

# A Interação Gene-Gene Afeta o Risco de Doença Coronária [36]

MARIA ISABEL MENDONÇA, R. PALMA DOS REIS, A. ISABEL FREITAS, ANA CÉLIA SOUSA, ANDREIA PEREIRA, PAULA FARIA, SUSANA GOMES, BRUNO SILVA, NUNO SANTOS, MARCO SERRÃO, ILÍDIO ORNELAS, SÓNIA FREITAS, C. FREITAS, JOSÉ JORGE ARAÚJO, ANTÓNIO BREHM, A. ALMADA CARDOSO

Unidade de Investigação - Hospital Central do Funchal, Funchal, Portugal  
Centro de Genética Humana - Universidade da Madeira  
Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal

Rev Port Cardiol 2009; 28 (4):397-415

## RESUMO

*Introdução:* Existem vários estudos que comparam doentes coronários e controlos, no sentido de determinar quais os polimorfismos que apresentam risco acrescido de doença das artérias coronárias (DC). Os seus resultados têm sido muitas vezes contraditórios, mas apresentam uma limitação suplementar: avaliam os polimorfismos um a um, quando na natureza os polimorfismos não existem isolados. Põe-se a questão se serão mais importantes associações de polimorfismos mutados no mesmo gene ou em genes diferentes.

*Objectivo:* Com o presente trabalho pretendemos avaliar o risco da associação de polimorfismos em termos de aparecimento de DC no mesmo gene ou em genes diferentes.

*Metodologia:* Estudámos em 298 doentes coronários e 298 controlos o risco associado aos polimorfismos (genótipos considerados de risco), DD da Enzima de Conversão da Angiotensina (ECA) I/D; GG da ECA 8, MM do Angiotensinogénio (AGT) 174; TT do AGT 235; TT da Metiltetrahydrofolato Reductase (MTHFR) 677; AA da MTHFR 1298; RR da Paraoxonase1 (PON1) 192 e MM da PON1 55. Posteriormente avaliámos o risco ligado às associações no mesmo gene (DD da ECA + GG da ECA 8; MM do AGT174 + TT do AGT 235; TT da MTHFR 677 + AA da MTHFR 1298). Finalmente, nos polimorfismos que isoladamente apresentavam significância, avaliámos o risco das associações de polimorfismos a níveis funcionais diferentes

## ABSTRACT

### Gene-Gene Interaction Affects Coronary Artery Disease Risk

*Introduction:* Various studies have compared coronary artery disease (CAD) patients with controls in order to determine which polymorphisms are associated with a higher risk of disease. The results have often been contradictory. Moreover, these studies evaluated polymorphisms in isolation and not in association, which is the way they occur in nature.

*Objective:* Our purpose was to evaluate the risk of CAD in patients with associated polymorphisms in the same gene or in different genes.

*Methods:* We evaluated the risk associated with ACE DD, ACE 8 GG, AGT 174MM, AGT 235TT, MTHFR 677TT, MTHFR 1298AA, PON1 192RR and PON1 55MM in 298 CAD patients and 298 healthy individuals. We then evaluated the risk of associated polymorphisms in the same gene (ACE DD + ACE 8 GG; AGT 174MM + AGT 235TT; MTHFR 677TT + MTHFR 1298AA). Finally, for the isolated polymorphisms which were significant, we evaluated the risk of polymorphism associations at different functional levels (ACE + AGT; ACE + MTHFR; ACE + PON1). Multiple logistic regression was used to identify independent risk factors for CAD.

*Results:* Isolated polymorphisms including ACE DD ( $p < 0.0001$ ), ACE 8 GG ( $p = 0.023$ ),

(ECA + AGT; ECA + MTHFR; ECA + PON1. Finalmente através de um modelo de regressão logística fomos determinar quais as variáveis que se relacionavam de forma significativa e independente com a DC.

**Resultados:** Os polimorfismos isolados como: ECA DD [P<0.0001], ECA 8 GG [P=0,023], e MTHFR 1298 AA [P=0,049]), apresentaram uma frequência mais elevada nos casos, associando-se de forma significativa ao grupo com DC. A associação de polimorfismos no mesmo gene não teve efeito sinérgico ou aditivo e não aumentou o risco de DC. A associação polimórfica em genes diferentes aumentou o risco de DC quando comparada com o risco do polimorfismo isolado. No caso da associação da ECA DD ou ECA 8 GG com a PON1 192 RR, o risco quadruplicou (OR passou de 1,8 para 4,2). Após regressão logística o hábito tabágico, a história familiar, o fibrinogénio, diabetes, a associação ECA DD ou ECA 8 GG com a MTHFR 1298 AA e a interação ECA DD ou ECA 8 GG com a PON1 192 RR permaneceram na equação, mostrando ser factores de risco independente para DC.

**Conclusões:** A associação de polimorfismos mutados no mesmo gene nunca aumentou o risco do polimorfismo isolado. A associação com interação de polimorfismos mutados em genes diferentes, pertencentes a sistemas fisiopatológicos e enzimáticos diferentes, esteve sempre associada a maior risco do que cada polimorfismo por si. Este trabalho levanta, pela primeira vez, a possibilidade de tentativa de compreensão do risco genético coronário em conjunto e não de cada polimorfismo por si.

#### Palavras-Chave

Enzima conversora da angiotensina; Polimorfismo genético; Factores de risco; Interação gene-gene; Doença coronária.

and MTHFR 1298AA (p=0.049) presented with a significantly higher frequency in the CAD group. An association of polymorphisms in the same gene did not have an additive or synergistic effect, nor did it increase the risk of CAD. Polymorphic associations in different genes increased the risk of CAD, compared with the isolated polymorphisms. The association of ACE DD or ACE 8 GG with PON1 192RR increased the risk of CAD fourfold (1.8 to 4.2). After logistic regression analysis, current smoking, family history, fibrinogen, diabetes, and the ACE DD or ACE 8 GG + MTHFR 1298AA and ACE DD or ACE 8 GG + PON1 192RR associations remained in the model and proved to be independent predictors of CAD.

**Conclusions:** The association of polymorphisms in the same gene did not increase the risk of the isolated polymorphism. The association of polymorphisms in genes belonging to different enzyme systems was always linked to increased risk compared to the isolated polymorphisms.

This study may contribute to a better understanding of overall genetic risk for CAD rather than that associated with each polymorphism in isolation.

#### Key words

Angiotensin-converting enzyme; Genetic polymorphism; Risk factors; Gene-gene interaction; Coronary artery disease.

## INTRODUÇÃO

A Doença Coronária (DC) é uma afecção complexa e multifactorial, na qual factores genéticos, ambientais e demográficos se

## INTRODUCTION

Coronary artery disease (CAD) is a complex and multifactorial disease, the prevalence of which is determined by the association of genetic,

associam contribuindo para a sua prevalência. A tendência familiar, ou importância da história familiar de doença coronária, particularmente se precoce, aceite por todos, tem esbarrado com múltiplas dificuldades para a sua descodificação. Por um lado, hábitos e comportamentos agregam-se nas famílias e a tendência familiar explica-se parcialmente pela agregação dos factores de risco comportamentais ou com influência comportamental dominante, como obesidade, tabagismo, hipertensão, dislipidemia e diabetes. Por outro, a tendência familiar está longe de seguir as leis de Mendel, não se tendo encontrado alterações genéticas *major* com grande prevalência na população, que a possam explicar

Os dados acumulados na literatura e resultantes da investigação científica dos últimos anos sobre a fisiopatologia e genética destas doenças complexas, levam-nos a concluir ser pouco provável a existência de um gene *major*, único responsável pelo contributo genético nesta afecção.<sup>(1)</sup>

Surgiu assim a noção que algumas variantes genéticas ou polimorfismos de enzimas podem ser menos eficientes na sua função protectora ou anormalmente eficientes em termos de agressão vascular podendo, assim, aumentar o risco de doença das artérias coronárias *per sí*, ou por tornarem particularmente agressiva a acção de outro ou outros factores de risco comportamentais.

