

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/8000481>

# [Angiotensin converting enzyme gene polymorphisms and coronary risk in a Portuguese population]

**Article** in *Revista portuguesa de cardiologia: orgao oficial da Sociedade Portuguesa de Cardiologia = Portuguese journal of cardiology: an official journal of the Portuguese Society of Cardiology* · January 2005

Source: PubMed

CITATIONS

5

READS

82

16 authors, including:



**Maria Isabel Mendonca**  
Hospital Central do Funchal  
72 PUBLICATIONS 260 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



**Ana Isabel Freitas**  
Universidade da Madeira  
51 PUBLICATIONS 384 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



**Sônia Maria da Silva Gomes**  
Universidade Federal da Bahia  
66 PUBLICATIONS 231 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



**Sonia Freitas**  
Serviço de Saúde da RAM, E.P.E.  
58 PUBLICATIONS 135 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



CARDIOGENETICS FOR PRECISION MEDICINE [View project](#)



IMPEDDANS [View project](#)

# Polimorfismos do Gene da ECA e Risco de Doença Coronária numa População Portuguesa [104]

ISABEL MENDONÇA, ISABEL A. FREITAS, CÉLIA A. SOUSA, SUSANA GOMES, PAULA FARIA, ANTÓNIO DRUMOND,  
GRAÇA SILVA, JORGE J. ARAÚJO, SÓNIA FREITAS, ILÍDIO ORNELAS, GRAÇA ANDRADE, ANA P. COELHO,  
P. MARQUES SILVA, ALMADA CARDOSO, ANTÓNIO A. BREHM, R. PALMA DOS REIS

Departamento de Cardiologia Médico-Cirúrgica do Hospital Central do Funchal,  
Madeira, Portugal

**Rev Port Cardiol 2004;23 (12): 1593-1601**

## RESUMO

*Introdução:* A história familiar de doença das artérias coronárias (DAC) constitui um poderoso marcador de risco de DAC, independente dos factores de risco tradicionais. Poderá ser descodificado reconhecendo os polimorfismos associados ao aumento de risco. Têm surgido resultados contraditórios em relação à ligação entre os polimorfismos do gene da enzima de conversão da angiotensina (ECA) e o risco de DAC.

*Objectivo:* Com o presente trabalho pretendemos avaliar se os polimorfismos do gene da ECA constituem factor de risco de doença das artérias coronárias.

*Métodos:* Estudo caso-controlo, incluindo 517 controlos escolhidos aleatoriamente dos cadernos eleitorais, sem história sugestiva de DAC e 301 doentes com história de enfarte agudo do miocárdio ou doença coronária confirmada por coronariografia, com pelo menos 75 % de obstrução de um dos vasos coronários. Tentou-se que os casos e controlos não fossem significativamente diferentes em termos de sexo e idade.

Os polimorfismos dialélicos do gene da ECA foram tipados por amplificação por PCR. Os produtos de amplificação eram identificados em gel de poliacrilamida, por electroforese. Os dados foram avaliados recorrendo ao SPSS for Windows,

## ABSTRACT

### Angiotensin Converting Enzyme Gene Polymorphisms and Coronary Risk in a Portuguese Population

*Background:* A family history of coronary heart disease (CHD) is a strong risk marker for the disease, independently of classical risk factors. It could be decoded by recognizing the polymorphisms associated with increased risk. Renin-angiotensin system genes are candidate genes in CHD and the deletion allele of the angiotensin converting enzyme (ACE) has been reported as deleterious. However, there is disagreement as to the role of the insertion/deletion polymorphism of the ACE gene in coronary risk.

*Aim:* To evaluate whether ACE gene polymorphisms constitute a CHD risk factor.

*Methods:* We conducted a population-based case-control study of 301 subjects with a history of myocardial infarction or angiographic evidence of coronary heart disease and 510 age- and gender-matched controls, without CHD, living in a region with high CHD mortality rates. Blood samples were taken, DNA extracted and genotypes determined by the polymerase chain reaction (PCR). Amplification products were identified by agarose gel electrophoresis.

Este estudo está integrado no projecto de Investigação e de Desenvolvimento Tecnológico SAPIENS PROJECT 2001 (POCTI/MGI/2001) subsidiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia.

*This work, Sapiens PROJECT 2001 (POCTI/MGI/2001), was supported by a grant from the Foundation for Science and Technology.*

Recebido para publicação: Agosto de 2004 • Aceite para publicação: Setembro de 2004  
Received for publication: August 2004 • Accepted for publication: September 2004

Tendo sido avaliado o  $\chi^2$  e o *odds ratio* e intervalos de confiança de 95 % dos diferentes polimorfismos.

