



Asociación de los polimorfismos genéticos de la Enzima Convertidora de la Angiotensina con Lupus Eritematoso Sistémico en pacientes lúpicos bolivianos

Association of Angiotensin Converting Enzyme Genetic Polymorphisms with Systemic Lupus Erythematosus in Bolivian Lupus Patients

CUTIPA, WENDY JACQUELINE¹
 TERÁN, MARÍA DE LOS ÁNGELES²
 CABRERA, SERGIO¹

PLATA, RAÚL³
 SOSA, LUIS FERNANDO¹

CORRESPONDENCIA:
 FERSOSAT@YAHOO.ES

FECHA DE RECEPCIÓN: 18 DE ENERO DE 2017

FECHA DE ACEPTACIÓN: 25 DE ABRIL DE 2017

Resumen

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune sistémica que afecta a diferentes órganos especialmente al riñón. Un gran número de estudios genéticos en diferentes grupos poblacionales han reportado asociaciones entre el polimorfismo en el intrón 16 del gen que codifica la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) con la susceptibilidad a LES y a sus manifestaciones clínicas en particular a la nefropatía lúpica. El presente estudio pretende asociar el polimorfismo genotípico y alélico inserción/delección (I/D) del gen ECA en pacientes bolivianos con susceptibilidad a LES y a las manifestaciones clínicas que presenta el paciente. Se incluyeron 87 pacientes lúpicos que cumplían con al menos cuatro criterios clínicos de la Sociedad Americana de Reumatología y 85 controles sanos. Todos los participantes dieron su consentimiento informado para par-

Abstract

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) a systemic autoimmune disease, affects different organs, being kidneys the most frequently affected. Many studies in different population groups have reported associations between the intron 16 of the gene encoding angiotensin converting enzyme (ACE) polymorphism and SLE susceptibility and its clinical manifestations, in particular lupus nephritis. Associate genotypic and allelic insertion/deletion (I/D) of the ACE gene polymorphism in SLE patient's susceptibility and the clinical manifestations were the aims of the present study. 87 lupus patients who met at least four clinical criteria of the American Society of Rheumatology and 85 healthy controls were included. All participants gave their informed consent to participate in the study. Allelic and genotypic ACE I/I, I/D and D/D polymorphisms were detected by polymerase chain reaction (PCR). In pa-

1 Laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética. Instituto SELADIS-FCFB-UMSA.

2. Facultad de Medicina-UMSA. Departamento de Medicina. Cátedra de Medicina III Capitulo de Nefrología.

3. Instituto de Nefrología Bol SRL

ticipar en el estudio. Se detectaron los polimorfismos alélicos y genotípicos ECA I/I, I/D y D/D mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La frecuencia genotípica I/I, I/D y D/D en los pacientes lúpicos era 47.1, 48.3 y 4.6%; en el grupo control era 68.2, 31.8 y 0% respectivamente. En lúpicos la frecuencia alélica era del 71.3 y 28,7%; en controles 84.1 y 15.9% para los alelos I y D respectivamente. Se evidenció que el alelo inserción y sus variantes genotípicas I/I e I/D está sistemáticamente asociado con riesgo al desarrollo de complicaciones clínicas dermatológicas, osteomusculares o hematológicas. En el caso de nefropatía lúpica el alelo inserción es un factor de protección. El polimorfismo estudiado del gen ECA no mostró asociación de riesgo o protección con manifestaciones cardiopulmonares ni neurológicas.

PALABRAS CLAVE

Lupus eritematoso sistémico, enzima convertidora de la angiotensina, nefritis lúpica, polimorfismo.

tients with SLE, the genotypic frequency of I/I, I/D and D/D were 47.1, 48.3 and 4.6%; and 68.2, 31.8 and 0% in control group respectively. Allele frequency in SLE represent: Insertion 71.3%, Deletion 28.7% and Insertion 84.1%, Deletion 15.9% in control group. Allele and genotypic variants I/I and I/D of the insertion allele were associated systematically with risk to dermatological, musculoskeletal and hematologic complications. Regarding lupus nephritis allele insertion is a protective factor. ACE gene polymorphism here studied has not been associated to risk or protection with cardiopulmonary or neurological clinical manifestations.

