

El genotipo D/D del gen de la enzima conversiva de la angiotensina como factor de riesgo de reestenosis post-*stent* coronario

Eduardo Guarda, Alejandro Fajuri, Eugenio Marchant, Alejandro Martínez, Jorge Jalil, Guillermo Illanes, Andrea Vecchiola, Rosa Lazen, Alejandra Flores, Victoria Barra, Sebastián Irrarrázabal y Francisco Ilabaca

Departamento de Enfermedades Cardiovasculares.
Pontificia Universidad Católica de Chile y Clínica Antofagasta. Chile.

angiografía coronaria / angioplastia coronaria transluminal percutánea / angiotensina / bioestadística / complicaciones postoperatorias / enzima convertidora de angiotensina / estenosis coronaria / factores de riesgo / genotipos / implante de Stent

Introducción. Un número significativo de los pacientes en quienes se implanta un *stent* coronario experimentan reestenosis, la cual es secundaria a proliferación tisular. El sistema renina-angiotensina está muy involucrado en la hiperplasia neointimal. Se conoce que la enzima conversiva de la angiotensina está regulada en parte por el polimorfismo I/D del gen de esta enzima y sus concentraciones plasmáticas son mayores en los pacientes homocigotos D/D. En este trabajo se estudió la posibilidad de que el polimorfismo I/D pudiera estar relacionado con la reestenosis intra-*stent*.

Métodos. Estudiamos el polimorfismo I/D del gen de la enzima conversiva de la angiotensina en 48 pacientes consecutivos en quienes se implantó un *stent* en forma electiva, en arterias nativas y que tuvieran un reestudio angiográfico a los 6 meses. Encontramos reestenosis (definida como estenosis > 50% respecto del lumen del vaso de referencia) en 23 de los 48 pacientes. Los grupos con y sin reestenosis no diferían en variables como diabetes, colesterol plasmático o resultados inmediatos de la angioplastia.

Resultados. Encontramos que el 22,9% de los pacientes presentaba genotipo D/D; el 14,5% de los pacientes fueron I/I y el 62,5% de los pacientes eran heterocigotos I/D. Se pudo establecer que el 81,8% de los pacientes D/D desarrolló reestenosis intra-*stent*, mientras que sólo el 40,0% de los pacientes heterocigotos I/D presentaron reestenosis. Los homocigotos I/I presentaron reestenosis muy raramente (14,2%). La diferencia de incidencia de reestenosis entre los grupos fue estadísticamente significativa ($p < 0,01$).

Conclusiones. De acuerdo con estos resultados, el polimorfismo D/D del gen de la enzima conversiva de la angiotensina puede ser un factor de riesgo de reestenosis intra-*stent*, mientras que los individuos con genotipo I/I prácticamente no desarrollaron reestenosis.

Palabras clave: *Angioplastia coronaria. Stents. Reestenosis. Angiotensina. Genes.*

D/D POLYMORPHISM OF THE ACE GENE MIGHT BE A RISK FACTOR FOR IN-STENT RESTENOSIS

Introduction. Although intracoronary stenting has decreased restenosis rate compared to percutaneous balloon angioplasty, still a high number of patients develop in-stent restenosis, which is an entity primarily due to tissue proliferation. Experimental studies have indicated that the renin-angiotensin system is involved in neointimal hyperplasia. Plasma and cellular levels of ACE are associated with an I/D polymorphism in the ACE gene. Indeed, DD subjects have the higher ACE levels. The purpose of this study was to explore the possibility that the I/D polymorphism might be related with in-stent restenosis.

Methods. We studied the ACE polymorphism in 48 consecutive patients who underwent successful implantation of an elective coronary stent in native coronary vessels and had a 6 month angiographic follow up. Restenosis (50% of the reference vessel) was observed in 23/48 patients. Patients with or without restenosis did not differ in demographic or clinical variables like diabetes, plasma cholesterol levels or in quantitative angiographic parameters such as vessel reference size or minimal lumen diameter after stent implantation.

Results. I/D polymorphism was distributed as follows: 22.9% of the patients were D/D; 14.5% were I/I and 62.5% of the patients were heterozygous I/D. The presence of restenosis was strongly related with the I/D polymorphism: 81.8% of the patients with D/D genotype had restenosis, compared with 40.0% of I/D patients and only 14.2% of the I/I patients ($\chi^2 p < 0.01$).

