

Poder y replicación de los estudios de casos y controles

Jean-Marc Lalouel y Andreas Rohrwasser

El diseño de estudios de casos y controles es un instrumento habitual en la epidemiología, y cada vez se está usando más para investigar las asociaciones genéticas. La simplicidad de este diseño explica su atractivo y sus limitaciones. Sin embargo, frecuentemente, surgen controversias por la falta de conocimiento de los principios básicos de la investigación estadística. El poder y la aplicación son dos conceptos que suelen ignorarse al evaluar estos estudios. En este artículo revisamos los

principios básicos de las pruebas estadísticas, recordamos sistemas sencillos para el cálculo del poder y damos ejemplos numéricos sobre la asociación entre el angiotensinógeno y la hipertensión esencial. Am J Hypertens 2002; 15:201-205.

Palabras clave: Asociación, estudio de casos y controles, poder, replicación, genética, hipertensión, angiotensinógeno.

Parece que no puede publicarse ningún estudio de casos y controles sin que rápidamente se susciten calificaciones, reservas u oposición directa por parte de los observadores en este campo. Sin embargo, esto no debería sorprendernos, puesto que el objetivo de la estadística es medir el grado de confianza o incertidumbre de las hipótesis que se proponen, en función de los datos. Las pruebas estadísticas se realizan para evaluar la validez relativa de las dos hipótesis, constituyendo de esta forma una medida objetiva de la incertidumbre¹.

Un reto importante de la conclusión estadística es que además de la incertidumbre natural de las hipótesis que compiten, la necesidad de realizar un muestreo -en vez de observar toda la población- introduce una incertidumbre de otra naturaleza, es decir, la de extraer conclusiones a partir de muestras de la población. La prueba estadística sirve para valorar la validez relativa de las hipótesis que compiten en la muestra; se desconoce a qué población de referencia puede extenderse esta conclusión. La importancia del sesgo del muestreo, al limitar las conclusiones de las muestras de las poblaciones, se ha discutido frecuentemente en el contexto de los estudios de casos y controles, pero este tema no será comentado aquí.

Un mecanismo más obvio para validar una hipótesis es someterla a nuevas pruebas por medio de la replicación

independiente. Cuando se acumulan múltiples estudios y pruebas es necesario evaluar la base global de las hipótesis en competición. Se han desarrollado métodos para realizar dicha evaluación, como el metaanálisis, pero estos intentos pueden tener una utilidad práctica limitada si no se hace una revisión pautada de los datos de cada paciente². Aunque sea sencillo, el concepto de replicación sigue siendo fundamental. No es el objetivo de la prueba saber si un estudio constituye una réplica apropiada de otro, pero puede afectar drásticamente a su validez.

En los apartados siguientes nos centraremos en dos elementos críticos de la conclusión estadística: principios elementales de las pruebas estadísticas, particularmente, el *poder* y el concepto de *replicación*. Usaremos una hipótesis específica -la asociación entre el angiotensinógeno y la hipertensión esencial- para ilustrar la importancia práctica de estos conceptos en las ciencias biomédicas.

Prueba de asociación

Genotipos y alelos

Las pruebas de asociación entre la enfermedad y los marcadores de la misma se realizan contrastando las frecuencias genotípicas o alélicas entre los casos (C) y los controles (R). El genetista generalmente se inclina a comparar las frecuencias alélicas en ámbitos en los que, en ausencia de asociación, el muestreo de los genotipos de una población

Departamento de Genética Humana, Facultad de Medicina de la Universidad de Utah, Salt Lake City, Utah

TABLA 1. Investigación de las hipótesis y decisión según la teoría de Neyman-Pearson

Consideración	Decisión	Diagnóstico	Probabilidad
H_0 es verdad	Se mantiene H_0	OK	$1-\alpha$
H_0 es verdad	Se acepta H_1	Error de tipo I	α
H_1 es verdad	Se mantiene H_0	Error de tipo II	β
H_1 es verdad	Se acepta H_1	OK	$1-\beta$

similar aleatoria es equivalente al muestreo de gametos o alelos de la mezcla de genes que dieron lugar a la población. Dependiendo de la frecuencia y penetrancia alélicas, sin embargo, puede conseguirse mayor significación cuando la dominancia o la recesividad exige que se agrupen varias categorías genotípicas. Aunque nosotros nos centramos en la comparación de frecuencias alélicas, los principios descritos pueden ampliarse a otras situaciones.