KEY WORDS

Systemic lupus erythematosus, angiotensin converting enzyme, lupus nephritis, polymorphism.

INTRODUCCIÓN

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune sistémica, cuyo daño está mediado por acción de complejos inmunes, autoanticuerpos y células que deterioran de manera sistemática a cualquier órgano o sistema del organismo (Brito, Suero Abreu, & Mejía, 2003). No se conoce con exactitud los factores ambientales o genéticos que desencadenan la enfermedad o el amplio espectro de las manifestaciones clínicas con las que se presenta. Está demostrado que afecta entre el 80% al 90% de los casos a mujeres (Dermatología, 2006) (Romani, Atencia, Cuadra, & Caelo, 2008) especialmente en edad reproductiva y que hay una mayor predisposición de afectación en poblaciones afro-americanas, siendo los hispanoamericanos con descendencia amerindia los que padecen formas severas de la enfermedad (Pons & Alarcón, 2012).

Hace más de seis años los estudios de asociación genómica extendida (Genome-Wide Association Studies = GWAS) han asociado más de cincuenta loci genéticos con la susceptibilidad a lupus y sus manifestaciones clínicas, especialmente nefropatía lúpica. (Ho, y otros, 2016) Entre los genes predisponentes a LES se involucró al polimorfismo en el intrón 16 del gen codificante de la Enzima Convertidora de la Angiotensina (ECA) (Al-Awadhi, y otros,

2007). La ECA juega un rol importante en la patogénesis y progresión del LES, este rol se debe principalmente a que es una metaloproteasa que además de estar implicada en el evento de homeostasis hemodinámica, electrolítica y contracción del músculo liso, cataboliza el efecto vasodilatador, proinflamatorio de la kallicreina, promueve la adhesión monocitaria y adhesión y agregación plaquetaria (Song & Lee, 2014). Los niveles de ECA están condicionados por su polimorfismo, la delección alélica (D) en el gen ECA condiciona mayores niveles plasmáticos de ECA, la inserción alélica (I) reduce la transcripción genética del gen ECA por lo tanto sus niveles plasmáticos se ven reducidos (Douglas, 2002).

Se han llevado a cabo una gran cantidad de estudios en diferentes grupos poblacionales de todos los continentes que buscaron asociar el genotipo y los alelos de este gen con la susceptibilidad a LES. Los alelos o el genotipo asociado a LES varían en función a la población estudiada (Hussain, Jaffery, Sabri, & Hasnain, 2011). En el presente trabajo se reportan los resultados del estudio de la asociación genética entre los polimorfismos genéticos y alélicos de la inserción o delección de un segmento genético Alu (secuencia repetitiva en el genoma rica en guaninas y citocinas) en el intrón 16 del gen codificante de la enzima convertidora de la angiotensina con la susceptibilidad a LES y con la predisposición a determinados tipos de manifestaciones clínicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio inmunogenético de caso-control (relación 1:1) en el que se involucró a 172 personas que fueron derivadas al Laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés. Los pacientes fueron clasificados en un grupo de 85 voluntarios aparentemente sanos con una edad promedio de 32 años (rango de edad de 20 a 69 años), y 87 pacientes diagnosticados con LES con edad promedio de 38 años (rango de edad 12 a 78 años). De los 87 pacientes lúpicos, 30 padecían nefropatía lúpica confirmada por histopatología. Los pacientes lúpicos involucrados presentaban más de cuatro criterios de diagnóstico considerados por la Asociación Americana de Reumatología. Todas las personas involucradas en el estudio firmaron su consentimiento para participar en el mismo. El estudio contó con el aval del Comité de Bioética de la UMSA.