Conclusions. In this limited cohort, homocytous D/D of the ACE gene was significantly associated with in-stent restenosis, whereas restenosis was infrequent in patients with the I/I genotype.

Key words: *Stents. Restenosis. Angiotensin. Genes. Coronary angioplasty.*

Financiado por Proyecto FONDECYT 1960919.

Correspondencia: Dr. E. Guarda.
Laboratorio de Hemodinamia. Marcoleta, 367. Santiago. Chile.
Correo electrónico: eguarda@med.puc.cl

(*Rev Esp Cardiol* 1999; 52: 475-480)

INTRODUCCIÓN

La enzima conversiva de la angiotensina (ECA) tiene un papel importante en el metabolismo de dos péptidos vasoactivos, la angiotensina II (ATII) y la bradiginina. La formación de ATII, mediada por la ECA, ha sido implicada en la formación de neointima en la reestenosis postangioplastia desde hace al menos una década¹. Powell et al popularizaron el concepto de que la ATII, por su capacidad de aumentar la proliferación de las células musculares lisas, era un péptido clave en la formación de neointima². Diversos autores demostraron que el tratamiento con inhibidores de la ECA (IECA) disminuía significativamente el tejido de neoformación en diversos modelos animales de reestenosis. Sin embargo, ensayos clínicos a gran escala, como los estudios MARCATOR y MERCATOR^{3,4}, no demostraron que el uso de IECA disminuyera la incidencia de reestenosis postangioplastia. Se han invocado dos posibles teorías para explicar esta contradicción: *a)* la dosis de IECA usada en esos modelos animales fue muy superior a la que puede ser usada

en humanos, y *b)* en humanos el mecanismo de reestenosis postangioplastia con balón sería fundamentalmente por estrechamiento del vaso, y no por proliferación celular⁵.

Si bien los *stents*, al suprimir el estrechamiento de la arteria, han logrado reducir la incidencia de reestenosis postangioplastia⁶, han creado una nueva entidad, la reestenosis intra-*stent*, en la cual el mecanismo parece depender exclusivamente de proliferación, migración de células musculares lisas y secreción de matriz extracelular. La reestenosis intra-*stent* es una entidad de difícil manejo^{7,8}, por lo cual la búsqueda de marcadores de reestenosis puede contribuir ya sea a restringir el uso de *stents* a ciertos pacientes, o a usar cierto tipo de terapia que pueda prevenir la formación de neointima en aquellos pacientes que aparezcan como susceptibles. En los últimos años se ha identificado al polimorfismo I/D del gen de la ECA como un potencial marcador de diversos eventos cardiovasculares, como infarto agudo de miocardio (IAM), hipertensión arterial y reestenosis postangioplastia con balón^{9,10}. Este polimorfismo se caracteriza por la pre-

TABLA 1
Características basales y medicamentos
postangioplastia

| | DD | ID | II |
|-------------------------------------|---------|----------|----------|
| Número de pacientes | 11 | 30 | 7 |
| Edad (años) | 58 ± 3 | 60 ± 2 | 62 ± 3 |
| Varones (%) | 91 | 87 | 86 |
| Fumadores (%) | 48 | 41 | 42 |
| Diabetes mellitus (%) | 19 | 14 | 17 |
| Hipertensión (%) | 25 | 32 | 29 |
| Historia familiar (%) | 35 | 27 | 32 |
| Colesterol LDL (mg/dl) | 137 ± 5 | 139 ± 4 | 127 ± 6 |
| Colesterol HDL (mg/dl) | 41 ± 3 | 47 ± 1,5 | 39 ± 3 |
| Angina estable/inestable (%) | 55/45 | 57/43 | 52/48 |
| Infarto previo (%) | 14 | 11 | 13 |
| Múltiples vasos (%) | 12 | 15 | 14 |
| Fracción de eyección (%) | 58 ± 3 | 61 ± 2 | 60 ± 1,7 |
| Arteria sometida a angioplastia (%) | | | |
| Descendente anterior | 51 | 53 | 48 |
| Coronaria derecha | 31 | 28 | 26 |
| Circunfleja | 17 | 14 | 23 |
| Características de la lesión (%) | | | |
| Tipo A | 18 | 23 | 17 |
| Tipo B | 68 | 61 | 70 |
| Tipo C | 14 | 16 | 13 |
| Tipo de <i>stent</i> (n) | | | |
| Palmaz | 1 | 7 | 1 |
| AVE | 8 | 18 | 3 |
| NIR | 2 | 5 | 3 |
| Tratamiento posterior (%) | | | |
| Antagonistas del calcio | 90 | 92 | 87 |
| β-bloqueadores | 15 | 10 | 17 |
| Inhibidores ECA | 10 | 7 | 8 |
| Hipolipemiantes | 66 | 59 | 71 |