La prueba y la decisión

Las pruebas de asociación se construyen para evaluar la *validez relativa de dos hipótesis que compiten*, por ejemplo: H_0 : T se produce con igual frecuencia en casos y controles; H_1 : T se produce con diferente frecuencia en los dos grupos.

Si no se demuestra lo contrario, debe aceptarse la primera hipótesis, también llamada hipótesis nula. El primer paso para valorar la base relativa de las hipótesis en competición es calcular la prueba de asociación familiar de la tabla de dos vías de las frecuencias alélicas observadas en los casos y en los controles. Por construcción, la estadística es directamente proporcional al tamaño de la muestra. La frecuencia del alelo T en la muestra de casos y controles, aunque directamente observada, procede de los valores reales desconocidos de la población, como consecuencia de las fluctuaciones del muestreo. Considerando la hipótesis nula -y algunas condiciones auxiliares que pertenecen a la convergencia de la ley de la estadística de la prueba- la prueba investiga la distribución de la probabilidad conocida de una variable χ^2 con un grado de libertad.

Para continuar investigando la hipótesis, puede calcularse el valor de χ^2_1 con la probabilidad de que se sobrepase P , a partir de esta distribución, o leerse en una tabla de referencia. Si se considera sólo la posibilidad, la estadística puede superar el valor de 3,84 con una probabilidad de 0,05 (5%), o el valor de 6,64, con una probabilidad de 0,01 (1%).

La decisión para inclinarse hacia una u otra hipótesis implica un riesgo de error. La teoría de Neyman-Pearson sobre las pruebas estadísticas intenta hacer una valoración objetiva de este riesgo. Reconoce que pueden cometerse dos tipos de errores cuando se toma una decisión en fun-

ción de una prueba estadística, y que se denominan errores de tipo I y de tipo II, respectivamente (Tabla 1).

Los errores de tipo I se producen cuando una diferencia que se considera significativa en función de las estimaciones de la muestra no existe realmente en la población. Incluso cuando la hipótesis nula (H_0) es cierta, hay un 5% de posibilidades de que la estadística sea significativa a nivel 0,05 -el riesgo asumido- debido a las fluctuaciones de la posibilidad sólo. Evidentemente, puede conseguirse mayor confianza en la decisión tomada exigiendo un nivel de significación más estricto o mediante replicación en una o más muestras independientes.

El error de tipo II se produce cuando la hipótesis nula se mantiene aunque sea falsa. La posibilidad de este tipo de error no se aprecia tan bien como el error de tipo I por el usuario medio de una prueba estadística. En lenguaje vulgar, esto significa que aunque realmente exista una diferencia entre casos y controles, no puede detectarse como diferencia estadísticamente significativa en una muestra seleccionada de la población. Evidentemente, la probabilidad de que exista dicho error depende de la magnitud real de la diferencia en la población y del tamaño de la muestra.

Cuando se encuentra inicialmente una asociación significativa, el error de tipo I es la principal preocupación porque la prueba sugiere la existencia de una diferencia estadística. El tema más importante es la probabilidad de que esta diferencia surja sólo por casualidad. Cuando se intenta la replicación, sin embargo, el error de tipo II es la preocupación más importante si la estadística del test no alcanza la significación. Una falacia lógica consiste en interpretar dicho resultado como "prueba negativa de la existencia de una asociación". Cuando dicho resultado se contrasta con el resultado de un trabajo previo que dio pruebas de que existe una asociación significativa (donde la hipótesis nula H_0 fue rechazada) es frecuente que los investigadores creen que los datos de los dos estudios son "opuestos", creando así una "contradicción" o "controversia" clara. Veremos que, en la mayoría de los casos prácticos, no puede confirmarse una evidencia negativa por una prueba estadística y que los resultados aparentemente discordantes, de hecho, concuerdan lógicamente y realmente se esperan en función de la teoría estadística.