Acreditamos que a falta de reprodutibilidade e inconsistência de muitos destes estudos se deve a que a genética subjacente a estas complexas doenças multifactoriais, não se baseia num único gene com efeito *major*, mas na interacção de múltiplos genes com efeitos médios ou moderados.<sup>(2)</sup> Pode acontecer que dois ou mais polimorfismos em genes candidatos manifestem apenas um pequeno contributo no fundo genético de determinada doença multifactorial, mas este pode tornar-se aditivo ou multiplicativo se houver determinadas combinações das suas variantes alélicas.<sup>(3)</sup>

A predisposição genética para a doença cardiovascular parece ser o final resultante dos efeitos cumulativos de vários polimorfismos genéticos e combinações alélicas, que podem conferir apenas um risco moderadamente aumentado se presentes isoladamente, como único factor de risco genético,<sup>(4)</sup> mas o risco gené-

environmental and demographic factors. The influence of a family history of CAD, particularly of early onset, while universally recognized as important, has proved difficult to clarify fully. Habits and behaviors tend to persist in families, and familial aspects of the disease are partially explained by associations of behavioral risk factors and others in which behavior is important, including obesity, smoking, hypertension, dyslipidemia and diabetes. Furthermore, familial aspects of the disease do not follow simple Mendelian laws; no common major genetic alterations have been found that can explain it, and the scientific evidence accumulated over recent years on the pathophysiology and genetics of this complex disease indicates that there is unlikely to be a single gene that is responsible for its genetic component<sup>(1)</sup>.

There thus arose the idea that some genetic variants (polymorphisms) of genes coding for enzymes may reduce their protective effect, or be more likely in themselves to cause vascular damage, thereby increasing risk for CAD or exacerbating the effects of behavioral risk factors.

We believe that the lack of reproducibility and consistency that has marked many previous studies is due to the fact that the genetic element of this complex and multifactorial disease is not based on a single gene with a major effect but rather on the interaction between multiple genes with less marked effects<sup>(2)</sup>. Two or more polymorphisms in candidate genes may individually only make a small contribution to the genetic background of any given multifactorial disease, but this may become additive, or even multiplicative, with particular combinations of alleles<sup>(3)</sup>.

Genetic predisposition for cardiovascular disease appears to be the result of the cumulative effects of various genetic polymorphisms and allele combinations, which in isolation would only confer moderately elevated risk<sup>(4)</sup>, but the risk can be increased by various gene-gene and gene-environment interactions<sup>(5-7)</sup>.

Given the formidable complexity of gene-gene interactions, few investigators have ventured into this area.

The interaction between two genes belonging to the same physiological system (the renin-angiotensin system, RAS) was studied by Tirt et al., who identified a significant synergistic

tico pode ser ampliado e modulado através de várias interações gene-gene e gene ambiente.<sup>(5-7)</sup>

Em virtude das dificuldades inerentes à análise de tais dados, poucos investigadores se têm atrevido a estudar a interação gene-gene.

A Interação entre dois genes pertencentes ao mesmo sistema fisiopatológico (SRA) foi investigada por Tiret, que identificou uma interação significativa e sinérgica entre o polimorfismo da enzima de conversão da angiotensina (ECA) I/D e do Receptor 1 da angiotensina II (AT1R) A/C, num estudo *cohort* englobando 613 doentes com enfarte do miocárdio (EM), comparados com 723 controlos.

O *odds ratio* (OR) para eclosão de EM era 1,52 para o genótipo DD em homozigotia associado ao genótipo AC do AT1R e 3,95 para o genótipo DD associado ao genótipo (CC).<sup>(8)</sup> Num subgrupo de doentes deste estudo, definidos como de baixo risco pelos critérios tradicionais, o sinergismo entre estes dois polimorfismos foi ainda mais marcado, subindo o OR para 7 nos doentes com o genótipos DD associado ao AT1R AC e para 13,3 nos DD associados ao AT1R CC. Esta associação sinérgica entre dois genes diferentes, mas pertencentes ao mesmo sistema fisiopatológico (SRA), foi confirmada em outros estudos.<sup>(9)</sup>

Outras interações entre genes pertencentes a sistemas fisiopatológicos e enzimáticos diferentes têm sido investigadas nos últimos anos, podendo envolver a diferenciação dos adipócitos, o metabolismo lipídico e a homeostase da glucose, que interferem na regulação da aterosclerose e da doença coronária.<sup>(10)</sup>

Um destes estudos publicado por Peng et al em 2003<sup>(11)</sup> no *International Journal of Cardiology*, sugere que o alelo E<sup>4</sup> da isoforma mutante da APO E em associação com o polimorfismo do receptor activado pelo proliferador do peroxissoma gama (PPAR $\gamma$  161 C/T, genótipo CT), diminui o risco de DC. Existem três variantes de Apo E: 2, 3 e 4 sendo a Apo E 3 a mais comum e a Apo E 4 com uma Arginina na posição 112 e 152, ao aumentar o ritmo de absorção dos esteróis pelo intestino, a produção de esteróis hepáticos e a expressão de receptores LDL, associa-se a níveis elevados de colesterol LDL e é um factor de risco independente para doença coronária e doença de Alzheimer.<sup>(12,13)</sup>

Esta associação com o polimorfismo do PPAR $\gamma$  161 C/T, genótipo CT, diminui o risco de DC. Há pois um efeito na interação da ApoE 4

interaction between the I/D polymorphism of the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene and the A/C polymorphism of the angiotensin-II type 1 receptor (AT1R) gene in a cohort study of 613 patients with myocardial infarction (MI) compared with 723 controls. The odds ratio (OR) for occurrence of MI was 1.52 for the homozygous DD genotype associated with the AC genotype of AT1R, and 3.95 for the DD and CC association<sup>(8)</sup>. In a subgroup at low risk by conventional criteria, the synergy between these polymorphisms was even stronger, with the OR rising to 7 for ACE DD + AT1R AC and to 13.3 for ACE DD + AT1R CC. This synergy between polymorphisms of different genes of the RAS has been confirmed in other studies<sup>(9)</sup>.

Interactions between genes belonging to different physiological and enzyme systems have been investigated in recent years, involving adipocyte differentiation, lipid metabolism and glucose homeostasis, all of which affect the development of atherosclerosis and CAD<sup>(10)</sup>.

One of these studies, published by Peng et al. in 2003<sup>(11)</sup>, suggests that the association of the E<sup>4</sup> allele of the apolipoprotein E (apo E) gene and the CT genotype of the C161T polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR $\gamma$ ) gene reduces CAD risk. There are three variants of apo E – E<sup>2</sup>, E<sup>3</sup> and E<sup>4</sup> – of which E<sup>3</sup> is the most common. E<sup>4</sup>, with arginine in position 112 and 152, increases steroid absorption in the intestine, production of hepatic steroids and expression of LDL receptors, and hence is associated with increased LDL cholesterol levels and is an independent risk factor for CAD and Alzheimer's disease (12, 13). The interaction between the PPAR $\gamma$  161CT polymorphism and apo E<sup>4</sup> reduced serum cholesterol and had a protective effect against CAD.

The concept of gene-gene interaction can thus be extended to the existence of protective and/or suppressive genetic variants, which when identified could make an important contribution to preventing development of CAD or improving its clinical course.

Another relevant aspect of gene-gene interaction is whether associations of polymorphisms in different loci of the same gene are more important than associations in genes belonging to different physiological and enzyme systems.

e do PPAR  $\gamma$  CT, que reduz o colesterol sérico e reduz a incidência de doença coronária. Neste estudo o risco de DC parece ter sido modulado no sentido da sua redução, pela presença de um polimorfismo que, em associação, foi protector.

O conceito de interacção gene-gene pode assim estender-se à identificação de variantes genéticas protectoras /supressoras, no nosso genoma, sendo a sua identificação importante e necessária, na medida em que a sua existência pode prevenir a manifestação da doença ou melhorar a sua fisiopatologia.

Outro problema pertinente dentro da interacção gene-gene, é o facto de se poder demonstrar se serão mais importantes as associações de polimorfismos genéticos sediados em diferentes *loci* no mesmo gene ou as associações de polimorfismos em genes distintos, integrados em sistemas com funções fisiopatológicas diferentes e com sistemas enzimáticos próprios.