sencia (I) o ausencia (D) de un fragmento de 287 pares de bases en el intrón 16 de este gen, localizado en el cromosoma 17q23 en humanos. El polimorfismo del gen de la ECA estaría asociado con la concentración plasmática de la ECA, caracterizada por una mayor producción de esta enzima tanto tisular como circulante en el caso del genotipo DD. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la posible asociación que pudiera existir entre reestenosis intra-*stent* y el polimorfismo I/D del gen de la ECA.

MÉTODOS

Pacientes

Se estudiaron 48 pacientes que cumplieron los siguientes criterios: angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP) con *stent* coronario electivo, lesión de novo en arteria nativa, resultado angiográfico óptimo y que tuvieran seguimiento angiográfico. La ACTP se realizó con técnicas habituales; los *stents* fueron implantados utilizando balones de alta presión, hasta obtener un resultado con estenosis residual inferior al 20%. En la [tabla 1](#) se puede apreciar que las características basales de los pacientes con distintos genotipos (DD, ID o II) no difirieron significativamente entre sí. Los pacientes permanecieron en tratamiento con aspirina de forma indefinida, ticlopidina durante 4 semanas y se dejó a criterio de los médicos tratantes el uso de otros medicamentos, como β -bloqueadores, antagonistas del calcio, hipolipemiantes u otros. La gran mayoría de los pacientes fueron tratados con antagonistas del calcio, y un reducido número de pacientes recibieron IECA (5-10 mg/día de enalapril) desde la angioplastia hasta la coronariografía de control.

Angiografía cuantitativa

La coronariografía y la angioplastia se efectuaron en un cineangiógrafo General Electric, y las películas fueron filmadas a 25 imágenes/s. Se eligieron las imágenes más representativas (postimplante de *stent* y en el seguimiento), para luego digitalizarlos por medio de un escáner Microteck Scanmaker IISp con módulo de transparencias, usando el programa PhotoShop 4.0 y un ordenador Macintosh Quadra. El módulo de transparencias permite escanear directamente la película de 35 mm, sin necesidad de realizar fotografías. Las imágenes fueron amplificadas hasta un tamaño de 700 kb (14 bit/píxel). Posteriormente se trasladaron al programa NIH-IMAGE. Tras amplificar nuevamente, se definió para cada imagen una escala según el patrón de referencia (catéter de angioplastia, o catéter diagnóstico) y se procedió a realizar las mediciones. Cada medición fue realizada en duplicado, según hemos descrito previamente¹¹.

TABLA 2
Angiografía cuantitativa de las lesiones en la angioplastia y en el seguimiento

| | Reestenosis | Sin reestenosis |
|----------------------|-------------|-----------------|
| Postangioplastia | | |
| Vaso referencia (mm) | 3,5 ± 0,08 | 3,6 ± 0,1 |
| DLM (mm) | 3,1 ± 0,09 | 3,1 ± 0,1 |
| Estenosis (%) | 11,8 ± 1,4 | 13,1 ± 1,2 |
| Seguimiento | | |
| Vaso referencia | 3,44 ± 0,1 | 3,58 ± 0,1 |
| DLM (mm) | 0,98 ± 0,09 | 2,7 ± 0,1* |
| Estenosis (%) | 72 ± 2,6 | 23,7 ± 1,8* |

*p < 0,01.

Genotipo ECA

Extracción del ADN

Se recolectó una muestra de sangre en un tubo con EDTA pH 8,0, que fue centrifugada y se eliminó el sobrenadante; las células se resuspendieron en NaCl al 0,9% frío (4 °C), repitiendo hasta eliminar los glóbulos rojos. Posteriormente se agregó ADNzol para lisar los glóbulos blancos. Luego se procedió a extraer el ADN, resuspendiéndolo en NaOH.