Poder

Si β significa la probabilidad de mantener la H_0 cuando es falsa (H_1 es verdad) o error de tipo II, su complemento, $1-\beta$, o poder, define la probabilidad de rechazar la H_0 cuando ésta es falsa (H_1 es verdad).

La probabilidad de que un test identifique como significativa una diferencia de la frecuencia de un marcador entre casos y controles de la población puede estimarse calculando el poder de la prueba. Para una diferencia dada de la frecuencia de un marcador entre casos y controles de la

TABLA 2. Significación y poder en pruebas de asociación entre el alelo T235 de la AGT y la hipertensión esencial

Referencias	n	n _C	n _R	P _C	P _R	χ ² ₁	α	1-β ₁₁	1-β ₉	1-β ₈
Jeunemaitre 1992 ³	894	430	464	0,47	0,36	11,10	0,001	0,95	0,86	0,81
Johnson 1996 ⁷	1510	778	732	0,39	0,31	8,77	0,01	1,00	0,97	0,95
Jeunemaitre 1997 ⁵	1682	954	728	0,47	0,38	12,60	0,001	1,00	0,98	0,96
Schmidt 1995 ⁶	900	438	462	0,48	0,40	5,38	0,03	0,96	0,86	0,81
Hingorani 1996 ¹¹	810	436	374	0,42	0,45	0,62	n.s.	0,94	0,83	0,77
Fornage 1995 ¹⁰	598	208	390	0,41	0,40	0,04	n.s.	0,83	0,68	0,62
Jeunemaitre 1993 ¹⁶	452	272	180	0,44	0,38	1,50	n.s.	0,75	0,60	0,54
Bennett 1993 ⁹	374	184	190	0,42	0,39	0,24	n.s.	0,70	0,54	0,49
Barley 1994 ¹⁷	280	132	148	0,51	0,49	0,06	n.s.	0,59	0,45	0,40
Caulfield 1994 ¹⁵	254	126	128	0,51	0,49	0,06	n.s.	0,55	0,42	0,38

n=número total de alelos investigados; n_C, n_R=número de alelos investigados en casos y controles, respectivamente; p_C, p_R = frecuencia de T235 en casos y controles, respectivamente; χ²₁ = test de asociación; α = significación de la prueba; 1-β_x = poder de la prueba cuando la verdadera diferencia (x) de la frecuencia de T235 en casos y controles sea x=0,11, 0,09 y 0,08, respectivamente; n.s.=no significativo.

población, y para un tamaño específico de la muestra, el poder es la probabilidad de que la prueba estadística alcance la significación en un nivel definido, es decir 0,05 o 0,01. Por tanto, un experimento con un 80% de poder a nivel 0,05 indica que se detectará una verdadera diferencia con una probabilidad del 80%, o lo que es equivalente, en 4 de 5 muestras de tamaño similar extraídas de la misma población. Se reconoce, en general, que, a menos que ostente un poder del 80%, como mínimo, un estudio estadístico que no alcance la significación del nivel 0,05 debe considerarse poco concluyente. Dicho estudio no da una información adecuada para seleccionar con confianza suficiente una de las dos hipótesis que se plantean.

Cálculo del poder

A pesar de la importancia fundamental del poder para estimar una variable estadística, generalmente, este parámetro no se evalúa en trabajos que dependen fundamentalmente de él, es decir, aquellos en los cuales la prueba estadística no alcanza la significación. Aunque la fórmula necesaria es un poco más complicada que la que se usa para generar la prueba, puede realizarse con una calculadora científica que disponga de la función trigonométrica adecuada; si las calculadoras no tienen esta característica, puede usarse una expansión de serie. Esto se muestra en el Apéndice junto con un ejemplo.