## OBJECTIVO

Com o presente trabalho, pretendemos avaliar o risco, em termos de aparecimento de DC, resultante da associação de alguns polimorfismos, no mesmo gene ou em genes diferentes, pertencentes a sistemas fisiopatológicos comuns (SRA) ou pertencentes a sistemas fisiopatológicos e enzimáticos diferentes, com influências e finalidades distintas

## MATERIAL E MÉTODOS

Estudo caso-controlo, incluindo um total de 596 indivíduos, com idade média  $55,5 \pm 9,3$  anos sendo 78,9% do sexo masculino. Os casos ( $n=298$ ) com idade média  $55,0 \pm 10,3$  anos; sendo 78,0% do sexo masculino, foram seleccionados de forma consecutiva de entre os doentes com internamento por EM ou DC, confirmada por coronariografia com pelo menos 75% de obstrução de um dos vasos coronários, após alta hospitalar. Os controlos ( $n=298$ ); idade média  $55,5 \pm 8,0$  anos; 73,5% do sexo masculino, foram seleccionados aleatoriamente dos cadernos eleitorais, de entre os indivíduos sem antecedentes ou história sugestiva de doença coronária. A selecção dos controlos a partir dos cadernos eleitorais pretendeu que estes não

## OBJECTIVE

Our purpose was to evaluate the risk of CAD in patients with associated polymorphisms in the same gene, or in different genes belonging to the same physiological system (the RAS) or to different physiological and enzyme systems.

## METHODS

This was a case-control study with a total of 596 subjects, mean age  $55.5 \pm 9.3$  years, 78.9% male. The cases ( $n=298$ ), mean age  $55.0 \pm 10.3$  years and 78.0% male, were selected consecutively following hospital discharge from patients admitted with myocardial infarction or coronary artery disease confirmed by coronary angiography that showed at least 75% obstruction of at least one coronary artery. The controls ( $n=298$ ), mean age  $55.5 \pm 8.0$  years and 73.5% male, were selected randomly from the electoral register from individuals with no history or suggestion of CAD. The selection of the controls from the electoral register was intended to ensure that they did not differ significantly from the cases in terms of gender and age.

In the control group, the presence of cardiovascular disease was an exclusion criterion, and so all underwent physical examination and, if necessary, complementary exams (treadmill exercise testing).

All subjects completed a questionnaire giving demographic and other data including age, place of birth and residence, family history of CAD, personal history of hypertension or diabetes, smoking habits, alcohol intake, and quantity and type of physical exercise. Their weight, height, waist and hip circumference, heart rate, blood pressure and carotid-femoral pulse wave velocity (PWV) were measured.

Subjects were considered to have a family history of CAD if it had been diagnosed in their father or a brother before the age of 50 or mother or a sister before the age of 60.

Subjects were classified as having hypertension if they reported the fact, were taking antihypertensive medication or had systolic BP of  $\geq 140$  mmHg and/or diastolic BP of  $\geq 90$  mmHg, based on the mean of three measurements<sup>(14)</sup>.

They were classified as having diabetes if they were taking oral antidiabetics or insulin or



fossem significativamente diferentes dos casos, em termos de sexo e idade.

No grupo de controlo, a presença de doença cardiovascular era critério de exclusão do estudo, pelo que eram todos submetidos a um exame clínico e quando necessário a exames complementares (prova de esforço em tapete rolante).

Todos os indivíduos completavam um questionário que incluía dados demográficos e clínicos: idade, local de nascimento e residência, antecedentes de história familiar de DC, existência prévia de hipertensão arterial, diabetes *mellitus*, hábito de fumar, ingestão de álcool, tipo de actividade física e procedia-se também ao registo do peso, altura, perímetro da cintura e anca. A todos era efectuada a determinação da frequência cardíaca (FC), tensão arterial (TA) e velocidade da onda de pulso carotídeo femoral (VOP).

Era considerado que o indivíduo tinha antecedentes de doença coronária familiar se este evento surgisse no pai ou irmãos com menos de 50 anos ou na mãe ou irmãs com menos de 60 anos de idade.

Os doentes eram classificados como tendo Hipertensão Arterial (HTA) se referiam este antecedente, cumpriam medicação antihipertensora ou apresentavam uma tensão arterial sistólica  $\geq 140$  mmHg e uma pressão diastólica  $\geq 90$  mm Hg, na média de três medições.<sup>(14)</sup>

A diabetes era considerada caso fossem utilizados antidiabéticos orais, ou insulina ou o valor da glicémia basal fosse superior a 7,0 mmol/l ou 126 mg/dl.<sup>(15)</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>(16)</sup>

O indivíduo foi considerado fumador se fumava ou tinha menos de 5 anos de abstenção tabágica.

A dislipidémia 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,<sup>(17)</sup> ou se o indivíduo fazia medicação anti dislipidémica.

A determinação da VOP era efectuada com um aparelho automático COMPLIOR (COLSON), o qual permitia o registo da onda de pulso *on line* e o cálculo automático da sua velocidade através de dois transdutores, um posicionado na base

if their fasting plasma glucose was higher than 7.0 mmol/l or 126 mg/dl<sup>(15)</sup>.

Body mass index (BMI) was calculated as weight in kilograms divided by height in meters squared, with obesity defined as a BMI of  $>30$ <sup>(16)</sup>.

Subjects were considered to be smokers if they smoked or had ceased less than five years previously.

Dyslipidemia was defined as total fasting cholesterol of  $>5.2$  mmol/l or 200 mg/dl, or LDL cholesterol of  $\geq 3.4$  mmol/l or 130 mg/dl<sup>(17)</sup>, as well as being considered present in individuals taking lipid-lowering medication.

PWV was determined using a Complior automatic device (Colson) which records the pulse wave on-line and calculates its velocity by means of two probes, one positioned at the base of the neck at the site of the common carotid artery and the other over the femoral artery, as described elsewhere<sup>(18)</sup>.

Blood samples were collected from cases and controls for biochemical and genetic analysis. The study protocol was approved by the hospital's Ethics Committee and all participants gave their informed consent.

In all subjects (cases and controls) we evaluated the isolated polymorphisms, and to study associations between polymorphisms we used the genotype considered to be a risk factor for CAD in previous studies in the literature: ACE I/D (DD genotype), ACE 8 G2350A (GG genotype), angiotensin (AGT) T174M (MM genotype), AGT M235T (TT genotype), methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T (TT genotype), MTHFR A1298C (AA genotype), paraoxonase 1 (PON1) Q192R (RR genotype), and PON L55M (MM genotype).

We then evaluated the risk of associated polymorphisms in the same gene (ACE DD + ACE 8 GG; AGT 174MM + AGT 235TT; MTHFR 677TT + MTHFR 1298AA; PON1 55MM + PON1 192RR).

Finally, for the isolated polymorphisms which were significant, we evaluated the risk of polymorphism associations at different functional levels (ACE + AGT; ACE + MTHFR; ACE + PON1).

### Genetic analysis

Genomic DNA was extracted from 80 ml of peripheral blood using a standard phenol-

do pescoço no local da artéria carótida comum e outro sobre a artéria femoral, como foi descrito previamente.<sup>(18)</sup>

Casos e controlos colheram sangue para determinações bioquímicas e genéticas e todos os participantes deram o seu consentimento informado, tendo o protocolo do estudo tido a aprovação prévia da Comissão de Ética do nosso Hospital.

Estudamos em todos (doentes e controlos) os polimorfismos isolados e para os estudos de associação utiliza o genótipo considerado “factor de risco” para doença coronária em estudos anteriores da literatura: ECA I/D (genótipo DD), ECA 8 G2350A (genótipo GG), AGT T174M (genótipo MM), AGT M235T (Genótipo TT) Metilenoetetrahidrofolato Reductase (MTHFR) C677T (Genótipo TT), MTHFR A1298C (genótipo AA), Paraoxonase (PON) 192 Q/R (genótipo RR); PON 55L/M (genótipo MM).