Genotipificación molecular

A partir de 5 mL de sangre venosa tomada con anticoagulante EDTA.3K, se realizó el aislamiento del material genético mediante el protocolo de obtención de ADN optimizado en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS que se basa en el uso del kit comercial Wizard Genomic DNA purification (Promega, USA).

La determinación de los polimorfismos del gen ECA por el método de la PCR se realizó en dos fases, en la primera se utilizó la PCR propuesta por Chiang y cols. (1997), quienes proponen utilizar: cebadores en sentido 5': 5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3', cebador anti-sentido: 5'-AT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA-3'. (Chiang, y otros, 1997) El producto esperado de la PCR era un fragmento de 490 pb para el alelo inserción (I) y de 190 pb para el alelo deleción (D), en caso de heterocigosis (I/D) se esperaban productos de 490 pb y 190 pb. Las concentraciones y volúmenes de los reactivos para realizar la amplificación molecular fueron: Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM, MgCl₂ 2.0 mM, 0.32 mM de cada desoxi ribonucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0.5 μM de cada cebador, 0.8 unidades de la enzima Taq DNA Polimerasa (Promega, USA), siendo el volumen final de reacción por cada muestra 20 μL. En todas las amplificaciones se utilizó una concentración aproximada de 180 ng de ADN (+/- 50 ng). Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial a 95°C/5 min; 5 ciclos de: 95 °C/1 min, 70°C/1 min y 72°C/1 min; 5 ciclos de: 95° C/1 min, 65°C/1 min y 72°C/1 min; 30 ciclos de: 95°C/1 min, 60°C/1 min y 72°C/1 min; elongación final a 72°C/10 min. Para confirmar la ausencia del alelo Inserción en todos los individuos con genotipo D/D, se utilizó un método de PCR confirmatorio propuesto por Lindpaintner y col. (2009) en el cual se esperaba un fragmento amplificado de DNA de 335pb que confirmaba la presencia del alelo Inserción (Lindpaintner, y otros, 1995). En este segundo PCR se utilizaron los cebadores: en sentido 5': 5'-TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAC-3', anti-sentido: 5'-TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA-3'. Las concentraciones y volúmenes de los reactivos fueron las mismas que la primera PCR. Las condiciones de la PCR fueron desnaturalización inicial a 94 °C/3 min; 35 ciclos de 94°C/30 s, 67°C/45 s y 72°C/60 s y una elongación final a 72°C/10 min. Los productos de la PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 2.5% con SybrGreen Gold (1:1000) bajo iluminación de luz ultravioleta. Todas las corridas electroforéticas en geles de agarosa fueron documentadas mediante fotografía (figuras 1 y 2).

Para determinar las frecuencias alélicas del polimorfismo de inserción y/o deleción del intrón 16 del gen de la ECA en los pacientes lúpicos o controles se utilizó el software F-stat versión 2.9.3.2 y GENETIX versión 4.05. Para determinar la asociación de los genotipos I/I, I/D y D/D del gen ECA con la susceptibilidad a LES o nefropatía lúpica u otras manifestaciones clínicas se utilizó el test de X² con corrección de Yates y el Odds ratio para un intervalo de confianza del 95%.

Figura 1.

Fotografía de la corrida electroforética de la genotipificación del polimorfismo I/D del gen ECA1. En los pozos 1, 2, 3 5 10 y 11 (izquierda) se observan bandas de 490 pb indicativo del alelo I. En los pozos 6,7, 8 y 9 se observa bandas de 190 pb indicativo del alelo D, en estos pozos también se observa bandas a 490 pb en la parte superior indicativo de una probable presencia del alelo I para lo cual se requeriría de un PCR confirmatorio. En los pozos 4 y 12 se observa el marcador de peso molecular.