Replicación

Cuando se pronostica la hipótesis de una asociación en función de una prueba estadística (es decir, cuando la hipótesis nula H₀ se rechaza y se mantiene la alternativa H₁), puede someterse a otras pruebas por medio de la replicación en muestras independientes. Puesto que las diferencias de la población pueden oscurecer las conclusiones, dicha replica-

ción se busca, generalmente, en una población de extracción similar; en el contexto de una hipótesis genética, esto significa que los antecedentes étnicos deben ser similares. Evidentemente, cuando la exposición ambiental y el estilo de vida contribuyen significativamente al desarrollo de la enfermedad, la epidemiología de la población replicante también debe ser representativa de la del estudio original.

Un estudio que constituye una verdadera replicación de otro anterior debería satisfacer un número mínimo de criterios obvios: 1) los casos y los controles deberían definirse estrictamente de la misma forma que en el trabajo original, usando los mismos criterios de inclusión y de exclusión; 2) debería aplicarse el mismo campo de muestreo; y 3) debería analizarse la misma o una población de referencia similar. Como veremos después, nunca se consigue la verdadera replicación, dejándose abiertas dudas no determinadas sobre la significación real de las diferencias estadísticas observadas.

Ilustración: angiotensinógeno e hipertensión

Resultado inicial

Se encontró una asociación entre el alelo T235 del gen del angiotensinógeno (AGT) y la hipertensión esencial, inicialmente, como parte de un informe que documentó el ligamiento genético en hermanos hipertensos y la asociación de T235 con la hipertensión esencial y la concentración plasmática de angiotensinógeno en dos muestras independientes de personas de raza blanca analizadas en Salt Lake, Utah, y París, Francia³. A partir de entonces, la asociación de T235 de AGT con varios fenotipos en varias poblaciones se sometió a múltiples pruebas. Puesto que las pruebas alcanzaron la significación en algunos casos, pero no en todos, este tema se consideró controvertido. Veremos, sin embargo, que dicha diseminación de datos debería predecirse en cualquier asociación verdadera.

La relevancia del poder

Es frecuente calificar los datos como opuestos, contradictorios o referirse a los resultados como positivos y negativos cuando con pruebas múltiples de una hipótesis dada no se consigue la significación estadística. Por ejemplo, en un estudio se detallan más de 56 tópicos considerados contradictorios porque no todos los estudios de casos y controles que examinaron el mismo tópico pudieron confirmar claramente una asociación⁴. Sin embargo, dicha calificación no es adecuada. Incluso aunque se extrajeran muestras independientes de una población donde se supiera que existe una verdadera asociación, se esperaría la significación estadística en algunas pero no en todas las muestras. Como destacamos antes, cuanto más bajo sea el poder, mayor será la probabilidad de que la asociación permanezca sin detectarse.

Para ilustrar este punto hemos calculado en la Tabla 2 el poder para detectar como significativa una diferencia dada en la frecuencia de T235 entre casos y controles, es decir, 11%, 9% u 8%, como se describió en el trabajo inicial de Jeunemaitre et al.³, en el estudio posterior de mayor tamaño de Jeunemaitre et al.⁵ y en otros dos estudios de Schmidt⁶ y Johnson⁷ y sus colaboradores. Hemos incluido en la Tabla 2 sólo los estudios con personas de raza blanca revisados en el metaanálisis de Kuntz⁸ que cumplieran los criterios de replicación mínimos (ver a continuación). Está claro que, en general, la falta de significación se correlaciona con un poder estadístico bajo como resultado del pequeño tamaño de la muestra. Evidentemente, cuando el tamaño de la muestra es bajo, la única conclusión apropiada es considerar el estudio como no concluyente. Otro punto claro que aparece en la Tabla 2 es el descenso rápido en el poder, al ir descendiendo la verdadera diferencia en la frecuencia de marcadores entre los casos y controles en la población muestreada.

