

²Programa de Biología. Facultad de Ciencias Básicas y Tecnologías. Universidad del Quindío. Armenia-Quindío, Colombia.

³Programa de Licenciatura en Biología y Educación ambiental. Facultad de Educación. Universidad del Quindío. Armenia-Quindío, Colombia.

*plandazu@uniquindio.edu.co

Recibido: 15-08-2011; Aceptado: 08-11-2011

Resumen

En varios estudios la actividad de enzima convertidora de angiotensina (ECA) en suero y el polimorfismo inserción/delección (I/D) se han relacionado con enfermedad cardiovascular. **Objetivo.** Relacionar la actividad de la ECA y el polimorfismo I/D del gen de la enzima en pacientes con obstrucción coronaria documentada por angiografía. **Materiales y métodos.** La muestra la constituyeron pacientes que asistieron a un centro de hemodinámica del Quindío, por necesidad de una angiografía coronaria. La actividad de la enzima fue medida por espectrofotometría y el genotipo I/D por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. **Resultados.** 542 pacientes fueron divididos en dos grupos: individuos con obstrucción coronaria $\geq 50\%$, (OC ≥ 50) e individuos con obstrucción coronaria menor al 50%, (OC $< 50\%$). La actividad de ECA en suero en la población general fue más alta en los individuos con polimorfismo DD, seguido por ID e II con diferencias significativas. Para los dos grupos de estudio el patrón fue similar, pero sin diferencias significativas, aunque la actividad de la enzima siempre fue más alta en los individuos con OC $\geq 50\%$ comparados con los pacientes con OC $< 50\%$. El genotipo ID fue el genotipo más frecuente en los dos grupos. No se encontraron diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas en los grupos de estudio. **Conclusiones.** Se encontraron diferencias significativas en la actividad de la ECA de acuerdo al genotipo. Este estudio, no encontró relación entre actividad de la enzima, los polimorfismos y la obstrucción coronaria.

Palabras clave: Enzima convertidora de angiotensina, obstrucción coronaria, polimorfismo ID, angiotensina.

Abstract

Relationship between angiotensin-converting enzyme, I/D polymorphism, and coronary obstruction in a population of Quindío, Colombia. Angiotensin-converting enzyme (ACE) activity in serum and insertion/deletion (I/D) polymorphism have been associated to cardiovascular disease in several studies. **Objective.** To find a relationship between ACE activity and I/D polymorphism in the enzyme gene in patients with coronary obstruction revealed by angiography. **Materials and methods.** Sample comprised patients attending a hemodynamics center in Quindío in need of a coronary angiography. ACE activity was measured by spectrophotometry and the I/D genotype determined by polymerase chain reaction. **Results.** 542 patients were divided into two groups: individuals with coronary obstruction higher than or equal to 50% (OC ≥ 50) and individuals with coronary obstruction less than 50% (CO $< 50\%$). Serum ACE activity in the global population was higher in individuals with DD polymorphism, followed by ID and II with significant differences. A similar pattern was shown in both study groups but without significant differences, although enzyme activity was always higher in individuals with OC $\geq 50\%$ compared with patients with OC $< 50\%$. ID genotype was the most frequent in both groups. No differences were found in allele and genotype frequencies in the study groups. **Conclusions.** Significant differences in ACE activity were found according to genotype. Our study did not find any relationship between ACE activity, I/D polymorphisms and coronary obstruction.

Key words: angiotensin-converting enzyme, coronary obstruction, ID polymorphism, angiotensin.