Posteriormente avaliámos o risco ligado às associações no mesmo gene (DD da ECA I/D + GG da ECA 8; AGT 174 MM + AGT 235 TT; MTHFR 677 TT + MTHFR 1298AA); PON 55MM+ PON192 RR.

Finalmente nos polimorfismos que isoladamente apresentavam significância, avaliámos o risco das associações de polimorfismos a níveis funcionais diferentes (ECA + AGT; ECA + MTHFR; ECA +PON; ECA + PLA2).

### **Análises Genéticas**

O DNA 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.

### **ECA I/D**

Para estudo do polimorfismo de 287 pb I/D no intrão 16 do gene da ECA foram utilizados os seguintes primers: forward 5'-GCCCTGCAGGTG TCT GCA GCA TGT-3' e reverso 5'-GGA TGG CTCTCC CCG CCT TGT CTC-3'. cerca de 100 ng de DNA de cada indivíduo foram submetidas a 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 minutos a 62°C e 1 minutos 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.

chloroform method and ethanol precipitation.

All the polymorphisms under study were genotyped by the polymerase chain reaction (PCR) in a Hybaid thermocycler.

### **ACE I/D**

To study the 287-bp I/D polymorphism in intron 16 of the ACE gene, the following primers were used: 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 min at 94 °C, 1 min at 62 °C and 1 min 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'<sup>(19)</sup> (Fig. 1).

### **ACE 8 A/G**

The A/G polymorphism of the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene (ACE 8), located in exon 17, has been linked to high levels of circulating ACE. The polymorphism was genotyped by PCR followed by digestion using the restriction enzyme *BstUI* (New England Biolabs), which required an artificial restriction site to be introduced by primer mismatch: forward 5'-CTG ACG AAT GTG ATG GCC GC-3' and reverse 5'-TTG ATG AGT TCC ACG TAT TTC G-3'. The reaction conditions were 40 cycles of 1 min at 92 °C, 1 min at 52 °C and 30 sec at 72 °C. A 126-bp fragment was indicative of the A allele and two fragments of 21 and 105 bp indicated the presence of the G allele<sup>(20)</sup> (Fig. 1).

### **AGT**

The T174M polymorphism of the AGT gene was studied by amplification using the following primers: forward 5'-TGG CAC CCT GGC CTC TCT CTA TCT-3' and reverse 5'-CAG CCT GCA TGA ACC TGT CAA TCT-3'. The reaction conditions were 38 cycles of 15 sec at 95 °C, 45 sec at 64 °C and 45 sec at 72 °C. The PCR products were digested using the restriction enzyme *NcoI* (New England Biolabs) for 6 hours and the

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'.<sup>(19)</sup> (Fig. 1)

### ECA 8 A/G

Localizada no exão 17, pode estar associada a níveis elevados de ECA circulante. O polimorfismo A/G do gene da ECA (ECA 8), foi tipado por amplificação por PCR, seguida de restrição com a enzima *Bst*UI (New England Biolabs), sendo que para tal foi necessário introduzir um sítio de restrição artificial por *primer mismatch*: *forward* 5'-CTG ACG AAT GTG ATG GCC GC-3' e *reverso* 5'-TTG ATG AGT TCC ACG TAT TTC G-3'. As condições de amplificação foram de 40 ciclos de 1 minuto a 92° C, 1 min a 52° C e 30 seg a 72° C. Um fragmento de 126 pb era indicativo da presença do alelo A e dois fragmentos de 21 e 105 pb indicavam a presença do alelo G.<sup>(20)</sup> (Fig. 1)

### Polimorfismo do Angiotensinogénio (AGT)

A mutação T174M do gene AGT foi determinada por amplificação com os *primers*: *forward* 5'-TGG CAC CCT GGC CTC TCT CTA TCT-3' e 5' *reverso* -CAG CCT GCA TGA ACC TGT CAA TCT-3'. As condições de reacção foram 38 ciclos de 15 segundos a 95°C, 45 segundos a 64°C e 45 segundos a 72°C. Os produtos de PCR foram digeridos com a enzima de restrição *Nco*I (New England Biolabs) durante 6 horas e os produtos de restrição visualizados em gel de poliacrilamida T9C5. O alelo T, resultante da presença do nucleótido C, apresentava um fragmento de 353 pb e o alelo mutado M (nucleótido T) apresentava dois fragmentos, 201 e 152 pb. (Fig.1)

A mutação M235T no exão 2 que causa uma substituição da metionina por treonina no codão 235 gene do AGT, foi determinada por amplificação com os *primers*: *forward* 5' - CAG GGT GCT GTC CAC ACT GGA CCC C-3' e *reverso* 5'-CCG TTT GTG CAG GCC CTG GCT CTC T-3'. As condições de reacção foram 10 ciclos compreendendo 1 minutos a 94°C, 1 minutos a 68°C e 1 minutos a 72°C, seguidos de 30 ciclos de 30 segundos 90°C, 1 minutos a 68°C e 30 segundos a 72°C. Os produtos de PCR foram digeridos com a enzima de restrição

restriction products were visualized on T9C5 polyacrylamide gel. The T allele, indicating the presence of the C nucleotide, was demonstrated by a 353-bp fragment and the mutated M allele (T nucleotide) by two fragments of 201 and 152 bp (Fig. 1).

The M235T mutation in exon 2, which replaces methionine with threonine in codon 235 of the AGT gene, was analyzed by amplification with forward primer 5'-CAG GGT GCT GTC CAC ACT GGA CCC C-3' and reverse primer 5'-CCG TTT GTG CAG GCC CTG GCT CTC T-3'. The reaction conditions were 10 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 68 °C and 1 min at 72 °C, followed by 30 cycles of 30 sec at 90 °C, 1 min at 68 °C and 30 sec at 72 °C. The PCR products were digested using the restriction enzyme *Tth*1111 (New England Biolabs) for 6 hours and the restriction products were visualized on T9C5 polyacrylamide gel. The M allele was indicated by a 165-bp fragment and the mutated T allele by two fragments of 141 and 24 bp<sup>(21)</sup> (Fig. 1).

### AT1R A1166C

The A/C transversion in base 1166 in the 3' untranslated region of the AT1R gene was identified using the following primers: forward 5'-GCA CCA TGT TTT GAG GTT-3' and reverse 5'-CGA CTA CTG CTT AGC ATA-3'. Reaction conditions were 30 cycles of 1 min at 95 °C, 1 min at 55 °C and 1 min at 72 °C and the PCR products were digested using the restriction enzyme *Dde*I (New England Biolabs). An undigested 546-bp fragment was indicative of the A allele and two fragments of 435 and 111 bp indicated the C allele (Fig. 1).

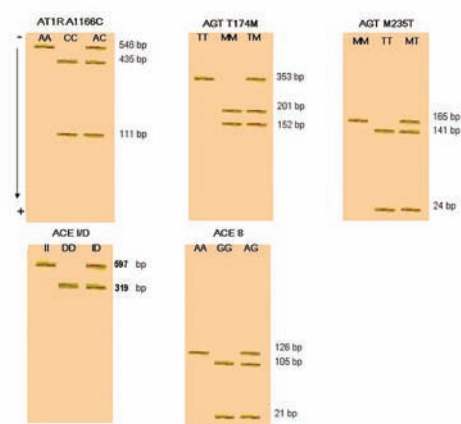


Figura 1. Polimorfismos dos genes do SRA estudados

Figure 1. Polymorphisms of the RAS genes studied



*Tth*111I (New England Biolabs) durante 6 horas e os produtos de restrição visualizados em gel de poli-acrilamida T9C5. O alelo M apresentava um fragmento de 165 pb e o alelo mutado T apresentava dois fragmentos, 141 e 24 pb.<sup>(21)</sup> (Fig. 1)