Debemos destacar que una evidencia negativa en contra de un resultado inicial, donde la hipótesis nula H_0 se rechazó con una probabilidad de error α , requeriría un rechazo de la hipótesis de una verdadera diferencia H_1 en los intentos de replicación posteriores, con una probabilidad al menos igual a α . Puesto que la significación en que se basó el rechazo de H_0 en el estudio de Jeunemaitre et al.³ fue 0,01, esto requeriría un poder de 0,999, al menos, para aportar una prueba negativa contra el resultado inicial o un total de 3.248 casos y controles en igual proporción.

El significado de la replicación

Los intentos de replicación deberían reproducir la definición original de casos y controles. En el estudio de Jeunemaitre et al.³, los casos presentaban hipertensión clara clínicamente y los criterios de exclusión eran diabetes o causas de hipertensión secundaria. Además, todos los casos tenían, al menos, un hermano con hipertensión esencial

que cumplía los mismos criterios. Los controles eran individuos con presión arterial normal (PA) sin diagnóstico de hipertensión. Sólo se incluyeron en la Tabla 2 los estudios basados en la hipertensión clínicamente clara. Sólo un estudio⁹ incluyó a familiares de primer grado aceptados como parte de la selección. Sin embargo, el criterio de selección adicional de que ambos padres sean hipertensos, a la luz de la heterogeneidad etiológica y las relaciones de dominancia/recesividad, pueden ser claramente diferentes de un criterio aplicado sólo a los hermanos.

Evidentemente, otros factores distintos del poder pueden haber afectado al resultado de la prueba en los estudios que se detallan en la Tabla 2. En el estudio de Fornage et al.¹⁰, por ejemplo, donde no se observó ninguna diferencia en la frecuencia de T235 entre casos y controles, debe destacarse que esta diferencia fue significativa entre hombres y mujeres del grupo de controles normotensos (0,47 frente a 0,36, $\chi^2_1=4,8$, $p<0,05$) y de la muestra completa (0,46 frente a 0,37, $\chi^2_1=5,32$, $p<0,03$), lo que indica que puede haber otro factor contaminante entre los dos grupos. La razón de la falta de significación, a pesar del poder adecuado del estudio de Hingorani et al.¹¹, sigue sin estar clara; estos autores han propuesto que su estudio puede ser más representativo de la población numerosa de sujetos hipertensos que normalmente está controlada por médicos de familia.

Los estudios no incluidos en la Tabla 2, independientemente de su validez intrínseca, usaron definiciones de casos posiblemente distintas de las de Jeunemaitre et al.³. Varios estudios usaron medidas casuales independientes de la PA como fenotipo, lo que claramente no equivale a hipertensión clínica clara. En el estudio de Tiret et al.¹², los casos de hipertensión se seleccionaron entre los supervivientes de un infarto de miocardio. En el estudio realizado por Kiema et al.¹³ en Finlandia, los casos y controles se seleccionaron indirectamente por medio del examen de los archivos de la Seguridad Social. Los casos se definieron usando la variable auxiliar de porcentaje de reembolso del 75% o más de la medicación de la hipertensión. Como ellos manifestaron, la probabilidad de acceder a este reembolso depende fundamentalmente de algunos factores, como lesión de los órganos diana, antecedentes familiares de enfermedades cardiovasculares y muerte súbita, hiperlipidemia o diabetes (un criterio de exclusión del estudio inicial de Jeunemaitre et al.³). Los controles se seleccionaron aleatoriamente del mismo archivo, intentando excluir a los sujetos con derecho a reembolso de los gastos en medicación para la hipertensión. Sin embargo, Kiema et al. indicaron que más del 10% de estos controles estaban recibiendo una medicación crónica que afectaba a la PA. Sorprendentemente, más de la mitad de estos controles tuvieron una PA sistólica superior a 140 mm Hg y, en función de los datos publicados, puede estimarse que menos del 50% de estos controles se calificarían como sujetos normotensos, con una PA sistólica menor de 140 mm Hg y una PA diastólica menor de 90 mm Hg.