PCR del gen de la ECA

Se utilizaron 2 μ l del ADN extraído. Para el estudio de este polimorfismo se usó la técnica de Rigat et al¹². Los *primers* 5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3' y 5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T-3' fueron usados como *sense* y *antisense*, respectivamente. La PCR se realizó con una solución que contenía 2 μ l del ADN extraído, 8 μ l de dNTPs 1,25 mM, 1,5 μ l MgCl₂ 50 mM, 2 μ l de *sense* (5 μ M), 2 μ l de *antisense* 5 μ M, 1 μ l Taq polimerasa 1U/ μ l, y tampón hasta completar 50 μ l. La solución fue desnaturalizada a 94 °C durante 5 min. El termociclador (Perkin Elmer) fue programado con los siguientes ciclos: 94 °C durante 1 min, 60 °C durante 1 min, 72 °C durante 1 min, durante 30 ciclos, 72 °C durante 10 min y posteriormente a 4 °C durante 10 min. Los productos de la amplificación fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa y luego fueron visualizados con bromuro de etidio y fotografiados. La calificación del polimorfismo fue realizada en duplicado desconociendo la presencia o la ausencia de reestenosis.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan en media \pm error estándar. Las variables continuas fueron comparadas mediante la prueba de la t de Student para medidas independientes, mientras que las posibles diferencias entre

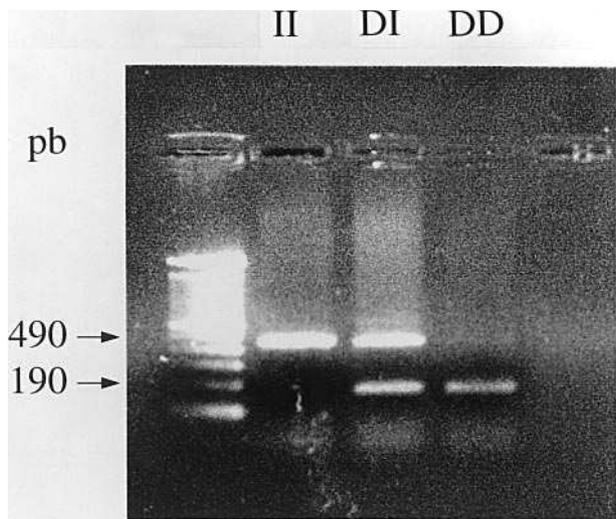


Fig. 1. Se observa el aspecto típico de los diferentes genotipos descritos en este trabajo.

las variables categóricas fueron analizadas mediante la prueba de la χ^2 .

RESULTADOS

Angiografía cuantitativa

Las causas de reestudio coronario en ambos grupos de pacientes fueron diversas. En el grupo con reestenosis se reestudieron 17 pacientes por dolor torácico, 3 por IAM reciente, 1 por test de esfuerzo positivo y 1 por control electivo asintomático. De los pacientes sin reestenosis, 15 se reestudieron por dolor torácico, 10 fueron controles asintomáticos y 1 por test de esfuerzo positivo. El tiempo promedio de reestudio fue $7,9 \pm 1,2$ meses en el grupo con reestenosis y de $6,5 \pm 0,6$ meses en el grupo sin reestenosis. Hubo 22 casos con reestenosis angiográfica, definida como estenosis superior al 50% del vaso de referencia por angiografía cuantitativa (tabla II).

Genotipo ECA

En la figura 1 se observa el aspecto típico de los diferentes genotipos descritos en este trabajo. Puede observarse que el alelo de inserción I se detecta como una banda a 490 pb, mientras que el alelo D se presenta como una banda de 190 pb. Los heterocigotos I/D expresan ambas bandas.

Del total de pacientes, el 22,9% (11/48) presentó genotipo D/D, el 14,5% (7/48) genotipo I/I y 30/48 (62,5%) presentó genotipo I/D.

En la tabla 3 se puede apreciar que el 81,8% (9/11) de los pacientes con genotipo D/D presentaron reestenosis, mientras que sólo el 14,2% (1/7) con genotipo I/I y el 40,0% (12/30) de los pacientes

TABLA 3
Distribución del polimorfismo de la ECA en pacientes con y sin reestenosis

| | Reestenosis | Sin reestenosis |
|-----|-------------|-----------------|
| I/I | 1 | 6 |
| I/D | 12 | 18 |
| D/D | 9 | 2 |

$\chi^2 = p < 0,01$.

con genotipo I/D presentaron reestenosis angiográfica ($p < 0,01$).