Resumo

Relação entre enzima conversora de angiotensina, polimorfismo I/D e obstrução coronária numa população de Quindío, Colômbia. Em vários estudos a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) no soro e o polimorfismo inserção/deleção (I/D) têm sido associados com doença cardiovascular. **Objetivo.** Relacionar a atividade da ECA e o polimorfismo I/D do gene da enzima em pacientes com obstrução coronariana documentada por angiograma. **Materiais e métodos.** A amostra foi composta por pacientes que assistiram num centro de hemodinâmica do Quindío, por necessidade de um angiograma coronario. A atividade da enzima foi medida por espectrofotometria e o genótipo I/D através da reação em cadeia da polimerase. **Resultados.** 542 pacientes foram divididos em dois grupos: indivíduos com obstrução coronária $\geq 50\%$ (OC ≥ 50) e indivíduos com obstrução coronariana inferior a 50% (OC $< 50\%$). A atividade de ECA no soro na população em geral foi maior em indivíduos com polimorfismo DD, seguido pelo ID e II com diferenças significativas. Para ambos os grupos de estudo o padrão foi semelhante, mas sem diferenças significativas, embora a atividade da enzima foi sempre maior em indivíduos com OC $\geq 50\%$ em comparação com pacientes com OC $< 50\%$. O genótipo ID foi o genótipo mais freqüente nos dois grupos. Não houve diferenças nas freqüências alélicas e genótípicas nos grupos de estudo. **Conclusões.** Houve diferenças significativas na atividade da ECA segundo o genótipo. Este estudo não encontrou relação entre a atividade da enzima, os polimorfismos e a obstrução coronariana.

Palavras-chave: enzima conversora da angiotensina, obstrução coronária, polimorfismo ID, angiotensina.

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares son un problema mayor de salud pública en todo el mundo (1). En la actualidad, la enfermedad coronaria se considera la principal causa de muerte en los países industrializados y en Colombia de acuerdo con estadísticas del Ministerio de Protección Social; en el país los departamentos con mayor tasa de mortalidad por enfermedad coronaria son, en su orden: Caldas, Boyacá, Quindío y Tolima (2).

Los factores de riesgo clásicos asociados al desarrollo de la enfermedad cardiovascular son el estilo de vida, tabaquismo, hipertensión arterial, dislipidemias y diabetes mellitus; sin embargo, al ser una enfermedad multifactorial, el estudio del componente genético es de importancia para comprender las diferencias alélicas entre los grupos poblacionales (3). El comportamiento genético de la enfermedad coronaria ha sido ampliamente evaluado en multitud de estudios, los cuales han demostrado que hay susceptibilidad genética al padecimiento de la enfermedad, que no puede explicarse solo por factores de riesgo individual y ambiental y que dicha susceptibilidad está fundamentada en variaciones en los genes involucrados con la enfermedad coronaria (4).

Entre los genes candidatos relacionados con la enfermedad coronaria, se encuentran los genes del Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA), de todos ellos el polimorfismo Inserción/Delección (I/D) del gen de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), ha adquirido singular importancia en el estudio de la enfermedad coronaria, dado su papel relevante en la modulación de la presión sanguínea y

en la acción de remodelación cardiaca que tiene su producto, la Angiotensina II (AII) (5).

Es conocido que el alelo D se acompaña de concentraciones plasmáticas y tisulares más elevadas de actividad de la ECA que el alelo I (6), por lo tanto la actividad en plasma de la ECA es elevada en sujetos homocigotos para la delección (DD) comparado con los heterocigotos (ID) o sujetos homocigotos para la inserción (II). Por lo tanto, el genotipo DD parece incrementar significativamente el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares (7) debido a su relación con una mayor producción de AII y las acciones hipertensivas y aterogénesis de la misma (8).

Debido a que el Quindío presenta una de las mayores tasas de mortalidad relacionada con enfermedad coronaria, este estudio pretendió relacionar factores genéticos (polimorfismo del gen de la ECA) y Bioquímicos (actividad de ECA en plasma) en pacientes con obstrucción coronaria documentada por angiografía.