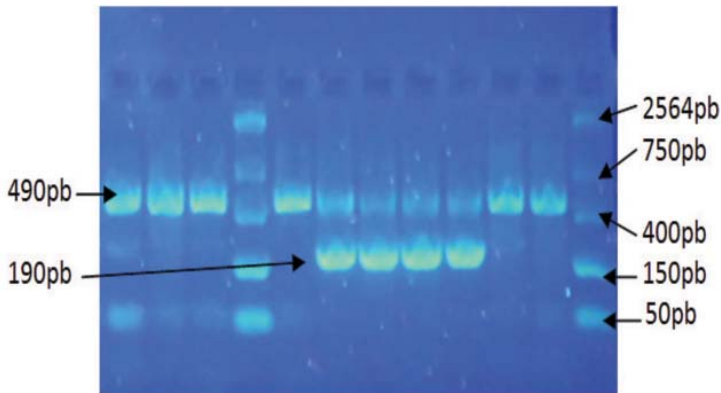
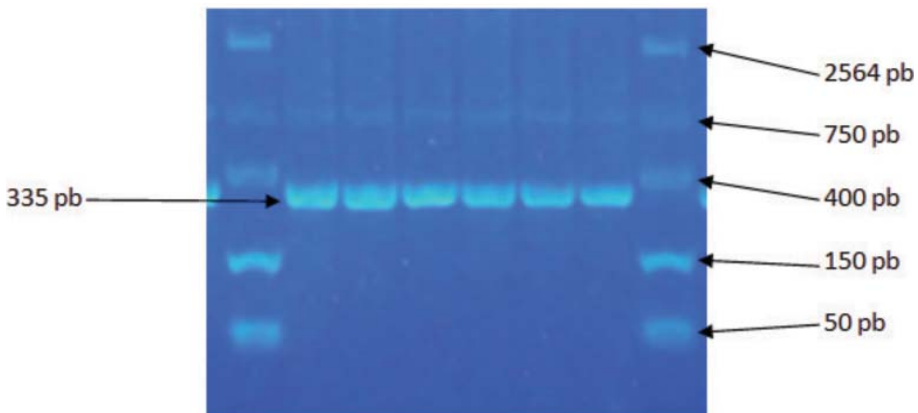


Figura 2.

Fotografía de la corrida electroforética realizada del PCR confirmatorio para evidenciar la presencia del alelo inserción. En los pozos 2, 3, 4, 5, 6 y 7 se observa bandas a 335 pb confirmando la presencia del alelo inserción, n los pozos 1 y 8 se observa el marcador de peso molecular. El PCR confirmatorio constató en el 100% de los casos la presencia del alelo I en las muestras en las que se sospechaba heterocigosis (I/D).



RESULTADOS

Las frecuencias genotípicas del polimorfismo de I/I, I/D y D/D del gen de la ECA encontrada en la muestra de pacientes lúpicos fue del 47.1, 48.3 y 4.6% respectivamente; en la muestra control fue del 68.2, 31.8 y 0% respectivamente. Se observó también que las diferencias en las muestras estudiadas a nivel del alelo inserción ya sea en homocigosis o heterocigosis son significativas ($X^2 > 4.88$). Siendo el genotipo I/I el más frecuente en el grupo control y el genotipo I/D estuvo presente en mayor frecuencia en LES. Si bien el genotipo D/D no alcanza significancia estadística, se observa que los pacientes lúpicos lo portan con mayor frecuencia. (Ver tabla 1).

Tabla 1.
Tabla de frecuencias genotípicas del polimorfismo del gen de la ECA en pacientes con LES versus pacientes sanos.