Conclusión

Las hipótesis predichas en función una prueba estadística pueden someterse rigurosamente a una replicación independiente, pero esto requiere asegurarse de que se examina la misma variable. Los resultados de las pruebas pueden interpretarse cuidadosamente haciendo referencia a la teoría de las pruebas estadísticas de Neyman-Pearson. El poder tiene una importancia fundamental en esta práctica. Un buen conocimiento de estos conceptos es esencial para valorar la evidencia científica.

Para concluir esta discusión, debemos decir que la variabilidad de la significación estadística de los intentos de replicación no es controvertida. Por el contrario, es una característica esperada de las pruebas de hipótesis en muestras finitas. Cualquier fuente adicional de heterogeneidad, bien en la población, en el muestreo o en la definición de casos y controles, sólo puede comprometer nuestra capacidad de extraer conclusiones a partir de observaciones de muestras.

Apéndice

Cálculo del poder en tablas de contingencia de dos vías

Cálculo del poder

Consideremos que P_C y P_R denotan la frecuencia de alelos T en casos y controles de la población de referencia, respectivamente. Igualmente, definiremos n_C y n_R como el número de genes investigados en los casos y controles, respectivamente. Si $n_C = n_R$, definimos $n = n_C$; si no es así, calculamos la media geométrica:

$$n = 2n_C n_R / (n_C + n_R).$$

Usando la transformación arcoseno $\theta = 2 \arccos(p^{1/2})$, calculamos θ_C y θ_R , y $h = \theta_C - \theta_R$. La función arcoseno también se denomina seno inverso o seno^{-1} en la mayoría de las máquinas calculadoras, y evidentemente, en la situación actual, la calculadora debería prepararse para trabajar con radianes en vez de grados. Si esto no existe en la calculadora, puede utilizarse una aproximación de la serie de Taylor:

$$\text{seno}^{-1} p = p + p^3/6 + 3 p^5/40 + 5 p^7/112). \text{ Calcular:}$$

$$Z_{1-\beta} = h(n/2)^{1/2} - Z_{1-\alpha}.$$

La cantidad $Z_{1-\beta}$ da la probabilidad de que una variable normal con media cero y varianza de la unidad sea más pequeña que $1-\beta$. Habiendo calculado lo primero, lo segundo, o poder, se obtiene haciendo referencia a una tabla de distribución normal. Con unos valores determinados de P_C y P_R , la fórmula puede usarse para calcular el

poder esperado de un estudio planeado para cualquier valor dado de los tamaños de muestra n_C y n_R . El lector puede consultar un libro de texto de estadística estándar, como el Cohen¹⁴, para obtener más detalles.

Un ejemplo numérico

Para ilustrar cómo se calculó el poder en nuestra tabla sinóptica, consideramos el estudio de Caulfield et al.¹⁵. Queremos calcular el poder para detectar en este estudio una diferencia específica en la frecuencia del marcador T235 en casos y controles en personas de raza blanca. Elegimos como mejor estimación de frecuencia del gen la derivada del trabajo inicial de Jeunemaitre et al.³, es decir, $P_C = 0,47$ y $P_R = 0,36$. El número de alelos investigados en el estudio de Caulfield et al.¹⁵ fueron $n_C=126$ y $n_R=128$ en casos y controles, respectivamente (ver Tabla 2). Siguiendo los datos de nuestra sección sobre el cálculo de poder, calculamos:

$$\begin{aligned} \theta_C &= 2 \arccos(p_C^{1/2}) &&= 1,5108 \\ \theta_R &= 2 \arccos(p_R^{1/2}) &&= 1,2870 \\ h &= \theta_C - \theta_R &&= 0,2238 \\ n &= 2n_C n_R / (n_C + n_R) &&= 126,99 \end{aligned}$$

Para calcular el poder a un nivel de significación de $\alpha=0,05$, obtuvimos $z_{1-\alpha}$ de una tabla de distribución normal $z_{1-\alpha} = 1,65$ (el valor de t, en la tabla, para el cual el área de sombra bajo la curva es igual a 0,95). Usando la fórmula (2), obtenemos:

$$z_{1-\beta} = 0,1824 \cdot 7,9581 - 1,65 = 0,1330.$$

Esto da el valor de p que debe referirse en la tabla de la distribución normal para obtener el poder $1-\beta = 0,55$.