Materiales y métodos

Se incluyeron en el estudio pacientes de ambos sexos admitidos de manera secuencial en el Centro de Hemodinámica del Quindío entre el 2008 y el 2009, con necesidad clínica de una angiografía coronaria, e historia de isquemia cardiaca y al menos un evento cardiovascular mayor. No se incluyeron pacientes embarazadas, o pacientes con disbetalipoproteinemia, hiperlipidemia, hipertensión no controlada, daño renal, o síndrome nefrótico idiopático

no tratado. Todos los pacientes fueron incluidos prospectivamente, antes de la angiografía firmaron un consentimiento informado y llenaron una encuesta para obtener los datos demográficos básicos (edad, sexo, dieta, los antecedentes médicos personales y familiares y otros factores de riesgo cardiovascular). El estudio fue aprobado por el comité de bioética de la Universidad del Quindío.

Angiografía coronaria

Fue realizada de acuerdo a métodos estándar por un médico intervencionista. Las lesiones fueron evaluadas por el método de Análisis cuantitativo coronario (QCA) por dos observadores independientes que desconocían los resultados del laboratorio. La variabilidad inter-observador fue de 3,8%. La enfermedad obstructiva de las arterias coronarias se definió como una o más estenosis $\geq 50\%$ en una arteria coronaria mayor o en cualquiera de sus ramificaciones principales. Este procedimiento permitió clasificar los pacientes en dos grupos. Un primer grupo con obstrucción coronaria mayor e igual al 50% (OC $\geq 50\%$) y un segundo grupo con obstrucción coronaria menor al 50% (OC $< 50\%$).

Muestras sanguíneas y análisis bioquímicos.

Las muestras fueron obtenidas después de 8-12 horas de ayuno durante el procedimiento angiográfico y enviada al laboratorio. El personal del laboratorio no conocía la información de los pacientes y solo podía identificar las muestras por un número. Para el análisis de la ECA se usó sangre colectada en tubo seco. El suero se obtuvo por centrifugación a 2500 g por 15 minutos, a 4°C, separado en microtubos y almacenado a -20°C hasta su uso. La actividad de la ECA fue determinada en suero, usando el método de Ronca-Testoni (9) modificado por el laboratorio de Bioquímica y Genética de la Universidad del Quindío el cual se basa en la hidrólisis enzimática del Furilacrilóil-L-Fenilalanil-glicil-glicina (FAPGG), por la ECA del suero, hasta Furilacrilóil-L-Fenil (FAP) y glicilglicina (Gly-Gly). Brevemente: a 25 μ l del suero se le adicionaron 225 μ l de agua destilada y 250 μ l de buffer ensayo (0,8mM FAPGG, 400 mM NaCl, 50mM de HEPES, pH 8,25 \pm 0,2). Se incubó a 37°C durante 20 minutos. Para detener la reacción enzimática, se disminuyó la temperatura a $< 24^\circ\text{C}$. Finalmente se leyó la absorbancia a 345nm utilizando un espectrofotómetro Génesis 5; como blanco se utilizó el mismo suero con EDTA 3,3mM y se procedió bajo las mismas condiciones que las muestras. Todos los ensayos fueron hechos por triplicado. La actividad de la enzima es expresada en Unidades Internacionales/litro (UI/L).

Análisis molecular: polimorfismo I/D

La extracción de ADN se realizó utilizando el estuche Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) en sangre total siguiendo las instrucciones del fabricante. El polimorfismo del gen de la ECA fue determinado por el método descrito por Rigart y colaboradores (10), utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Brevemente: a 200 ng de ADN genómico se le agregó 0.5 mM de (dNTP's), 2,5 mM de MgCl_2 , Buffer de PCR 10X, 10 pmol de los siguientes oligonucleótidos: (ACE1) CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT, (ACE2) GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT y 2,0U de Taq DNA polimerasa (DNA polymerase Invitrogen®) para un volumen final de 25 μ l. La amplificación del ADN se hizo en un termociclador MJ Research PTC-100 con los siguientes ciclos termales:

Desnaturalización inicial a 94°C durante 1 minuto, seguida por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineamiento a 63°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 2 minutos y un ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos amplificados obtenidos por PCR fueron verificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y visualizados por medio de un transiluminador de rayos UV. El producto esperado fue una banda de 190 pb que indica la ausencia de la inserción (genotipo DD), una banda de 490 pb que indica la presencia de la inserción (genotipo II) y la presencia de las dos bandas que indica el genotipo heterocigoto (genotipo ID). Para verificar todas las muestras DD, se realizó una segunda PCR con un primer específico para la inserción R 5'CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT3' y F 5'TTTGAGACGGAGTCTCGCTC3', reduciendo así, la subestimación de los heterocigotos.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo con el total de los datos obtenidos y se calcularon las medias y la desviación estándar de las variables bioquímicas. Posteriormente se realizó una prueba de Man-Whitney en las variables no paramétricas para establecer las diferencias significativas entre los grupos de estudio (OC $\geq 50\%$ y OC $< 50\%$) y una prueba T-student con las variables paramétricas para establecer la misma diferencia. Además, se realizó la prueba de Kruskal Wallis para identificar las diferencias entre el género y la actividad de ECA.

Las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo estudiado se determinaron por conteo directo y se realizó el test de chi-cuadrado para establecer si la población se

encontraba en equilibrio Hardy-Weinberg. Para comparar las diferencias del polimorfismo y los alelos entre los grupos estudiados, se realizó una prueba de Man-Whitney. Se realizó la prueba de Kruskal Wallis y Anova de una vía (variables no paramétricas y paramétricas respectivamente) para determinar la relación entre el polimorfismo con la actividad de ECA en suero y el género. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa SPSS versión 18.0.

Resultados

Se evaluaron 542 individuos (350 hombres y 192 mujeres) con edades comprendidas entre los 22 y 86 años.

Análisis angiográfico

De los 542 pacientes, 346 (63,8%) tenían OC \geq 50% (216 hombres y 130 mujeres) y 196 (36,2%) presentaron OC<50% (134 hombres y 62 mujeres). La media de edad en ambos grupos fue similar (62,2 años, y 62,0 años) respectivamente.

Actividad de ECA

La actividad de la ECA en el suero de los pacientes con OC \geq 50% fue más alta que en los pacientes con OC<50% (media de 72,8 UI/L y 68,7UI/L), respectivamente sin diferencias significativas.

En relación con la actividad de ECA, en la población general se encontraron diferencias significativas entre géneros ($p=0,045$), presentándose mayor actividad de ECA en los hombres, que en las mujeres, el estudio por grupos de obstrucción y género no mostró diferencias significativas (Tabla 1).

Frecuencias alélicas y genotípicas

Las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo I/D en la población estudiada se muestran en la tabla 2. La prueba chi-cuadrado indicó que la población se encontraba en equilibrio Hardy-Weinberg ($p=0,000$). Es decir, no se encontraron diferencias significativas entre los valores

Tabla 1. Actividad de la enzima convertidora de angiotensina por géneros y grupos de estudio

Grupos	Actividad de la ECA (UI/L)		
	Género		p
	Femenino	Masculino	
Población Total	64,9 \pm 50,0	75,0 \pm 63,4	0,045
OC \geq 50%	64,0 \pm 45,2	78,0 \pm 71,1	NS
OC <50%	66,7 \pm 59,2	69,6 \pm 48,3	NS

ECA= enzima convertidora de angiotensina. OC= obstrucción coronaria. NS= no significativo.

Tabla 2. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo I/D del gen la enzima convertidora de Angiotensina

Genotipos	Total (n= 542) (%)	OC \geq 50% (n=346) (%)	OC<50% (n=196) (%)	p
DD	140 (25,8)	77 (22,2)	63 (32,1)	NS
ID	254 (46,8)	172 (49,7)	82 (41,8)	
II	148 (27,3)	97 (28,0)	51 (26,0)	
Alelos				
D	534 (49,2)	326 (47,0)	208 (53,1)	NS
I	550 (50,7)	366 (52,8)	184 (46,9)	

OC= obstrucción coronaria. NS= no significativo.

observados (DD: 25,8%, II: 27,3% e ID: 46,8%) en las frecuencias genotípicas y los valores esperados (Homocigotos 25% cada uno y Heterocigoto 50%).