Polimorfismo genotípico del gen ECA	Pacientes		Controles		OR(IC)*	Chi-cuadrado
	(N=87)	%	(N=85)	%		χ^2 (P = α 0.5)
I/I	41	47.1	58	68.2	0.41 (0.22 - 0.77)	7.84 (P=0.01)
I/D	42	48.3	27	31.8	2.00 (1.08 - 3.73)	4.88 (P= 0.03)
D/D	4	4.6	0	0	40.92 (NS)	3.71 (p= 0.05)

I= Inserción, D= Delección; OR(IC)= Odds ratio (intervalo de confianza); NS= no significativo

En la tabla 2 se observa que la frecuencia del alelo "I" es mayor en la población de pacientes control que en la de pacientes lúpicos. Por otra parte, se observa una mayor frecuencia del alelo D en el grupo de pacientes con LES que en el grupo de pacientes control. El cálculo de χ^2 lanzó un valor de 8,18 ($p < 0.05$) indicando que las diferencias entre las muestras analizadas son estadísticamente significativas. El valor del Odds ratio de 0.47 indica que el alelo "I" tiene una tendencia hacia la protección a la enfermedad; en el caso del alelo "D" el Odds ratio indica que las personas que portan este alelo tienen el doble de predisposición de padecer LES.

Tabla 2.
Comparación de frecuencias las alélicas del intrón 16 del gen de la ECA entre la población de pacientes con LES y la población de pacientes aparentemente sana.

Polimorfismo alélico del gen ECA	Pacientes		Controles		OR(IC)*	Chi-cuadrado
	(N=172)	%	(N=170)	%		χ^2 (P = α 0.5)
Inserción	124	71.26	143	84.12	0.47 (0.28 - 0,9)	8.18 (p<0,001)
Delección	50	28.74	27	15.88	2.14 (1.26 - 3.61)	8.18 (p=0,004)

I= Inserción, D= Delección; OR(IC)= Odds ratio (intervalo de confianza)

En la tabla 3, se observa que la presencia de los genotipos I/I, I/D son los que están asociados de manera estadísticamente significativa como factores riesgo a manifestaciones clínicas como las dermatológicas, osteomusculares y hematológicas, en ningún caso se observó que el genotipo D/D sea factor de riesgo o factor de protección a algunas de las complicaciones clínicas evaluadas.

Tabla N°3.
Asociación del polimorfismo del intrón 16 del gen ECA con manifestaciones clínicas observadas en pacientes lúpicos.

Manifestación clínica	Polimorfismo genotipo del gen ECA	Positivo		Negativo		OR(IC)*	Chi-cuadrado X ² (P = α 0.5)
		(N)	%	(N)	%		
Dermatológicas	I/I	33	44.00	2	2.67	28.68 (6.55 - 125.60)	35.81 (p<0.001)
	I/D	34	45.33	3	4.00	19.90 (5.75 - 68.86)	34.48 (p<0.001)
	D/D	3	4.00	0	0.13	31.21 (NS)	2.77 (NS)
Osteomusculares	I/I	33	44.00	2	2.67	28.68 (6.55 - 125.60)	35.81 (p<0.001)
	I/D	32	42.67	5	6.67	10.42 (3.77 - 28.78)	26.15 (p<0.001)
	D/D	3	4.00	0	0.13	31.21 (NS)	2.77 (NS)
Cardíacas	I/I	20	26.67	15	20.00	1.45 (NS)	0.93 (NS)
	I/D	14	18.67	23	30.67	0.52 (NS)	2.91 (NS)
	D/D	3	4.00	0	0.13	31.21 (NS)	2.77 (NS)
Neurológicas	I/I	19	25.33	16	21.33	1.25 (NS)	0.34 (NS)
	I/D	19	25.33	18	24.00	1.07 (NS)	0.04 (NS)
	D/D	2	2.67	1	1.33	2.03 (NS)	0.34 (NS)
Hematológicas	I/I	28	37.33	7	9.33	5.79 (2.33 - 14.35)	16.43 (p<0.001)
	I/D	30	40.00	7	9.33	6.48 (2.62 - 16.01)	18.98 (p<0.001)
	D/D	3	4.00	0	0.13	21.21 (NS)	2.77 (NS)
Nefropatía	I/I	15	20.00	26	34.67	0.47 (0.22 - 0.99)	4.06 (p=0.04)
	I/D	14	16.09	28	32.18	0.40 (0.20 - 0.84)	6.15 (p=0.01)
	D/D	1	1.15	3	3.45	0.33 (NS)	1.02 (NS)