**Resultados:** Foram avaliados 296 casos e 509 controlos. A prevalência dos genótipos DD, ID e II foi de 41,2 %, 46,3 %, 12,5 %, nos casos e 28,1 %, 55,2 % e 16,7 %, no grupo controlo. A frequência do genótipo DD foi significativamente mais elevada nos casos em relação aos controlos (41,2 %, vs 28,1 %, *Odds ratio* de 1,79, intervalo de confiança de 95 % de 1,31 a 2,45,  $p < 0,0001$ ). Pelo contrário a prevalência dos genótipo ID e II foi mais elevada no grupo controlo vs casos (55,2 % vs 46,3 %  $p = 0,002$ ) e (16,7 % vs 12,5 %,  $p = ns$ ).

**Conclusões:** O genótipo DD aparece neste estudo claramente ligado à doença das artérias coronárias, com um alto grau de significância. O genótipo ID é protector. A confirmar-se este conceito, poderá justificar-se fazer uma prevenção vascular mais agressiva nos indivíduos com o genótipo DD.

**Palavras-Chave**

Doença Coronária; Gravidade; Extensão, Gene; Polimorfismo; Enzima de Conversão da Angiotensina

**Statistical analysis:** The Data were evaluated by SPSS for Windows, using the Student's t test, the chi-square test, odds ratios and 95 % confidence intervals.

**Results:** The prevalence of the DD, ID and II genotype was 41.2 %, 46.3 %, 12.5 % in the cases and 28.1 %, 55.2 % and 16.7 % in the control group. The frequency of the DD genotype was significantly higher in the cases than in the controls (41.2 % vs. 28.1 %, odds ratio 1.79, 95 % CI 1.31 to 2.4,  $p < 0.0001$ ). By contrast, the ID and II genotypes' prevalence was higher in the control group (55.2 % vs. 46.3 %,  $p = 0.002$  and 16.7 % vs. 12.5 %,  $p = NS$ , respectively) compared to the case group.

**Conclusions:** This study clearly shows that the ACE DD polymorphism is strongly linked to CHD, and if our data are confirmed in a larger population sample, more aggressive vascular prevention could be justified in patients carrying the DD genotype.

**Key words**

Coronary disease; Severity; Extension; Gene; Polymorphism; Angiotensin converting Enzyme

## INTRODUÇÃO

A doença das artérias coronárias (DAC) é a principal causa de morte nas sociedades ocidentais. A sua relação com os factores de risco tradicionais é bem conhecida<sup>(1)</sup>.

A história familiar constitui um poderoso factor de risco independente dos factores de risco tradicionais<sup>(2)</sup>. A etiologia da DAC é pois multigénica e multifactorial, envolvendo factores genéticos e comportamentais. As variações genéticas (polimorfismos) em genes causais ou susceptíveis constituem a base dos mecanismos moleculares que podem conduzir à eclosão da DAC, e são consideradas um marcador de risco<sup>(3)</sup>.

A cascata do Sistema Renina Angiotensina (SRA) inclui duas enzimas, uma primeira, a renina, que actua sobre o angiotensinogénio para formar a angiotensina I e um segundo, a enzima conversora da angiotensina (ECA), que vai actuar sobre a angiotensina I e gerar o péptido effector activo, a angiotensina II. Os efeitos da angiotensina II, são mediados por receptores na superfície celular, receptores tipo I, da angio-

## INTRODUCTION

Coronary heart disease (CHD) is the main cause of death in Western societies and its relationship with classical risk factors is well known<sup>(1)</sup>.

A family history of the disease is a strong risk marker for CHD, independently of classical risk factors<sup>(2)</sup>. The etiology of CHD is multigenic and multifactorial, involving genetic and behavioral factors. Genetic variations (polymorphisms) in causal or susceptible genes form the basis for the molecular mechanisms that can lead to the development of CHD and are considered a risk marker<sup>(3)</sup>.

The renin-angiotensin system (RAS) cascade includes two enzymes: renin, which acts on angiotensinogen to produce angiotensin I, and angiotensin-converting enzyme (ACE), which acts on angiotensin I to give rise to the effector peptide, angiotensin II. The effects of angiotensin II are mediated by cell surface receptors: type I (AGTR1) and type II (AGTR2).

tensina II (AGTR 1) e receptores tipo 2 da Angiotensina II (AGTR 2). Adicionalmente ao seu papel com acção vasoconstritora que tem um efeito fundamental na regulação do tonus vascular e da pressão arterial, está também envolvida na disfunção endotelial vascular e apoptose, peroxidação das lipoproteínas, produção de citocinas pró inflamatórias, proliferação das células musculares lisas, síntese de matriz vascular, todos estes mecanismos importantes na formação e progressão da aterosclerose<sup>(4)</sup>. Os genes que codificam os componentes do SRA são candidatos muito atractivos para as doenças do sistema cardiovascular.