No se encontraron diferencias significativas en la distribución de los alelos.

Polimorfismo I/D y actividad de ECA.

La actividad de ECA en suero de la población general fueron más altos en los individuos con polimorfismo DD, seguido por ID e II, con diferencias significativas ($p=0,019$) entre genotipos. Al realizar el mismo análisis en cada uno de los grupos estudiados, la actividad de ECA presentó el mismo patrón de distribución, y aunque en cada genotipo la actividad de ECA fue mayor para el grupo con $OC \geq 50\%$, no se presentaron diferencias significativas al compararlos con el grupo $OC < 50\%$. (Tabla 3).

Discusión

El presente estudio confirma lo encontrado en otros trabajos, en los que la enfermedad coronaria es más predominante en el género masculino que en el femenino (11,12), similar a lo encontrado en otra región de Colombia (12), en el que se encontró que por cada mujer clasificada como de alto riesgo, hay más de nueve hombres. Ya se ha demostrado alrededor del mundo, que las mujeres tienen un menor riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular hasta llegar a la edad de la menopausia que los hombres (13).

Además de la edad y el género, existe una amplia evidencia que demuestra que los factores genéticos también contribuyen a la patogénesis de la enfermedad arterial coronaria (14). El polimorfismo inserción/delección del gen de la ECA es uno de los genes candidatos que ha sido asociado con enfermedad coronaria e infarto al miocardio en muchos estudios (14,15),

mientras que otros estudios no demuestran dicha relación (3, 16, 17). En el presente estudio, ninguno de los genotipos del polimorfismo del gen de la ECA, ni los alelos del mismo gen, presentaron relación con la obstrucción coronaria en los individuos. Estos resultados coinciden con los descritos por Salazar y colaboradores (3), en donde no encontraron asociación entre el polimorfismo del gen de la ECA y la presencia de enfermedad arterial coronaria. Por otro lado, en poblaciones al sur de la India (18), Europa (19, 20) y Japón (21) se ha revelado que el genotipo DD del gen de la ECA es un factor de riesgo para la enfermedad arterial coronaria y la hipertensión. De la misma manera, en un estudio previo realizado en un grupo de pacientes del Hospital San Juan de Dios de Armenia (22), se demostró que el alelo D más no el genotipo DD era un factor de riesgo para sufrir un primer evento coronario. La discrepancia entre los dos estudios, podría deberse entre otros factores al tamaño de la muestra, y a que en el presente trabajo se estudiaron pacientes con diferentes eventos cardiovasculares, es decir, no se estableció una relación entre obstrucción coronaria y un evento clínico específico. Sin embargo, en relación con la ECA, ésta investigación confirma lo encontrado por otras (22,18), en las cuales la actividad de la enzima varía con el genotipo. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos de pacientes, la actividad de la enzima fue mayor en los tres genotipos del grupo de pacientes con $OC \geq 50\%$. Actividad alta de ECA en plasma se ha relacionado con la enfermedad coronaria arterial, por el aumento en la actividad de AII (22). La mayoría de las acciones de la AII se ejercen sobre órganos diana, entre ellos el corazón y las arterias, participando en la regulación del tono vascular mediante su acción constrictora del músculo liso vascular (23). Además, la AII favorece el desarrollo de la aterosclerosis mediante la atracción de monocitos y la adhesión de leucocitos al endotelio vascular (24).

La actividad de la ECA encontrada en la población estudiada mostró valores significativamente más altos en hombres

Tabla 3. Actividad de la enzima convertidora de angiotensina y polimorfismo I/D del gen.