I= Inserción, D= Delección; OR(IC)= Odds ratio (intervalo de confianza); NS= no significativo

DISCUSIÓN

Muchos estudios han evidenciado la asociación entre el polimorfismo alélico y genotípico intrón 16 del gen ECA con la susceptibilidad a LES y a sus manifestaciones clínicas. Este es el primer estudio en Bolivia en el campo de la inmunogenética que trata de establecer estas asociaciones en pacientes lúpicos.

Los resultados del estudio muestran que en pacientes lúpicos las frecuencias de los genotipos I/D e D/D son más altas que en individuos que no padecen LES. Si bien no muestra significancia estadística, es interesante observar que el genotipo D/D se encontró solamente en pacientes lúpicos.

En un estudio similar realizado en población pakistaní, Hussain et al., reportaron que existe relación entre la frecuencia del genotipo D/D con la susceptibilidad a lupus (Hussain, Jaffery, Sabri, & Hasnain, 2011). Similar hallazgo fue reportado por Abbas et al el año 2012 en población egipcia, quienes argumentaron además que los niveles séricos de ECA podrían ser empleados para monitorear la actividad de la enfermedad (Abbas, Ezzat, Hamdy, & Gamil, 2012). Corroborando estos hallazgos, Lee et al en un meta-análisis realizado el 2013 que agrupó a 1907 pacientes y 1842 controles concluye que el genotipo DD está asociado con LES y que el genotipo I/D tiene una asociación marginal con LES en europeos (Lee, Choi, Ji, & Song, 2013). Otros estudios en diferentes grupos raciales muestran que no existen asociaciones entre los polimorfismos I/D del gen ECA con el riesgo a LES, entre ellos se destacan los estudios de: Topete-Reyes et al el 2013 en pacientes mexicanos; Kaufman et al el 2001 en pacientes estadounidenses; Uhm et al el 2002 en población coreana y finalmente Molad et al el 2008 en pacientes israelíes (Topete, y otros, 2013) (Kaufman, y otros, 2001) (Uhm, y otros, 2002) (Molad, y otros,

2008). Como se puede apreciar, si bien existen diferencias étnicas en los diferentes grupos poblacionales estudiados, se hace evidencia que los pacientes lúpicos se caracterizan por portar en su genotipo el alelo D. Al respecto se ha demostrado que los individuos homocigotos D/D tienen dos veces más actividad de la ECA que los individuos homocigotos I/I, se demostró también que los individuos heterocigotos I/D presentan una actividad intermedia de la ACE (Hussain & Jaffery, 2013). La población boliviana estudiada presenta sus propias características genotípicas a nivel del polimorfismo del gen ECA, la cual, es similar a la de las poblaciones asiáticas y a la población peruana o mexicana (Zorrilla, Mimbacas, Gascue, Javiel, & Cardoso, 2006).

Los resultados de la asociación de los polimorfismos genéticos del gen ECA con las manifestaciones clínicas de los pacientes lúpicos, evidencian que para todas las manifestaciones clínicas evaluadas el alelo inserción (en homocigosis I/I o heterocigosis I/D) es el que está sistemáticamente asociado con riesgo a complicaciones de orden dermatológico, osteomuscular y hematológico. Si bien no existen reportes de la asociación del polimorfismo ECA con complicaciones dermatológicas – osteomusculares, estudios como el de Moezz et al encontraron correlación entre el alelo inserción y los problemas articulares en la artritis reumatoide, afirmaron además que los niveles bajos de ECA en las articulaciones se debe a que el alelo I condicionan a que no se inactive de manera adecuada la bradikinina (péptido vasodilatador) no se inactive de manera adecuada, lo cual a su vez favorece la actividad proinflamatoria a nivel de articulaciones y músculos (Moezz, Iqbal, Jhon, & Bhatti, 2013). En un meta análisis publicado el 2014, Song et al asocia el genotipo DD con enfermedades de otro tipo como Alzheimer, infarto de miocardio, infarto cerebral, hipertensión y vasculitis (Song & Lee, 2014).