#### Polimorfismo do AT1R A1166C

A transversoão A/C na base 1166 na região 3' não traduzida do gene do AT1R foi identificada utilizando primers: forward 5' – GCA CCA TGT TTT GAG GTT-3' e reverso 5' – CGA CTA CTG CTT AGC ATA-3' com as condições de amplificação: 30 ciclos com 1 minutos a 95°C, 1 minutos a 55°C e 1 minutos a 72°C. Os produtos PCR foram digeridos com a enzima de restrição *DdeI* (New England Biolabs). Um fragmento não digerido de 546 pb indicava a presença do alelo A e dois fragmentos de 435 e 111 pb a presença do alelo C.<sup>(22)</sup> (Fig 1)

#### Metiltetrahidrofolato Reductase (MTHFR)

Para ambos os marcadores MTHFR, o DNA genómico foi submetido a PCR numa reacção de 25 ml contendo aproximadamente 25 ng de DNA, 0.25 mM de cada primer, 0.3 mM de cada dNTP, 0.2 U de Taq DNA – polimerase (FirePolâ), tampão 0.25x e 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, usando um termocilador OmniGene TR3 SM2 da Hybaid. Os primers utilizados para o marcador MTHFR C677T foram os seguintes: *forward* 5'–TGA AGG AGA AGG TGT CTG GTA GG–3' e *reverse* 5'–AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG–3'; para o marcador MTHFR A1298C: *forward* 5'–CTT TGG GGA GCT GAA GGA CTA CTA–3' e *reverse* 5'–CAC TTT GTG ACC ATT CCG GTT TG–3'. Os fragmentos de 198 pb obtidos na amplificação do polimorfismo MTHFR C677T foram submetidos a digestão enzimática utilizando a enzima de restrição *HinfI*, a 37°C durante a noite. O resultado da digestão foi submetido a electroforese em gel de poli-acrilamida, com revelação a prata. A presença do alelo T em homozigotia revela-se com a presença de 2 bandas: 175 e 23 pb (esta última não visível em gel); os indivíduos de genótipo CT apresentam 3 bandas: 198, 175 e 23 pb, enquanto que os homozigóticos CC permanecem com a banda de 198 pb intacta. (Fig. 2)

Quando necessária a sequenciação na detecção dos polimorfismos (MTHFR A1298C), o fragmento de 163 pb amplificado e purificado

#### MTHFR

For both MTHFR polymorphisms, genomic DNA was amplified by PCR in a reaction of 25 ml containing approximately 25 ng DNA, 0.25 mM of each primer, 0.3 mM of each dNTP, 0.2 U of Taq DNA polymerase (FIREPolâ), 0.25x buffer and 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, using a Hybaid OmniGene TR3 SM2 thermocycler. The primers used for the C677T polymorphism were: forward 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG GTA GG-3' and reverse 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'; and for A1298C: forward 5'-CTT TGG GGA GCT GAA GGA CTA CTA-3' and reverse 5'-CAC TTT GTG ACC ATT CCG GTT TG-3'. The 198-bp fragments obtained from amplification of the C677T polymorphism were digested using the restriction enzyme *HinfI* at 37 °C overnight. The restriction products were identified by polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining. The homozygous T allele was revealed by the presence of two bands, of 175 and 23 bp (the latter not visible on gel), the CT genotype by three bands, of 198, 175 and 23 bp, while CC homozygosity was indicated by a single band of 198 bp (Fig. 2).

When sequencing was required to detect the MTHFR A1298C polymorphism, the 163-bp fragment, following amplification and purification in Sephadex columns (Sigma), was subjected to asymmetrical amplification using a BigDye kit in a Trio Thermoblock thermocycler (Biomtra). Sample processing and PCR procedures were as recommended by the manufacturer with slight modifications. Each sequencing reaction used 1-3 ml DNA, depending on the quantity obtained after purification of the PCR product, 1.4 ml BigDye 3.1 (Applied Biosystems), and 1.5 ml (5 pmol) primer, plus sterile distilled water, to make up a final volume of 10 ml. The samples then underwent 3 min of denaturation at 94 °C, followed by 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 60 °C and a 30-sec extension at 72 °C, ending with a final extension step of 7 min at 72 °C. The sequences were read in an ABI Prism 310 genetic analyzer (Applied Biosystems) (Fig. 2).

#### PARAOXONASE 1

The human paraoxonase 1 (PON1) gene, located on the long arm of chromosome 7 (q21-q22), has several genetic polymorphisms, the most thoroughly studied being the substitution

em colunas de Sephadex Sigma, foi submetido a amplificação assimétrica das cadeias usando o kit Big Dye, num termociclador TRIO-Thermoblock Biometra. Os protocolos utilizados para o processamento das amostras e as condições de PCR para a sequenciação foram os recomendados pelos fornecedores, com ligeiras modificações. Assim sendo, cada reacção de sequenciação continha 1-3 ml de ADN (dependente da quantidade em ng obtida após a purificação do produto da amplificação), 1.4 ml de Big Dye 3.1 Applied Biosystems, 1.5 ml de primer (5 pmol) e sdw para perfazer um volume final de 10 ml. Inicia-se a desnaturação durante 3 min a 94°C, seguida de 35 ciclos de desnaturação de 1 min a 94° C, depois 1 min a 60° C e uma extensão de 30 seg a 72° C, a que se seguia uma extensão final de 7 min a 72° C. As sequências foram lidas num sequenciador ABI Prism 310 Genetic Analyser Applied Biosystems.(Fig. 2)

### PARAOXONASE 1

O gene humano da paraoxonase1 (PON) 1 localiza-se no braço longo do cromossoma 7 (q21-q22). Apresenta vários polimorfismos genéticos, sendo os mais conhecidos e estudados a substituição da Leucina (Leu) por Metionina (Met) na posição 55 e a substituição da Glutamina (Glu) por Arginina (Arg) na posição 192 (Q192R)

### PON 55 L/M

A mutação L55M do gene PON foi tipada por amplificação com os primers: forward 5'-GAA GAG TGA TGT ATA GCC CCA G-3' e reverso 5'-TTT AAT CCA GAG CTA ATG AAA GCC-3'. As condições de reacção foram 40 ciclos de 1 minuto a 95°C, 30 segundos a 61°C e 45 segundos a 72°C. Os produtos de PCR foram digeridos com a enzima de restrição *NlaIII* (New England Biolabs) durante 6 horas e os produtos de restrição visualizados em gel de poliácridamida T9C5. O alelo L apresentava um fragmento de 170 pb e o alelo mutado M apresentava dois fragmentos, 126 e 44 pb. (Fig 3)

### PON 192 Q/R

A mutação Q192R do gene PON foi determinada por amplificação com os primers: forward 5'-TAT TGT TGC TGT GGG ACC TGA G-3' e reverso 5'-CAC GCT AAA CCC AAA TAC ATC CTC-3'. As condições de reacção foram

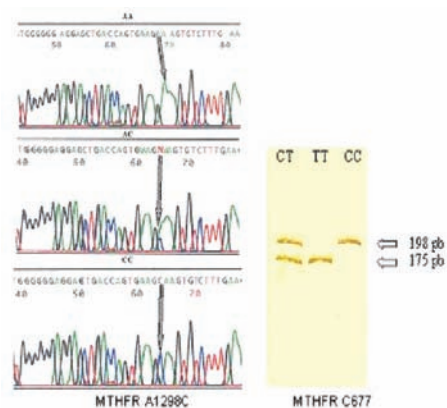


Figura 2. Polimorfismos do gene da MTHFR C677T

Figure 2. Polymorphisms of the MTHFR gene

of methionine (Met) for leucine (Leu) at position 55 (L55M) and the substitution of arginine (Arg) for glutamine (Glu) at position 192 (Q192R).

### PON1 L55M

The L55M mutation of the PON1 gene was genotyped using the forward primer 5'-GAA GAG TGA TGT ATA GCC CCA G-3' and reverse primer 5'-TTT AAT CCA GAG CTA ATG AAA GCC-3'. PCR was performed for 40 cycles of 1 min at 95 °C, 30 sec at 61 °C and 45 sec at 72 °C. The PCR products were digested using the restriction enzyme *NlaIII* (New England Biolabs) for 6 hours and the restriction products were visualized on T9C5 polyacrylamide gel. The L allele consisted of a 170-bp fragment and the mutated M allele consisted of two fragments, of 126 and 44 bp (Fig. 1).