Grupos	Actividad de la ECA (UI/L)			
	Polimorfismo			p
	DD	ID	II	
Población total	81,5 ± 64,8	70,6 ± 61,1	62,8 ± 48,0	0,019
$OC < 50\%$	79,5 ± 53,7	67,7 ± 54,4	56,9 ± 42,9	NS
$OC \geq 50\%$	83,2 ± 72,9	71,9 ± 64,2	65,9 ± 50,5	NS

ECA= enzima convertidora de angiotensina. OC= obstrucción coronaria. NS= no significativo.

que en mujeres, similar a lo encontrado por Landázuri y colaboradores (25) en una población de niños y adolescentes y atribuyen la diferencia a las propiedades cardioprotectoras de los estrógenos en las mujeres, además señalan que los efectos cardiovasculares benéficos de los estrógenos pueden ser parcialmente mediados por la reducción de la actividad de ECA.

En conclusión, en el presente estudio no se encontró relación entre los genotipos, los alelos y la actividad de la ECA, y la obstrucción coronaria, aunque estos últimos fueron mayores en los pacientes con $OC \geq 50\%$. Es necesario en un estudio futuro especificar el tipo de vaso obstruido o el evento que llevó a la necesidad de la angiografía coronaria podría establecer unas mejores relaciones de significancia, sin embargo el estudio es importante en cuanto establece para la población colombiana especialmente para la Quindiana algunas medidas importantes como los polimorfismos y los valores de la enzima..

Agradecimientos

A los pacientes y controles que accedieron a participar en el proyecto. Al Magister Johanny Aguillon por su asesoría en los análisis estadísticos y al Biólogo Johny Alexander Valencia por sus valiosos aportes en la elaboración del proyecto.

Financiación

La investigación, es parte del proyecto 111340820436-304-2007 financiado por Colciencias y la Universidad del Quindío, proyecto 376-2007.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no hay conflicto de intereses

Referencias

1. Cassiani C, Cabrera A. Síndromes coronarios agudos: epidemiología y diagnóstico. *Salud Uninorte* 2009; **25** (1): 118-134.
2. Beltrán J, Beltrán R, Caicedo V, García M, García E, Gómez E, Hernández E, Herrera M, Hurtado E, Isaza E, Jaramillo M, Jaramillo C, Manzur F, Mendoza F, Merlano S, Mora G, Rada F, Saaibi J. Guías colombianas de cardiología. Síndrome coronario agudo sin elevación del ST (Angina inestable e infarto agudo del miocardio sin elevación del ST). *Revista Colombiana de Cardiología* 2008; **15** (S3): 145-150.
3. Salazar L, Hidalgo A, Arauz J, Méndez M, Cartín M, Ramos V. Polimorfismos del gen de la enzima convertidora de angiotensina (Inserción/Delección) y factores de riesgo asociados en pacientes con infarto agudo del miocardio. *Revista Costarricense de Cardiología* 2009; **11** (1): 7-12
4. Cambien F, Tiret L. Genetics of cardiovascular diseases from single mutations to the whole genome. *Circulation* 2007; **116**: 1714-1724.
5. Sayed-Tabatabaei F, Oostra B, Isaacs, Duijn C, Witteman A. ACE Polymorphisms. *Circulation Research* 2006; **98**: 1123-1133.
6. Hernández E, Medina A, Rodríguez F, Hernández O, Melián F, Delgado A, Fúza D, Anabitarte A, Rodríguez J. Relevancia de los polimorfismos génicos del sistema renina-angiotensina en la enfermedad coronaria. *Revista Española de Cardiología* 2002; **55**(2): 92-99.
7. Pirola C. Genética molecular de la hipertensión arterial esencial genes de susceptibilidad y resistencia. *Medicina* 2000; **60**: 59-66.
8. Heeneman S, Sluimer J, Daemen M. Angiotensin-converting enzyme and vascular remodeling. *Journal of the American Heart Association* 2007; **101**: 441-454.
9. Ronca-Testoni S. Direct spectrophotometric assay for angiotensin converting enzyme in serum. *Clinical Chemistry* 1983; **29**: 1093-1096.
10. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *Journal of Clinical Investigation* 1990; **86**: 1343-1346.
11. Dias A, Reis A, Saud C, Chilinque M, Leite R, Abdalah R, Ferreira M, Severo G, Cardozo C. Severidad de la lesión angiográfica coronaria y polimorfismo de la APOE en los síndromes coronarios agudos. *Arquivos Brasileiros de Cardiología* 2009; **93** (3): 217-226..
12. Jaramillo N, Torres Y, Echeverría E, Llamas A, Montoya L, Pareja D. Estudio sobre factores de riesgo cardiovasculares en una población de influencia de la Clínica las Américas. *Revista CES Medicina* 2004; **18** (2): 9-18
13. Pérez-López F, Larrad-Mur L, Kallen A, Chedraui P, Taylor H. Review: Gender differences in cardiovascular disease: hormonal and biochemical influences. *Reproductive Sciences* 2010; **17** (6): 511-531.
14. Seckin D, Ilhan N, Ozbay Y. The relationship between ACE insertion/deletion polymorphism and coronary artery disease with or without myocardial infarction. *Clinical Biochemistry* 2006; **39** (1): 50-54.