A partir das investigações de Cambien (1992) o polimorfismo DD da ECA tem sido considerado um factor de risco para DAC<sup>(5)</sup>. O polimorfismo Inserção/Delecção é caracterizado pela presença (inserção-I) ou pela ausência (delecção-D) de uma sequência Alu de 287 pares de bases no intron 16.

Os níveis plasmáticos da ECA são estáveis em cada indivíduo, mas diferem grandemente entre os indivíduos. Esta variação é fortemente influenciada pelo polimorfismo I/D. Os níveis plasmáticos da ECA, são aproximadamente duas vezes mais elevados nos DD homozigotos, em relação aos I/I, estando portanto expostos a níveis mais elevados de Angiotensina II<sup>(6)</sup>.

Uma associação positiva entre o risco de DAC e o polimorfismo DD, tem sido encontrada em muitos estudos<sup>(7)</sup>. No entanto outros têm mostrado resultados contraditórios<sup>(8)</sup>.

O objectivo do nosso estudo é avaliar se os polimorfismos do gene da Enzima de Conversão da Angiotensina I (I/D) constituem factor de risco de doença das artérias coronárias.

## MATERIAL E MÉTODOS

Estudo caso-controlo que incluiu 296 casos seleccionados após alta hospitalar durante o ano de 2001/2002, com idade média  $55 \pm 10,3$  anos, história de enfarte agudo do miocárdio (EAM) ou doença coronária com pelo menos 75% de obstrução de um dos vasos coronários principais por coronariografia. Avaliámos, 509 controlos escolhidos aleatoriamente dos cadernos eleitorais da Região Autónoma da Madeira, com idade média de  $53,5 \pm 10,3$ , entre os indivíduos sem antecedentes ou história sugestiva de doença coronária.

A todos eram pedidos e registados dados demográficos clínicos e os factores de risco tradi-

In addition to its vasoconstrictor action, which has a fundamental effect on regulating vascular tone and blood pressure, it is also involved in endothelial dysfunction and apoptosis, lipoprotein peroxidation, pro-inflammatory cytokine production, vascular smooth muscle cell proliferation and vascular matrix synthesis, all important mechanisms in the development and progression of atherosclerosis<sup>(4)</sup>. The genes that code for components of the RAS are therefore likely candidates for cardiovascular diseases.

Since Cambien's study in 1992, the DD polymorphism of the ACE gene has been considered a risk factor for CHD<sup>(5)</sup>. The insertion/deletion polymorphism is characterized by the presence (Insertion - I) or absence (Deletion - D) of a 287-base pair (bp) alu sequence in intron 16.

Plasma ACE levels are stable in each individual but vary greatly between individuals. This variation is strongly influenced by the I/D polymorphism. The levels are approximately twice as high in DD homozygotes compared to those with the II genotype and they are therefore exposed to higher levels of angiotensin II<sup>(6)</sup>.

A positive association between the risk for CHD and the DD polymorphism has been found in many studies<sup>(7)</sup>, but other studies have shown conflicting results<sup>(8)</sup>.

The aim of our study is to evaluate whether ACE gene I/D polymorphisms constitute a CHD risk factor.

## METHODS

We conducted a case-control study of 296 cases selected following hospital discharge over a year-long period in 2001/2002, with a mean age of  $55 \pm 10.3$  years and a history of myocardial infarction or angiographic evidence of coronary heart disease with at least 75% obstruction of one of the main coronary arteries. We also assessed 509 controls randomly selected from the electoral rolls of the Autonomous Region of Madeira, with a mean age of  $53.5 \pm 10.3$  years and no history or suggestion of coronary heart disease.

For all participants the following demographic and clinical data were recorded: age, gender, weight, height, profession, smoking habits, alcohol consumption, physical exercise, presence or absence of diabetes and hypertension

cionais: idade, sexo, peso, altura, profissão, hábitos tabágicos, ingestão de álcool, actividade física, presença ou ausência de hipertensão arterial (HTA) e diabetes, sendo registadas três medições da pressão arterial com aparelho automático – Welch Allyn.

A HTA foi definida pela existência de uma pressão sistólica  $\geq 140$  mmHg e ou de uma pressão diastólica  $\geq 90$  mmHg. Os doentes eram classificados como tendo hipertensão arterial (HTA) se referiam cumprir medicação anti-hipertensora ou apresentavam uma tensão arterial sistólica  $\geq 140$  mmHg e ou uma pressão diastólica  $\geq 90$  mmHg.

A diabetes era considerada caso fossem utilizados antidiabéticos orais ou insulina ou o valor da glicémia basal fosse  $\geq 7,8$  mmol/l ( $126$  mg/dl)<sup>(9)</sup>.

O Índice de Massa Corporal (IMC) foi calculado pela fórmula peso/altura<sup>2</sup>, sendo a obesidade definida como um índice de massa corporal superior a  $30$  kg/m<sup>2</sup><sup>(10)</sup>.