### PON1 Q192R

The Q192R mutation of the PON1 gene was identified by amplification with the forward primer 5'-TAT TGT TGC TGT GGG ACC TGA G-3' and reverse primer 5'-CAC GCT AAA CCC AAA TAC ATC CTC-3'. The reaction conditions were 40 cycles of 1 min at 94 °C, 30 sec at 61 °C and 1 min at 72 °C. The resulting PCR products were digested with the *AhaI* restriction enzyme (New England Biolabs) for 6 hours and the restriction products visualized on T9C5 polyacrylamide gel. The Q allele consisted of a 99-bp fragment and the mutated R allele consisted of two fragments, of 66 and 33 bp (Fig. 3).

de 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 30 segundos a 61°C e 1 minuto a 72°C. Os produtos de PCR assim obtidos foram digeridos com a enzima de restrição *AlwI* (*New England Biolabs*) durante 6 horas e os produtos de restrição visualizados em gel de poliacrilamida T9C5. O alelo Q apresentava um fragmento de 99 pb e o alelo mutado R apresentava dois fragmentos, com 66 e 33 pb. (Fig 3)

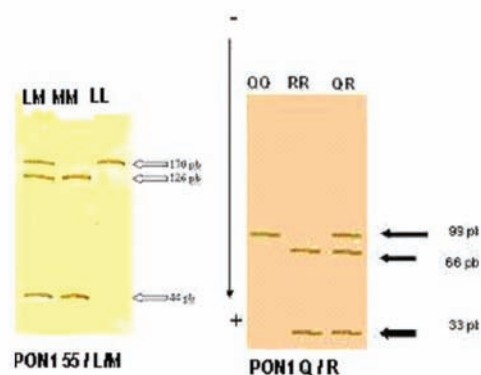


Figura 3. Polimorfismos do gene da PON1

Figure 3. Polymorphisms of the PON1 gene

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as variáveis contínuas são apresentadas com a respectiva média  $\pm$  Desvio Padrão (DP). As frequências das variantes genéticas e os factores de risco clássicos foram avaliadas pelo teste do  $\chi^2$ .

A razão das possibilidades (odds ratio) com intervalos de confiança a 95% foi utilizada para estimar o risco relativo de DC dos polimorfismos na população estudada.

Foi usado um modelo de regressão logística para identificar quais as variáveis que se relacionavam de forma significativa e independente com a DC, tendo entrado nesse modelo todas as consideradas significativas na análise univariada.

Verificamos se as frequências genóticas dos diferentes genótipos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, utilizando para tal o teste do Qui-quadrado de Pearson,  $\chi^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{E}$ , com um grau de liberdade.<sup>(23,24)</sup>

A análise dos dados foi feita através da utilização do *software* estatístico SPSS for Windows versão 14.0, Chicago, Illinois. Considerou-se um valor  $p < 0,05$  como estatisticamente significativo.

## STATISTICAL ANALYSIS

All continuous variables are presented as means  $\pm$  standard deviation. Frequencies of genetic variants and conventional risk factors were assessed by the chi-square test.

Odds ratios with 95% confidence intervals were used to estimate the relative risk for CAD of the polymorphisms in the study population.

A logistic regression model that included all variables considered significant on univariate analysis was used to identify those with a significant and independent association with CAD.

The frequencies of the different genotypes were tested for Hardy-Weinberg equilibrium using Pearson's chi-square test,  $\chi^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{E}$ , with one degree of freedom<sup>(23,24)</sup>.

The data were analyzed using SPSS for Windows version 14.0 (Chicago, Illinois). A value of  $p < 0.05$  was taken as significant.

## RESULTS

Analysis of the study population shows that the cases have a higher alcohol intake, more family history of CAD, more smokers, a higher proportion with hypertension, diabetes and dyslipidemia, and higher BMI, PWV, fibrinogen, high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), and lipoprotein(a) (Table I).

Table I. Baseline characteristics of the population

Variable	Cases (n=298)	Controls (n=298)	P
Age (years)	55.0 $\pm$ 10.3	55.5 $\pm$ 8.0	NS
Male (%)	235 (78.9%)	219 (73.5%)	NS
Family history (%)	114 (38.3%)	52 (17.4%)	$p < 0.0001$
Smoking	115 (38.6%)	63 (21.1%)	$p < 0.0001$
HT (%)	114 (38.4%)	101 (33.9%)	NS
Diabetes (%)	69 (23.2%)	31 (10.4%)	$p < 0.0001$
Dyslipidemia (%)	111 (37.2%)	90 (30.3%)	NS
Alcohol intake (g/day)	55.6 $\pm$ 83.2	38.7 $\pm$ 54.6	$p = 0.003$
BMI	27.9 $\pm$ 4.0	27.4 $\pm$ 4.1	NS
PWV	10.3 $\pm$ 2.1	9.8 $\pm$ 1.6	$p = 0.003$
Fibrinogen (mg/dl)	335.5 $\pm$ 96.0	276.9 $\pm$ 65.5	$p < 0.0001$
hs-CRP (mg/dl)	5.36 $\pm$ 7.1	3.1 $\pm$ 4.7	$p < 0.0001$
Lipoprotein(a) (mg/dl)	36.9 $\pm$ 36.6	27.8 $\pm$ 31.7	$p = 0.001$

BMI: body mass index; hs-CRP: high-sensitivity C-reactive protein; HT: hypertension; PWV: pulse wave velocity

The significance of homozygous polymorphisms considered to be risk factors for CAD was then analyzed: ACE DD, ACE 8 GG, AGT 235TT, AGT 174MM, MTHFR 677TT, MTHFR

## RESULTADOS

Ao analisarmos a população em estudo, verificamos que a população doente ingere mais álcool, tem história familiar mais carregada, fuma mais, tem uma percentagem mais elevada de hipertensão arterial, de diabetes mellitus, de dislipidemia, um índice de massa corporal (IMC) mais elevado, assim como valores de velocidade de onda de pulso (VOP), fibrinogénio, Proteína C Reactiva de alta sensibilidade (PCR as) e lipoproteína (a). (Quadro I)

Quadro I. Características basais da população

Variáveis	Casos (n=298)	Controlos (n=298)	Valor - p
Idade (anos)	55.0 ± 10.3	55.5 ± 8.0	Ns
Sexo Masculino (%)	235 (78.9%)	219 (73.5%)	Ns
DC Familiar (%)	114 (38.3%)	52 (17.4%)	p<0.0001
Hábitos tabágicos	115 (38.6%)	63 (21.1%)	p<0.0001
HTA (%)	114 (38.4%)	101 (33.9%)	Ns
Diabetes Mellitus (%)	69 (23.2%)	31 (10.4%)	p<0.0001
Dislipidemia (%)	111 (37.2%)	90 (30.3%)	Ns
Álcool (gr/dia)	55.6 ± 83.2	38.7 ± 54.6	p=0.003
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	27.9 ± 4.0	27.4 ± 4.1	Ns
VOP	10.3 ± 2.1	9.8 ± 1.6	p=0.003
Fibrinogénio (mg/dl)	335.5 ± 96.0	276.9 ± 65.5	p<0.0001
PCR-as (mg/dl)	5.36 ± 7.1	3.1 ± 4.7	p<0.0001
Lipoproteína (a) (mg/dl)	36.9 ± 36.6	27.8 ± 31.7	p=0.001

DC: Doença Familiar; HTA: Hipertensão Arterial; IMC: Índice de Massa Corporal; VOP: Velocidade de Onda de Pulso; PCR-as: Proteína C Reactiva de alta sensibilidade; Estatística significativa para p<0.05.