En el presente estudio, en el caso particular de la NL se observó que el alelo I confiere un carácter protector a la enfermedad. De manera similar, Akai et al, asociaron al alelo inserción con protección a NL, niveles bajos de creatinina y proteinuria (Akai, Sato, & Iwano, 1999). En contra posición, Tassiulas et al en 1998 reportó la existencia de la asociación del alelo I con riesgo de enfermedad renal (Tassiulas, y otros, 1998). En un estudio similar, Parsa et al el 2002 reportaron que el alelo D es más frecuente en individuos no caucásicos con nefritis lúpica (Parsa, y otros, 2002). Los resultados de otros estudios a este respecto son discrepantes. El-Shafeey et al el 2005 no encontró asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo del gen ECA con la susceptibilidad a NL (El-Shafeey, El-Shayeb, Othman, & Elfawy, 2005). Hallazgo similar fue reportado por PrKacin et al en el 2010 y Topete et al el 2013 en población mexicana (Prkacin, 2001) (Topete, y otros, 2013).

CONCLUSIONES

En personas bolivianas y paceñas en particular la delección alélica de un segmento genético alu en el intrón 16 del gen ECA (presencia del alelo D) duplica el riesgo a padecer LES, especialmente cuando se porta el genotipo I/D.

En pacientes lúpicos la presencia del alelo I ya sea en homocigosis (I/I) o heterocigosis (I/D) implica en el paciente riesgo de desarrollar afecciones dermatológicas, osteomusculares o hematológicas. En el caso del riesgo a nefropatía lúpica de evidencia que el polimorfismo ECA que el alelo I tiene un carácter protector.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó gracias al financiamiento de los recursos concursables IDH de la Universidad Mayor de San Andrés gestión 2011-2012. Agradecemos el apoyo brindado por la Asociación Boliviana de lucha contra el Lupus por facilitar el acceso a los pacientes