O indivíduo foi considerado fumador se fumava, ou tinha menos de cinco anos de abstinção tabágica.

A dislipidemia foi definida pela existência de um valor de colesterol total  $\geq 5,2$  mmol/l ou  $200$  mg/dl, colesterol LDL  $\geq 3,4$  mmol/l ou  $130$  mg/dl, HDL  $< 40$  mg/dl e triglicérides  $\geq 1,5$  mmol/l ou  $150$  mg/dl, ou se o indivíduo fazia medicação antidislipidémica<sup>(11)</sup>.

As amostras sanguíneas para determinações bioquímicas e extracção do ADN eram obtidas após 12 horas de jejum.

Todos os indivíduos deram o seu consentimento informado e o protocolo do estudo teve a aprovação da Comissão de Ética do nosso Hospital.

### Análises Bioquímicas

No respeitante às análises laboratoriais e para determinar as concentrações séricas de glucose, colesterol total, triglicérides, HDL colesterol e LDL colesterol, o sangue era colhido, após pelo menos 12 horas de jejum, em tubo seco que era centrifugado meia hora depois, a  $3500$  g. Os valores de colesterol total, colesterol LDL, HDL e triglicérides eram quantificados no soro, com um auto analisador «Hitachi 911» através de uma técnica enzimática. Para o colesterol HDL e LDL usamos uma técnica enzimática directa. Os marcadores bioquímicos de risco: lipoproteína (a), apolipoproteína B100, e proteína C reactiva de alta sensibilidade eram

(HT), based on three blood pressure measurements with a Welch Allyn automatic system.

HT was defined as systolic blood pressure of  $\geq 140$  mmHg and/or diastolic blood pressure of  $\geq 90$  mmHg. Patients who reported taking antihypertensive medication were also classified as having HT.

Diabetes was considered to be present in patients taking oral antidiabetics or insulin and in those with fasting glycemia of over  $7.8$  mmol/l or  $126$  mg/dl<sup>(9)</sup>.

Body mass index (BMI) was calculated by weight/height<sup>2</sup>, with obesity defined as a BMI of more than  $30$ <sup>(10)</sup>.

Patients who smoked or had ceased less than five years previously were considered smokers.

Dyslipidemia was defined as total cholesterol of  $\geq 5.2$  mmol/l or  $200$  mg/dl, LDL-C of  $\geq 3.4$  mmol/l or  $130$  mg/dl, HDL-C of  $< 40$  mg/dl, and triglycerides of  $\geq 1.5$  mmol/l or  $150$  mg/dl, as well as being considered present in individuals taking lipid-lowering medication<sup>(11)</sup>.

Blood samples for biochemical analysis and DNA extraction were taken after 12 hours fasting.

All patients gave their informed consent and the study protocol was approved by the Ethics Committee of our hospital.

### Biochemical analysis

For laboratory analyses and determination of serum concentrations of glucose, total cholesterol, triglycerides, HDL-C and LDL-C, blood samples were taken following at least 12 hours fasting, placed in dry tubes and centrifuged half an hour later at  $3500$  g. Serum levels of total cholesterol, LDL-C, HDL-C and triglycerides were quantified using a Hitachi 911 auto-analyzer by an enzymatic technique. A direct enzymatic technique was used for HDL and LDL cholesterol. Biochemical risk markers (lipoprotein(a), apolipoprotein B100, and high-sensitivity C-reactive protein) were quantified by nephelometry using a Behring BN 100 automatic system. Homocysteine was measured by fluorescence polarized immunoassay using an Abbot IMX automatic device.

To measure fibrinogen, antithrombin III, protein C and protein S, samples were also taken with the patient fasting, into a tube containing sodium citrate. The blood was centrifuged for 10 minutes at  $2500$  g at ambient tempera-

quantificados por um aparelho automático «Behring» BN 100, pela técnica de Nefelometria. A homocisteína era determinada pela técnica de Imunoensaio de fluorescência polarizada (FPIA), num aparelho automático IMX (Abbot).