Estudamos em seguida a significância das diferentes mutações polimórficas, em homozigotia, consideradas factores de risco para DC, em estudos da literatura: ECA DD, ECA 8 GG, AGT 235 TT, AGT 174 MM, MTHFR 677 TT e 1298 AA, PON1 192 RR e 55 MM. Os genótipos que apresentaram frequências mais elevadas nos doentes com significância estatística foram: ECA DD, ECA 8 GG e PON 192 RR. (Quadro II)

Quadro II. Significância dos diferentes polimorfismos estudados isoladamente

Polimorfismo	Caso (n=298)	Controlo (n=520)	Valor p	OR (IC 95%)
ECA DD	124 (41.6%)	83 (27.9%)	<0.0001	1.846 (1.31-2.60)
ECA 8 GG	110 (36.9%)	84 (28.2%)	0.023	1.491 (1.06-2.11)
AGT 174 MM	4 (1.3%)	1 (0.3%)	Ns	4.041 (0.45-36.4)
AGT 235 TT	57 (19.1%)	55 (18.5%)	Ns	1.045 (0.69-1.58)
MTHFR 677 TT	31 (10.4%)	32 (10.7%)	Ns	0.965 (0.57-1.63)
MTHFR1298 AA	158 (53.0%)	135 (45.2%)	0.049	1.363 (0.99-1.89)
PON1 55 MM	57 (19.1%)	46 (15.4%)	Ns	1.296 (0.85-1.99)

1298AA, PON1 192RR and PON1 55MM. The genotypes with statistically significant higher frequencies in the CAD patients were ACE DD, ACE 8 GG, and PON1 192RR (Table II).

Table II. Significance of the different polymorphisms studied in isolation

Polymorphism	Cases (n=298)	Controls (n=520)	P	OR (95% CI)
ACE DD	124 (41.6%)	83 (27.9%)	<0.0001	1.846 (1.31-2.60)
ACE 8 GG	110 (36.9%)	84 (28.2%)	0.023	1.491 (1.06-2.11)
AGT 174MM	4 (1.3%)	1 (0.3%)	NS	4.041 (0.45-36.4)
AGT 235TT	57 (19.1%)	55 (18.5%)	NS	1.045 (0.69-1.58)
MTHFR 677TT	31 (10.4%)	32 (10.7%)	NS	0.965 (0.57-1.63)
MTHFR 1298AA	158 (53.0%)	135 (45.2%)	0.049	1.363 (0.99-1.89)
PON1 55MM	57 (19.1%)	46 (15.4%)	NS	1.296 (0.85-1.99)
PON1 192RR	37 (12.4%)	22 (7.4%)	0.040	1.778 (1.02-3.10)

ACE: an giotensin-converting enzyme; AGT: angiotensinogen; CI: confidence interval; MTHFR: methylenetetrahydrofolate reductase; OR: odds ratio; PON1: paraoxonase 1

An association of polymorphisms in the same gene did not have an additive or synergistic effect, compared to the significance of each polymorphism in isolation, nor did it increase the risk of CAD (Table III).

Table III. Associations of polymorphisms in the same gene

Polymorphisms	Cases (n=298)	Controls (n=298)	OR (95% CI)	P
ACE DD + ACE 8 GG	93 (31.2%)	68 (22.8%)	1.534 (1.07-2.21)	0.021
AGT 174MM + AGT 235TT	4 (1.3%)	1 (0.3%)	4.041 (0.45-36.4)	NS
MTHFR 677TT + MTHFR 1298AA	28 (9.4%)	23 (7.7%)	1.240 (0.70-2.21)	NS
(ACE DD or ACE 8 GG) + PON1 192RR	32 (10.7%)	19 (6.4%)	1.767 (0.98-3.19)	0.057

ACE: angiotensin-converting enzyme; AGT: angiotensinogen; CI: confidence interval; MTHFR: methylenetetrahydrofolate reductase; OR: odds ratio; PON1: paraoxonase 1

However, polymorphic associations in different genes increased the risk of CAD, compared with the isolated polymorphisms.

The association of ACE DD or ACE 8 GG with AGT 235TT increased CAD risk, with the OR rising from 1.8 to 2.4, and similarly for the association of ACE DD or ACE 8 GG with MTHFR 1298AA.

When ACE DD or ACE 8 GG was associated with PON1 192RR, the relative risk rose from 1.8 to 4.2.



PON1 192 RR	37 (12.4%)	22 (7.4%)	0.040	1.778 (1.02-3.10)
-------------	------------	-----------	-------	-------------------

Legenda: ECA: Enzima Conversora da Angiotensina; AGT: Angiotensinogénio; MTHFR: Metiltetrahidrofolato Reductase; PON1: Paraoxonase; Estatística significativa para p<0.05.

Quando se associaram polimorfismos pertencentes ao mesmo gene, não houve nenhum efeito sinérgico ou aditivo, em relação á significância de cada um dos polimorfismos isolados, não havendo aumento do risco relativo para DC. (*Quadro III*)

*Quadro III. Associação de polimorfismos pertencentes ao mesmo Gene*

Polimorfismo	Caso (n=298)	Controlo (n=298)	OR (IC 95%)	Valor P
ECA DD + ECA 8 GG	93 (31.2%)	68 (22.8%)	1.534 (1.07-2.21)	0.021
AGT 174 MM + AGT 235 TT	4 (1.3%)	1 (0.3%)	4.041 (0.45-36.4)	NS
MTHFR 677 TT + MTHFR 1298 AA	28 (9.4%)	23 (7.7%)	1.240 (0.70-2.21)	Ns
(ECA DD ou ECA 8 GG) + PON 192 RR	32 (10.7%)	19 (6.4%)	1.767 (0.98-3.19)	0.057

Legenda: ECA: Enzima Conversora da Angiotensina; AGT: Angiotensinogénio; MTHFR: Metiltetrahidrofolato Reductase; PON1: Paraoxonase. Estatística significativa para p<0.05.

No nosso estudo, a associação de dois polimorfismos pertencentes a genes diferentes aumentou o risco de DC em relação a cada um dos polimorfismos isolados:

A associação da ECA DD ou ECA 8 GG + AGT 235 TT, aumentou o risco de DC, tendo o OR passado de 1,8 para 2,4 nessa associação, assim como na associação da ECA DD ou ECA 8 GG + MTHFR 1298 AA.

No caso em que a ECA DD ou a ECA 8 se associaram à PON 192 RR o risco relativo passou de 1,8 para 2,8.

O risco relativo de DC aumentou no nosso estudo, quando os polimorfismos se associam em genes diferentes pertencentes quer ao mesmo sistema enzimático (SRA) ou a sistemas enzimáticos diferentes, codificando diferentes proteínas. (*Quadro IV; Fig.4*)

*Quadro IV. Associação de polimorfismos em genes diferentes*

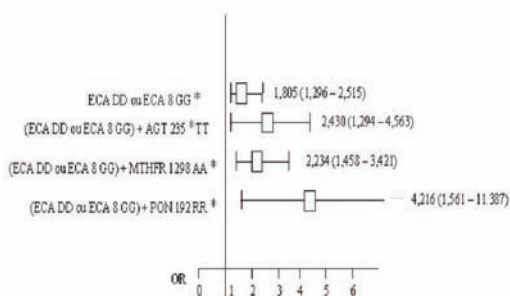
Polimorfismo	Caso (n=298)	Controlo (n=298)	OR (IC 95%)	Valor p
ECA DD ou ECA 8 GG	141 (47.3%)	99 (33.2%)	1.805 (1.30-2.52)	<0.0001
(ECA DD ou ECA 8 GG) + AGT 235 TT	34 (11.4%)	15 (5.0%)	2.430 (1.30-4.56)	0.005

In our study, relative risk for CAD increased for associations of polymorphisms in different genes, both in the same enzyme system (RAS) and in different enzyme systems and coding for different proteins (*Table IV; Fig. 4*).