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, D., Ezzat, Y., Hamdy, E., & Gamil, M. (2012). Angiotensin-converting enzyme (ACE) serum levels and gene polymorphism in Egyptian patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 103-110.
- Akai, Y., Sato, H., & Iwano, M. o.-c. (1999). Association of an insertion polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene with the activity of lupus nephritis. *ClinNephrol*, 141-146.
- Al-Awadhi, A., Haider, M., Sharma, P., Hasan, E., Botaiban, F., & Al-Herz, A. (2007). Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in Kuwaiti with systemic lupus erythematosus. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 437-442.
- Brito, V., Suero Abreu, G., & Mejia, N. (2003). Prevalencia del Lupus Eritematoso Sistémico en pacientes que visitaron el departamento de medicina interna del hospital Dr. Salvador B. Gautier durante el periodo de enero 1998 - enero 2001. *Ciencia y Sociedad*, 408-421.
- Chiang, F., Lai, Z., Chern, T., Tseng, C., Hsu, K., & Lo, H. (1997). Lack of association of the angiotensin converting enzyme gene polymorphism with essential hypertension in a Chinese population. *American Journal of Hypertension*, 197-201.
- Dermatología, S. A. (2006). Consenso sobre el diagnóstico y tratamiento de lupus eritematoso. 2006: SAD.
- Douglas, G. (2002). Angiotensin-converting enzyme (insertion/deletion) and endothelial nitric oxide synthase polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of Rheumatology*, 1756-1762.
- El-Shafeey, M., El-Shayeb, M., Othman, E., & Elfawy, N. (2005). Angiotensin converting Enzyme gene polymorphism in Egyptian patients with systemic lupus erythematosus. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 131-138.
- Ho, R., Ong, H., Thiagu, C., Lu, Y., Ho, C., & Zhang, M. (2016). Genetics variants that are associated with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Journal of Rheumatology*.
- Hussain, N., & Jaffery, G. (2013). Distribution of Human Leukocyte Antigen alleles in Systemic Lupus Erythematosus patients with Angiotensin Converting Enzyme Insertion/Deletion Polymorphism. *Basic Med Sci*, 56-62.
- Hussain, N., Jaffery, G., Sabri, A., & Hasnain, S. (2011). HLA association in SLE patients from Lahore-Pakistan. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 20-26.
- Kaufman, K., Kelly, J., Gray-McGuire, C., Asundi, N., Yu, H., Reid, J.,... Harley, J. (2001). Linkage analysis of angiotensin-converting enzyme (ACE) insertion/deletion polymorphism and systemic lupus erythematosus. *Molecular and cellular endocrinology*, 81-85.
- Lee, Y., Choi, S., Ji, J., & Song, G. (2013). Association between the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and susceptibility to systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 248-254.
- Lindpaintner, K., Pfeffer, M., Kreutz, R., Stampfer, M., Grodstein, F., & Lamotte, F. (1995). A prospective evaluation of angiotensin converting gene polymorphism and the risk factor of ischemic heart disease. *New England Journal of Medicine*, 706-711.
- Moezz, S., Iqbal, T., Jhon, P., & Bhatti, A. (2013). Evidence of angiotensin converting enzyme (ACE) insertion polymorphism in rheumatoid arthritis from Pakistani patients. *International Journal of Molecular Biology*, 87-91.
- Molad, Y., Gal, E., Magal, N., Sulkes, J., Mukamel, M., Weinberger, A.,... Shohat, M. (2008). Renal outcome and vascular morbidity in systemic lupus erythematosus (SLE): lack of association with the angiotensin-converting enzyme gene polymorphism. *Semin Arthritis Rheum*, 132-137.

- Parsa, A., Peden, E., Lum, R., Seligman, V., Olsen, J., Li, H.,... Criswell, L. (2002). 2002: Association of angiotensin-converting enzyme polymorphisms with systemic lupus erythematosus and nephritis: analysis of 644 SLE families. *Genes and Immunity*, S42-S46.
- Pons, G., & Alarcón, G. (2012). Lupus in Hispanics: A matter of serious concern. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 824-834.
- Prkacin, N. (2001). Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in patients with systemic lupus. *Acta Med Croatica*, 73-76.
- Romani, F., Atencia, F., Cuadra, J., & Caelo, C. (2008). Lupus eritematoso sistémico, en un paciente varón a propósito de un caso. *AnFacMed*, 37-41.
- Song, G., & Lee, Y. (2014). Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and susceptibility to systemic sclerosis: a meta-analysis. *Genetic Molecular*, 8174-8183.
- Tassioulas, I., Aksentijevich, I., Salmon, J., Kim, Y., Yarboro, C., Vaughan, E.,... Boumpas, D. (1998). Angiotensin I converting enzyme gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus: decreased prevalence of DD genotype in African American patients. *Clinical Nephrology*, 8-13.
- Topete, J., Soto, J., Morán, M., Dávalos, I., Chávez, E., García, I.,... Salazar, M. (2013). Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene in lupus nephritis among Mexicans. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 174-180.
- Uhm, W., Lee, H., Chung, Y., Kim, T., Bae, S., Joo, K.,... Yoo, D. (2002). Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and vascular manifestations in Korean patients with SLE. *Lupus*, 227-233.
- Zorrilla, P., Mimbacas, A., Gascue, C., Javiel, G., & Cardoso, H. (2006). Prevalencia del polimorfismo I/D del gen de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) en la población de Montevideo. *Revista Medica de Uruguay*, 17-21.