Em relação ao fibrinogénio, antitrombina III, proteína C e proteína S, a colheita era também feita com o doente em jejum, num tubo com citrato de sódio. O sangue era centrifugado durante 10 minutos com 2500 g à temperatura ambiente sendo testado de imediato. Se necessário procedíamos ao seu congelamento a -20 graus centígrados, sendo feita previamente uma segunda centrifugação afim de retirar as plaquetas. Os doseamentos eram efectuados num analisador automático «Behring BCS», tendo sido utilizado o método automático-cromogénico para o doseamento da antitrombina III, proteína C e proteína S. Em relação aos parâmetros laboratoriais acima citados, os valores considerados de referência para o nosso laboratório e de acordo com as técnicas mencionadas são os seguintes:

- Homocisteína: 15 µmol/l;
- Lipoproteína (a): nos indivíduos são apresenta uma distribuição assimétrica e - pode ultrapassar os 100 mg/dl, o risco de aterosclerose aumenta para um nível superior a 30 mg/dl;
- Apolipoproteína B: 55-125 mg/dl no sexo feminino e 55-140 mg/dl no sexo masculino;
- Proteína C Reactiva - os valores de PCR considerados no nosso estudo foram os da PCR de alta sensibilidade (PCR-as) com níveis entre 0 e 1 mg/dl;
- Antitrombina III - 75 a 125 %;
- Proteína C - 70 a 140 %;
- Proteína S - 70 a 123 %;
- Fibrinogénio - 200 a 400 mg/dl.

#### Análises genéticas

O ADN genómico foi extraído a partir de 80 ml de sangue periférico usando um método standard fenol-clorofórmio com precipitação por acção do etanol.

Todos os polimorfismos estudados foram genotipados pela reacção de polimerização em cadeia (PCR) num termociclador Hybaid.

Para o polimorfismo I/D do gene ECA foram utilizados os seguintes *primers*: *forward* 5' -

ture and tested immediately. If necessary, it was frozen at -20 °C, following a second centrifugation in order to remove platelets. Measurements were taken with a Behring BCS automatic analyzer, using an automated chromogenic method to measure antithrombin III, protein C and protein S. The reference values used by our laboratory for the above parameters and in accordance with the techniques employed were as follows:

- Homocysteine: 15 µmol/l;
- Lipoprotein(a): this has an asymmetrical distribution in healthy individuals and can be over 100 mg/dl, but the risk for atherosclerosis increases for values above 30 mg/dl;
- Apolipoprotein B: 55-125 mg/dl in women and 55-140 mg/dl in men;
- C-reactive protein: the values used in our study were for high-sensitivity C-reactive protein, with levels between 0 and 1 mg/dl;
- Antithrombin III: 75 to 125 %;
- Protein C: 70 to 140 %;
- Protein S: 70 to 123 %;
- Fibrinogen: 200 to 400 mg/dl.

#### Genetic analysis

Genomic DNA was extracted from 80 ml of peripheral blood using a standard phenol-chloroform method and ethanol precipitation.

All the polymorphisms under study were genotyped by the polymerase chain reaction in a Hybaid thermocycler. The following primers were used for the ACE gene I/D polymorphism: forward 5' - GCC CTG CAG GTG TCT GCA GCA TGT -3' and reverse 5' - GGA TGG CTCTCC CCG CCT TGT CTC -3'.

Around 100 ng of DNA from each individual was subjected to 40 cycles of 1 minute at 94 °C, 1 minute at 62 °C and 1 minute at 72 °C. The amplification products, 597 bp in the case of the I (insertion) allele and 319 bp in the case of the D (deletion) allele, were identified by T9C5 polyacrylamide gel electrophoresis. Due to the preferential amplification of the D allele, all the samples presenting the DD genotype were re-amplified using primers specific for insertion: forward 5' - TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAC -3' and reverse 5' - TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA -3' (*Fig. 1*).

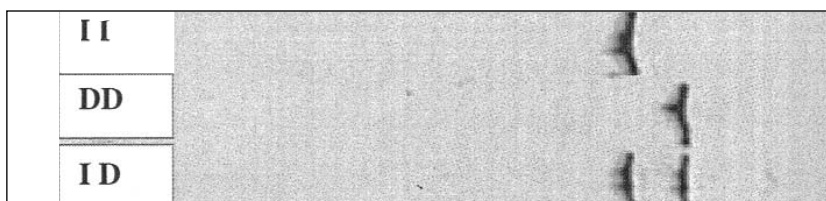


Fig. 1 Polimorfismo I/D do Enzima de Conversão da Angiotensina.

Fig. 1 I/D polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene.

GCC CTG CAG GTG TCT GCA GCA TGT -3' e reverse 5' – GGA TGG CTCTCC CCG CCT TGT CTC - 3'.

Cerca de 100 ng de ADN de cada indivíduo foram submetidas a 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 62°C e 1 minuto a 72°C. Os produtos de amplificação, 597 pb no caso do alelo I (inserção) e 319 pb no caso do alelo D (delecção) foram identificados por electroforese em gel de poliacrilamida T9C5. Devido à preferencial amplificação do alelo D, todas as amostras que apresentavam o genótipo DD foram re-amplificadas com *primers* específicos para a inserção: *forward* 5' – TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAC -3 e *reverse* 5' – TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA -3'. (Fig. 1)

#### Análise Estatística

A análise dos dados foi feita através da utilização do *software* estatístico SPSS for Windows versão 11.0, Chicago, Illinois.