DISCUSIÓN

En la reestenosis postangioplastia coronaria existen elementos característicos como la proliferación y la migración de células musculares lisas y/o de miofibroblastos desde la adventicia y capa media hacia la subíntima, seguidas de una gran acumulación de elementos de la matriz extracelular¹³; entre ambas constituyen la neoíntima. Aunque ciertamente influyen fenómenos locales como el grado de agresión local, el tipo de angioplastia (balón, *stent*, rotablator, etc.), para el caso de la angioplastia coronaria es un hecho clínico evidente de que algunos pacientes, habiendo sido tratados de igual manera, evolucionan en forma muy diferente, algunos perfectamente (sin reestenosis) mientras que otros desarrollan una gran respuesta tisular, cuya manifestación es la reestenosis. Desde que se comprobó que la reestenosis era el punto débil de la angioplastia, se ha intentado identificar marcadores de riesgo de reestenosis para concentrar esfuerzos en aquellos pacientes más susceptibles de presentarla. Existen ciertos factores que han aparecido reiteradamente como predictores de reestenosis como el tamaño del vaso de referencia inferior a 2,7 mm, placas largas y diabetes mellitus. Varios otros factores han quedado descartados debido a que han demostrado su menor consistencia en distintos estudios.

Existen otras líneas de investigación que buscan marcadores genéticos que permitan seleccionar mejor las intervenciones que sean más adecuadas para determinados pacientes. Es muy posible que existan ciertas características hereditarias que predispongan al organismo a reaccionar frente a diversas agresiones, como el balón o el *stent* intracoronario. Esta diferente respuesta a la agresión se observa claramente en la gran variación que puede observarse en distintos sujetos en respuesta a una herida cutánea, que oscila desde una cicatrización perfecta en algunos individuos hasta la aparición de un queloide en otros. Poder identificar genes que influyen sobre estas respuestas puede ser de gran ayuda para seleccionar a los pacientes con mejores resultados frente a ciertas intervenciones, o que obliguen a tomar mayores pre-

cauciones para protegerlos de posibles evoluciones poco satisfactorias.

Recientemente se han publicado estudios que han implicado a variantes alélicas del gen de la ECA en diversas afecciones cardiovasculares como infarto de miocardio e hipertensión arterial^{9,14}. La explicación fisiopatológica parece estar relacionada con una mayor producción de ECA circulante y tisular en los pacientes que presentan el genotipo DD¹⁵. A su vez, la mayor disponibilidad de ECA permite una mayor producción de ATII, que es un potente estímulo para la proliferación de células musculares lisas y de síntesis de colágeno (centrales en reestenosis). Paralelamente, aumenta la degradación de bradisinina. Se ha descrito que ésta puede ejercer un papel inhibitor de la proliferación neointimal¹⁶.

En este trabajo encontramos que el 22,9% de los pacientes presentaba genotipo D/D, el 14,5% genotipo I/I y el 62,5% genotipo I/D. Esta frecuencia alélica es similar a la referida por Ribichini et al, en pacientes coronarios¹⁷. El hallazgo de que en nuestra población el 81,8% de los pacientes con genotipo D/D presentan reestenosis es interesante. En el estudio de Ribichini et al la incidencia de reestenosis para este genotipo fue del 60,0%¹⁷. Sería necesario estudiar a un número mayor de enfermos para determinar si en la población chilena en particular la presencia de este marcador de riesgo es tan intensamente predictiva de reestenosis como se observa en nuestro estudio.

En todo caso nuestros hallazgos concuerdan con las de la bibliografía, de modo que se suman a diversas experiencias internacionales en el sentido de que efectivamente existiría una asociación entre la presencia de este marcador y la reestenosis postangioplastia^{18,19}. Es posible que esta asociación pueda ser un poderoso elemento de juicio respecto del uso de *stents* en estos pacientes. Alternativamente, estos pacientes podrían ser tratados en forma enérgica con IECA, intentando bloquear la producción de ATII, o con antagonistas de los receptores AT1 de la ATII, que son capaces de inhibir la actividad de ATII generada ya sea por acción de la ECA o por otras vías, incluyendo la cinasa intersticial²⁰, lo que confiere en teoría más posibilidades de éxito, al bloquear completamente el sistema en su efector final.

Es conveniente destacar que éste no es un estudio de la incidencia de reestenosis, sino que está dirigido a explorar algunos aspectos poco conocidos de pacientes con y sin reestenosis angiográfica. Una limitación de este trabajo consiste en que la mayoría de los pacientes fueron estudiados por presentar síntomas (aunque sólo la mitad de ellos efectivamente presentaron reestenosis), y que numerosos pacientes con *stents* no fueron incluidos por no contar con una coronariografía de control. A la luz de estos resultados, estamos realizando un estudio prospectivo en el que se analiza la incidencia de reestenosis en pacientes con distintos geno-

tipos de la ECA en respuesta a bloqueadores de la ATII.