Bibliografía

1. Hacking I: Logic of statistical inference. London, Cambridge University Press, 1974, pp 232.
2. Stewart LA, Clarke MJ: Practical methodology of meta-analyses (overviews) using updated individual patient data: Cochrane Working Group. Stat Med 1995;14:2057-2079.
3. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A: Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. Cell 1992;71:169-180.
4. Mayes LC, Horwitz RI, Feinstein AR: A collection of 56 topics with contradictory results in case-control research. Int J Epidemiol 1988;17:680-685.
5. Jeunemaitre X, Inoue I, Williams C, Charru A, Tichet J, Powers M: Haplotypes of angiotensinogen in essential hypertension. Am J Hum Genet 1997;60:1448-1460.
6. Schmidt S, Sharma AM, Zilch O, Beige J, Walla-Friedel M, Ganten D: Association of M235T variant of the angiotensinogen gene with familial hypertension of early onset. Nephrol Dial Transplant 1995;10:1145-1148.

7. Johnson AG, Simons LA, Friedlander Y, Simons J, Davis DR, MaCallum J: M235->T polymorphism of the angiotensinogen gene predicts hypertension in the elderly. *J Hypertens* 1996;14:1061-1065.
8. Kunz R, Kreutz R, Beige J, Distler A, Sharma AM: Association between the angiotensinogen 235T-variant and essential hypertension in whites: a systematic review and methodological appraisal. *Hypertension* 1997;30:1331-1337.
9. Bennett CL, Schrader AP, Morris BJ: Cross-sectional analysis of Met235->Thr variant of angiotensinogen gene in severe, familial hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;197:833-839.
10. Fornage M, Turner ST, Sing CF, Boerwinkle E: Variation at the M235T locus of the angiotensinogen gene and essential hypertension: a population-based case-control study from Rochester, Minnesota. *Hum Genet* 1995;96:295-300.
11. Hingorani AD, Sharma P, Jia H, Hopper R, Brown MJ: Blood pressure and the M235T polymorphism of the angiotensinogen gene. *Hypertension* 1996;28:907-911.
12. Tiret L, Ricard S, Poirier O, Arveiler D, Cambou JP, Luc G: Genetic variation at the angiotensinogen locus in relation to high blood pressure and myocardial infarction: the ECTIM study. *J Hypertens* 1995;13:311-317.
13. Kiema TR, Kauma H, Rantala AO, Lilja M, Reunanen A, Kesaniemi YA: Variation at the angiotensin-converting enzyme gene and angiotensinogen gene loci in relation to blood pressure. *Hypertension* 1996;28:1070-1075.
14. Cohen J: *Statistical Power Analysis for the Behavioral Science*. New York: Academic Press, 1977.
15. Caulfield M, Lavender P, Farrall M, Munroe P, Lawson M, Turner P: Linkage of the angiotensinogen gene to essential hypertension [see comments]. *N Engl J Med* 1994;330:1629-1633.
16. Jeunemaitre X, Charru A, Chatellier G, Dumont C, Sassano P, Soubrier F: M235T variant of the human angiotensinogen gene in unselected hypertensive patients. *J Hypertens* 1993;11(suppl 5):S80-s81.
17. Barley J, Blackwood A, Sagnella G, Markandu N, MacGregor G, Carter N: Angiotensinogen Met235-Thr polymorphism in a London normotensive and hypertensive black and white population. *J Hum Hypertens* 1994;8:639-640.