Considerou-se um valor  $p < 0,05$  como estatisticamente significativo. Todas as variáveis contínuas são apresentadas com a respectiva média  $\pm$  desvio padrão (DP).

As frequências das variantes genéticas foram avaliadas pelo teste do  $\chi^2$ .

#### RESULTADOS

A nossa população era constituída por 296 doentes coronários e 509 indivíduos sem doença coronária, sendo a população doente signi-

Quadro I

#### Características demográficas e factores de risco (população estudada)

Variáveis	Casos (n = 296)	Controlo (n = 509)	Significância (grupo)
Idade (média $\pm$ DP)	55 $\pm$ 10,3	53,5 $\pm$ 10,3	ns
Sexo masculino (%)	234 (79,1%)	293 (57,6%)	$p < 0,0001$
Obesidade (%)	85 (28,7%)	93 (18,3%)	$p = 0,001$
Álcool (%)	103 (34,8%)	84 (16,5%)	$p < 0,0001$
Tabagismo (%)	139 (7%)	20 (3,9%)	$p < 0,0001$
Hipertensão arterial (%)	173 (58,4%)	114 (22,4%)	$p < 0,0001$
Hipercolesterolemia (%)	156 (52,7%)	309 (60,7%)	$p = 0,027$
Diabetes (%)	64 (21,6%)	25 (4,9%)	$p < 0,0001$

#### Statistical analysis

Statistical analysis of the data was carried out using SPSS for Windows, version 11.0 (Chicago, Illinois).

A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant. All continuous variables are presented as means  $\pm$  standard deviation.

Frequencies of genetic variants were determined by the chi-square test.

#### RESULTS

Our population consisted of 296 coronary patients and 509 individuals without CHD, the case population having significantly greater obesity, alcohol consumption, hypertension and diabetes, and more smokers (Table I).

The homozygous D allele was more common in the cases than in the controls: 41.2% vs. 28.1%, odds ratio 1.79, 95% confidence interval (CI) 1.31 to 2.45 ( $p < 0.0001$ ). The ID and II genotypes were more frequent in the controls compared to the cases: 55.2% vs. 46.3%, odds ratio 0.70, 95% CI 0.52 to 0.9 ( $p = 0.022$ ) for the ID genotype, and 16.7% vs. 12.5% ( $p = NS$ ) for the II genotype.

#### DISCUSSION

Atherosclerosis is a multifactorial and multi-genetic disease whose pathophysiology involves interactions between genes and the environment.

Various classical risk factors for CHD were identified in our study population, including

Table I

#### Demographic characteristics and risk factors (study population)

Variables	Cases (n = 296)	Control (n = 509)	Significance (group)
Age (mean $\pm$ standard deviation)	55 $\pm$ 10,3	53.5 $\pm$ 10.3	NS
Male (%)	234 (79.1%)	293 (57.6%)	$p < 0.0001$
Obesity (%)	85 (28.7%)	93 (18.3%)	$p = 0.001$
Alcohol (%)	103 (34.8%)	84 (16.5%)	$p < 0.0001$
Smoking (%)	139 (7%)	20 (3.9%)	$p < 0.0001$
Hypertension (%)	173 (58.4%)	114 (22.4%)	$p < 0.0001$
Dyslipidemia (%)	156 (52.7%)	309 (60.7%)	$p = 0.027$
Diabetes (%)	64 (21.6%)	25 (4.9%)	$p < 0.0001$

Quadro II

**Polimorfismo do gene do enzima de conversão da angiotensina**

	Caso (n = 296)	Controlo (n = 509)	Significância (p valor)	Odds ratio (Intervalo de confiança)
DD	122 (41.2%)	143 (28.1%)	p<0.0001	1.79 (1.31-2.45)
ID	137 (46.3%)	281 (55.2%)	p=0.22	0.70 (0.52-0.94)
II	37 (12.5%)	85 (16.7%)	NS	0.71 (0.46-1.10)