CONCLUSIONES

En suma, en esta población seleccionada, el genotipo D/D se asoció significativamente a mayor incidencia de reestenosis post-*stent*. Se requieren estudios a mayor escala y prospectivos para poder establecer de forma más definitiva a este criterio como un factor de riesgo de reestenosis post-*stent*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Powell JS, Clozel JP, Muller RK, Kuhn H, Heft F, Hosang M et al. Inhibitors of angiotensin converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. *Science* 1989; 245: 186-188.
2. Powell JS, Muller RK, Baumgartner HR. Suppression of the vascular response to injury: the role of angiotensin converting enzyme inhibitors. *J Am Coll Cardiol* 1991; 17: 137B-142B.
3. Multicenter European Research Trial with Cilazapril after Angioplasty to Prevent Transluminal Coronary Obstruction and Restenosis (MERCATOR) Study Group. Does the new angiotensin converting enzyme inhibitor cilazapril prevent restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty? Results of the MERCATOR study: a multicenter, randomized, double-blind placebo-controlled trial. *Circulation* 1992; 86: 100-110.
4. Faxon DP. The Multicenter American Research Trial With Cilazapril After Angioplasty to Prevent Transluminal Coronary Obstruction and Restenosis (MARCATOR) Study Group. Effect of high dose angiotensin-converting enzyme inhibition on restenosis: final results of the MARCATOR Study, a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial of cilazapril. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25: 362-369.
5. Mintz GS, Popma JJ, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Wong C et al. Arterial remodeling after coronary angioplasty. A serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 1996; 94: 35-43.
6. Serruys PW, De Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G et al. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *N Engl J Med* 1994; 331: 489-495.
7. Navarro Salas F, Iñiguez Romo A, Córdova Polo M, Iglesias Alonso L, Ibarrollin R. Conventional percutaneous transluminal coronary angioplasty as the form of treatment of complex intrastent restenosis. *Rev Esp Cardiol* 1997; 50: 738-741.
8. Blanco Castineira J, King SB III, Chronos N. Endovascular radiation and restenosis. *Rev Esp Cardiol* 1997; 50: 520-528.
9. 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: 641-644.
10. Samani NJ, Martin DS, Brack M, Cullen J, Chauhan A, Lodwick D et al. Insertion/deletion polymorphism in the angiotensin-converting enzyme gene and risk of restenosis after coronary angioplasty. *Lancet* 1995; 345: 1.013-1.016.
11. Casar J, Balcells ME, Guarda E. Validación de un método para realizar angiografía cuantitativa a bajo costo. *Rev Chilena de Cardiología* 1997; 16: 200-206.
12. Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidylcarboxypeptidase 1). *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 1.433.

13. Guarda E, Weibel RR, Jenkins MS, Myers PR. Altered regulation of collagen synthesis and degradation in coronary artery restenosis. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 699-706.
14. Julier C, Delepine M, Keavney B, Terwilliger J, Davis S, Weeks DE et al. Genetic susceptibility for human familial essential hypertension in a region of homology with blood pressure linkage on rat chromosome 10. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 2.077-2.085.
15. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86: 1.343-1.346.
16. Farhy RD, Carretero OA, Ho KL, Scicli AG. Role of kinins and nitric oxide in the effects of angiotensin converting enzyme inhibitors on neointima formation. *Circ Res* 1993; 72: 1.202-1.210.
17. Ribichini F, Steffenino G, Dellavalle A, Matullo G, Colajanni E, Camilla T et al. Plasma activity and insertion/deletion polymorphism of angiotensin I - converting enzyme. *Circulation* 1998; 97: 147-154.
18. Kaski JC, Zhang Y, Calviño R, Vázquez Rodríguez JM, Castro Beiras A, Jeffery S et al. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and restenosis after coronary angioplasty in unstable angina pectoris. *Am J Cardiol* 1996; 77: 875-877.
19. Amant C, Bauters C, Bodart JC, Lablanche JM, Grollier G, Danchin N et al. D allele of the angiotensin I - converting enzyme is a major risk factor for restenosis after coronary stenting. *Circulation* 1997; 96: 56-60.
20. Messerli FH, Weber MA, Brunner HR. Angiotensin II receptor inhibition. A new therapeutic principle. *Arch Intern Med* 1996; 156: 1.957-1.965.