15. Acartürk E, Attila G, Bozkurt A, Akpınar O, Matyar S, Seydaoğlu G. Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene in coronary artery disease in southern Turkey. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2005; **38** (4): 486-490.
16. Agerholm-Larsen B, Nordestgaard B, Tybjaerg-Hansen A. ACE gene polymorphism in cardiovascular disease: meta-analyses of small and large studies in whites. *Journal of the American Heart Association* 2000; **20**: 484-492.
17. Zintzaras E, Raman G, Kitsios G, Lau J. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion gene polymorphic variant as a marker of coronary artery disease: A meta-analysis. *Archives of Internal Medicine* 2008; **168**: 1077-1089.
18. Pulla B, Srikanth B, Venkata K, Yasovanthi J, Munshi A, Sampath K, Sharath A, Jyothy A. Angiotensin-converting enzyme gene variant and its levels: risk factors for myocardial infarction in a South Indian population. *Singapore Medical Journal* 2010; **51**(7): 576-581.
19. Fatini C, Abbate R, Pepe G, Battaglini B, Gensini F, Ruggiano G, Gensini G, Guazzelli R. Searching for a better assessment of the individual coronary risk profile. The role of angiotensin-converting enzyme, angiotensin II type 1 receptor and angiotensinogen gene polymorphisms. *European Heart Journal* 2000; **21**: 633-638.
20. Carluccio M, Soccio M, Caterina R. Aspects of gene polymorphism in cardiovascular disease: the renin-angiotensin system. *European Journal of Clinical Investigation* 2001; **31**: 476-488.
21. Nakahara K, Matsushita S, Matsuoka H, Inamatsu T, Nishinaga M, Yonawa M, Aono T, Arai T, Ezaki Y, Orimo H. Insertion/deletion polymorphism in the angiotensin-converting enzyme gene affects heart weight. *Circulation* 2000; **101**: 148-151.
22. Loango N, Vargas R, Osorio J, Gallego M, Landázuri P. Frecuencia aumentada del alelo D y el genotipo DD del gen de la enzima convertidora de angiotensina en pacientes con un primer evento coronario. *Universitas Scientiarum* 2010; **15** (1):77-84..
23. Stanton A. Potential of renin inhibition in cardiovascular disease. *Journal of Renin Angiotensin Aldosterone System* 2003; **4**(1): 6-10.
24. Fukuhara M, Geary R, Diz D, Gallagher P, Wilson J, Glazier S, Dean R, Ferrario C. Angiotensin-converting enzyme expression in human carotid artery atherosclerosis. *Hypertension* 2000; **35**(1) (P2): 353-359.
25. Landazuri P, Granobles C, Loango N. Diferencias entre los Sexos en la Actividad de la Enzima Conversora de la Angiotensina y en la Presión Arterial en Niños: un Estudio Observacional. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2008; **91**(6): 17-23.