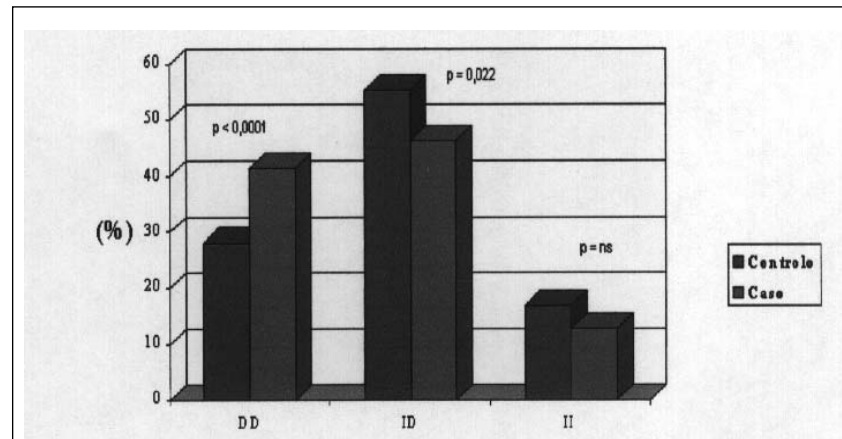
Table II

**I/D polymorphisms of the angiotensin converting enzyme gene (ACE I/D)**

	Case (n = 296)	Control (n = 509)	Significance (p valor)	Odds ratio (Confidence interval)
DD	122 (41.2%)	143 (28.1%)	p<0.0001	1.79 (1.31-2.45)
ID	137 (46.3%)	281 (55.2%)	p=0.22	0.70 (0.52-0.94)
II	37 (12.5%)	85 (16.7%)	NS	0.71 (0.46-1.10)

Fig. 2 Polimorfismo do Gene da ECA.

Fig. 2 ACE gene polymorphism.



ficativamente mais obesa, mais fumadora, com maior ingestão de álcool, mais hipertensão arterial e mais diabetes (Quadro I).

O alelo D em homozigotia é mais frequente nos casos em relação aos controlos: 41,2% vs 28,1% com *odds ratio* 1,79, intervalos de confiança (IC) de 95% de 1,31 a 2,45 (p < 0,0001), os genótipos ID e II, são mais frequentes nos controlos, em relação aos casos: 55,2% vs 46,3% com *odds ratio* 0,70 e IC de 95% de 0,52 a 0,9 (p = 0,022), no genótipo ID e 16,7% vs 12,5% com p não significativo, no genótipo II.

**DISCUSSÃO**

A aterosclerose é uma doença multifactorial e multigénica cuja fisiopatologia envolve interacções entre os genes e o ambiente.

Na população do nosso estudo, foram identificados vários factores de risco tradicionais para DAC, tais como: sexo, idade, HTA, tabagismo, obesidade, diabetes e níveis elevados de colesterol. Em muitos casos, o desenvolvimento da DAC, não se associa aos factores de risco tradicionais, podendo surgir acidentes coronários agudos em indivíduos sem qualquer dos factores de risco conhecidos, enquanto outros podem permanecer saudáveis, apesar de fumar ou terem níveis de colesterol elevados.

gender, age, HT, smoking, obesity, diabetes and high cholesterol levels. However, in many cases, CHD is not associated with conventional risk factors, and acute coronary events can occur in patients with none of the known risk factors, while other individuals may remain healthy despite smoking or having high cholesterol levels.

We therefore feel that identifying new risk factors, particularly those of genetic origin, that predispose to the development and progression of CHD is of great importance. In contrast to some studies<sup>(12-13)</sup>, our results show a significant association between the DD polymorphism of the ACE gene and CHD. On the other hand, other studies have obtained similar results to ours<sup>(14-15)</sup>.

Our investigation has certain limitations since it is a case-control study, in which the pathology in question, CHD, has very high mortality. In these circumstances, if cases with a particular genetic profile have a high mortality rate, they will not feature in the study and this will influence the results. However, this obvious limitation does not negate the study's conclusions, since any influence on the results will only underestimate the importance of the genetic polymorphisms that may increase risk, by reducing the number of cases included through death.

Assim, entendemos que a identificação de novos factores de risco, em especial de origem genética, que predisponham à eclosão e progressão desta doença, se reveste de grande importância. Contrariamente a outros estudos<sup>(12-13)</sup> os nossos resultados mostram uma associação significativa entre o polimorfismo DD do ECA e DAC. De igual forma outros estudos obtiveram resultados semelhantes aos nossos<sup>(14-15)</sup>.

A nossa investigação tem algumas limitações pois é baseada num estudo caso – controlo, em que a patologia que nela figura, DAC, tem mortalidade muito significativa. Nestas circunstâncias, se os casos com determinado perfil genético morrerem muito não estarão presentes no estudo, alterando assim os resultados. No entanto, esta limitação óbvia, não impossibilita as conclusões do estudo, uma vez que, a alterar os resultados, apenas subestima o valor dos polimorfismos genéticos que eventualmente comportem risco, uma vez que diminui, por morte, a sua presença nos casos.

Os nossos resultados confirmaram assim a existência na nossa população, de uma associação significativa entre o genotipo DD da ECA e DAC, aumentando nos portadores deste genotipo, o risco de contraírem doença das artérias coronárias. (*odds ratio* 1,79, intervalo de confiança de 95 % de 1,31 a 2,45,  $p < 0,0001$ ).

## CONCLUSÕES

O genotipo DD aparece neste estudo claramente ligado à doença das artérias coronárias, com um alto grau de significância: *odds ratio* 1,79, IC de 95 % de 1,31 a 2,45,  $p < 0,0001$ .

O genotipo ID é protector, *odds ratio* 0,70, IC de 95% de 0,52 a 0,94,  $p = 0,022$ .

O genotipo II, apresentando um valor protector semelhante ao do ID, não atinge significância estatística, dada a pequena dimensão do grupo.

A confirmar-se este conceito, poderá justificar-se fazer uma prevenção vascular mais agressiva nos indivíduos com o genotipo DD.

Our results therefore confirm a significant association in our study population between the DD genotype of the ACE gene and CHD, individuals with this genotype having an increased risk for the disease (odds ratio 1.79, 95 % confidence interval 1.31 to 2.45,  $p < 0.0001$ ).

## CONCLUSIONS

The study clearly shows that the DD genotype is linked to coronary heart disease, with a high level of significance: odds ratio 1.79, 95 % CI 1.31 to 2.45,  $p < 0.0001$ .

The ID genotype is protective: odds ratio 0.70, 95 % CI 0.52 to 0.94,  $p = 0.022$ .

The II genotype, which has a similar protective effect to the ID genotype, did not reach statistical significance due to the small size of the group.

If our data are confirmed, more aggressive vascular prevention could be justified in patients with the DD genotype.

Pedidos de separatas para

Address for reprints

ISABEL MENDONÇA

Departamento de Cardiologia Médica

Hospital Central do Funchal

Av. Luís de Camões

9050-514 FUNCHAL, PORTUGAL

dep.card@srs.pt

## BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

1. Gensini GF, Comeglio M, Colella A. Classical risk factors and emerging elements in the risk profile for coronary artery disease. *Eur Heart J* 1998;19:A53-61.
2. Hunt SC, Williams RR, Barlow GK. A comparison of positive family history definitions for defining risk of future disease. *J. Chronic Dis* 1986;39:809-21.
3. Tiret I, Kee F, Poirier O, et al. Deletion polymorphism in angiotensin converting enzyme gene associated with parental history of myocardial infarction. *Lancet*, 1993;341:991-3.
4. Weiss D, Sorescu D, Taylor WR. Angiotensin II and Atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2001; 87:25C-32C.
5. Cambien F, Leecerf L, Poirier O, Cambou JP, et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature*, 1992; 356:641-4.
6. Jeunemaitre X, Lifton Hunt SC, et al. Absence of linkage between angiotensin enzyme locus and human essential hypertension. *Nature gene* 1992;1:72-5.
7. Beohar N, Damaraju S, Prather A, et al. Angiotensin I converting enzyme genotype DD is a risk factor for coronary heart disease. *J Invest Med* 1995;43:375-80.
8. Akihiko Hirashiki, Yoshiji Yamada, Yosuk Murase, Yriyasu Suzuki, Hiroki Kataoka, Yasutsugu Morimoto, Toru Tajika, Toyooki Murohara, Mitsuhiro Yokota. Association of Gene Polymorphism with Coronary Artery Disease in Low or High-Risk Subjects Defined by Conventional Risk Factors. *J Am Coll Cardiol*, 2003;42:1429-37.
9. Report of the Expert Committee on diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997;1183-11.
10. WHO. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. WHO NUT/98.1. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1998.
11. Expert Panel on Detection Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486-97.
12. Rodriguez Perez J, Esparragon FR, Pereira OH, et al. Association of Angiotensinogen M235T and A(-6)G Gene Polymorphism with Coronary Heart Disease With Independence of Essential Hypertension. The Procogene Study. *JACC Vol 37, No. 6*, 2001.
13. Jaroslave A Hubacec, Jan Pitha, Ivana Podrapska, Jan Sochman, Vera Adamkova Vera Lamska Rudolf Poledne. Insertion/deletion polymorphism in the angiotensin converting enzyme gene in myocardial infarction survivors. *Med Sci Monit*, 2000;6(3):503-6.
14. Samani NJ, Thompson JR, O'Toole L, et al. A meta-analysis of the angiotensin converting enzyme gene with myocardial infarction. *Circulation* 1996;94:708-12.
15. Staessen A, Wang JG, Ginocchio G et al. The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and cardiovascular-renal risk. *J Hypertens* 1997;15: 1579-92.

---

# 7th International Conference of Nuclear Cardiology

Lisbon Congress Centre  
Lisbon, Portugal, 8-11 May 2005

ICNC7 Secretariat  
E.S.C. - European Heart House  
2035, route des Colles – Les Templiers – BP 179  
06903 Sophia Antipolis Cedex, France  
Tel. +33 (0)4 92 94 86 80 – Fax +33 (0)4 92 94 86 81  
E-mail: [icnc@escardio.org](mailto:icnc@escardio.org)  
Web Site: [www.escardio.org](http://www.escardio.org) then click on the ICNC7 icon