*Table IV. Associations of polymorphisms in different genes*

Polymorphisms	Cases (n=298)	Controls (n=298)	OR (95% CI)	p
ACE DD or ACE 8 GG	141 (47.3%)	99 (33.2%)	1.805 (1.30-2.52)	<0.0001
(ACE DD or ACE 8 GG) + AGT 235TT	34 (11.4%)	15 (5.0%)	2.430 (1.30-4.56)	0.005
(ACE DD or ACE 8 GG) + MTHFR 1298AA	75 (25.2%)	39 (13.1%)	2.234 (1.46-3.42)	<0.0001
(ACE DD or ACE 8 GG) + PON 192RR	20 (6.7%)	5 (1.7%)	4.216 (1.56-11.39)	0.002

ACE: angiotensin-converting enzyme; AGT: angiotensinogen; CI: confidence interval; MTHFR: methylenetetrahydrofolate reductase; OR: odds ratio; PON1: paraoxonase 1



ACE: angiotensin-converting enzyme; AGT: angiotensinogen; MTHFR: methylenetetrahydrofolate reductase; OR: odds ratio; PON1: paraoxonase 1

*Figura 4. Risco relativo da associação da ECA I/D ou ECA 8 com polimorfismos sediados em genes diferentes.*

*Figure 4. Relative risk of the association of ACE I/D or ACE 8 polymorphisms with those in different genes*

The distributions of the ACE I/D, ACE 8 A/G and AGT M235T polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium, but the MTHFR A1298C and PON1 Q192R polymorphisms did not present the expected equilibrium. This was due to a higher proportion of heterozygotes in the control group, which would appear to confirm the increased CAD risk presented by the homozygous PON1 192RR and MTHFR 1298AA mutations.

Multiple logistic regression was used to identify independent risk factors for CAD.

The following variables were used in step 1: family history of CAD, smoking, alcohol intake, BMI, diabetes, dyslipidemia, fibrinogen,



(ECA DD ou ECA 8 GG) + MTHFR 1298 AA	75 (25.2%)	39 (13.1%)	2.234 (1.46-3.42)	<0.0001
(ECA DD ou ECA 8 GG) + PON 192 RR	20 (6.7%)	5 (1.7%)	4.216 (1.56-11.39)	0.002

ECA: Enzima Conversora da Angiotensina; AGT: Angiotensinogénio; MTHFR: Metiltetrahydrofolato Reductase; PON1: Paraoxonase. Estatística significativa para  $p < 0.05$

As distribuições genótípicas dos polimorfismos ECA I/D, ECA 8 A/G e AGT M235T, estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, mas as distribuições genótípicas dos polimorfismos da MTHFR A1298C e da PON Q192R estão desviadas do equilíbrio esperado. Este desequilíbrio é devido ao excesso de heterozigóticos na população controlo o que parece confirmar o risco aumentado que os homozigóticos PON 192 RR e MTHFR 1298 AA apresentam no desenvolvimento da DC.

Por fim usamos um modelo de regressão logística para identificar quais os factores de risco que se relacionaram de forma independente e significativa com a DC.

Entraram no 1º passo (*step 1*), as seguintes variáveis:

Doença coronária familiar, hábito de fumar, ingestão de álcool, IMC, diabetes, dislipidémia, fibrinogénio, Lp(a), Apolipoproteína B, PCR (as), VOP, ECA DD+ ECA 8 GG, (ECA DD ou ECA 8 GG) + PON 192 RR, (ECA DD ou ECA 8 GG) + AGT 235 TT, (ECA DD ou ECA 8 GG) + MTHFR 1298 AA, tendo sido identificados sete factores, independentes e associados a DC: Hábitos tabágicos, doença familiar, fibrinogénio, diabetes, associação genotípica (ECA DD ou ECA 8 GG) + MTHFR 1298 AA, associação genotípica (ECA DD ou ECA 8 GG) + PON 192 RR e finalmente a lipoproteína (a).

Constatamos que a interacção entre os dois genótipos (ECA DD ou ECA 8 GG) + MTHFR 1298 AA e (ECA DD ou ECA 8 GG + PON 192 RR), sediados em genes diferentes, contribuiu de forma independente e significativa para a presença de DC.

A última associação com interacção entre a ECA DD ou ECA 8 genótipo GG e a PON 192 RR mostrou um risco de DC cinco vezes superior (*Tabela V*).

lipoprotein(a), apolipoprotein B, hs-CRP, PWV, ACE DD + ACE 8 GG, (ACE DD or ACE 8 GG) + PON1 192RR, (ACE DD or ACE 8 GG) + AGT 235TT and (ACE DD or ACE 8 GG) + MTHFR 1298AA.

Seven factors were found to be independently associated with CAD: smoking, family history, fibrinogen, diabetes, association of the (ACE DD or ACE 8 GG) + MTHFR 1298AA or (ACE DD or ACE 8 GG) + PON1 192RR genotypes, and lipoprotein(a).

We found that the interaction between the two genotypes, (ACE DD or ACE 8 GG) + MTHFR 1298AA and (ACE DD or ACE 8 GG) + PON1 192RR, in different genes, significantly and independently increased the risk of CAD. The second of these associations, between ACE DD or ACE 8 GG and PON1 192RR, increased CAD risk fivefold (*Table V*).

Table V. Logistic regression model of CAD risk

Variable	B	SD	Exp (B)	95% CI	p
Smoking (%)	0.95	0.22	2.5983	1.70-3.94	<0.0001
Family history (%)	1.17	0.22	3.208	2.07-4.98	<0.0001
Fibrinogen (mg/dl)	0.01	0.001	1.009	1.01-1.01	<0.0001
Diabetes (%)	1.01	0.27	2.747	1.62-4.67	<0.0001
(ACE DD or ACE 8 GG) + MTHFR 1298AA	0.75	0.26	2.122	1.28-3.60	0.004
(ACE DD or ACE 8 GG) + PON1 192RR	1.67	0.70	5.331	1.35-21.10	0.017
Lipoprotein(a) (mg/dl)	0.01	0.003	1.007	1.00-1.01	0.023
Constant	-3.95	0.45	0.019		<0.001

ACE: angiotensin-converting enzyme; (ACE DD or ACE 8 GG) + MTHFR 1298AA: association of ACE DD or ACE 8 GG and MTHFR 1298AA; (ACE DD or ACE 8 GG) + PON1 192RR: association of ACE DD or ACE 8 GG and PON1 192RR; B: regression coefficient; CI: confidence interval; Exp(B): odds ratio; MTHFR: methylenetetrahydrofolate reductase; PON1: paraoxonase 1; SD: standard deviation

## DISCUSSION

The present study compares the incidence of particular polymorphisms, in isolation or in association, in a population with CAD and a control group, in order to evaluate certain gene-gene interactions that may be associated with CAD. However, as stated above, coronary artery disease is multifactorial and polygenic, and we are aware that there may be many other mutations and associations not examined here that could be important in predicting CAD risk (25).

We found that the DD genotype of ACE I/D

Tabela V. Modelo de regressão logística do risco de Doença Coronária

Variáveis	B	SD	Exp (B)	IC (95%)	Valor P
Hábitos tabágicos (%)	0.95	0.22	2.5988	1.70-3.94	<0.0001
Doença Familiar (%)	1.17	0.22	3.208	2.07-4.98	<0.0001
Fibrinogénio (mg/dl)	0.01	0.001	1.009	1.01-1.01	<0.0001
Diabetes (%)	1.01	0.27	2.747	1.62-4.67	<0.0001
(ECA DD ou ECA 8 GG) + MTHFR 1298 AA	0.75	0.26	2.122	1.28-3.60	0.004
(ECA DD ou ECA 8 GG) + PON 192 RR	1.67	0.70	5.331	1.35-21.10	0.017
Lipoproteína (a) (mg/dl)	0.01	0.003	1.007	1.00-1.01	0.023
Constante	-3.95	0.45	0.019		<0.001

Legenda: B- Coeficiente de regressão; SD - Standard Deviation; Exp(B)- Odds Ratio; IC- Intervalo de Confiança; ECA- Enzima Conversora da Angiotensina; MTHFR- Metiltetrahydrofolato Reductase; PON- Paraoxonase; (ECA GG ou ECA 8 GG) + MTHFR 1298 AA- Interação entre a ECA DD ou ECA 8 GG com a MTHFR 1298AA; (ECA GG ou ECA 8 GG) + PON 192 RR- Interação entre a ECA DD ou ECA 8 GG com a PON 192 RR; Estatística significativa para  $p < 0.05$ .

## DISCUSSÃO

O estudo que acabamos de apresentar é um estudo de associação que compara a incidência de um determinado polimorfismo marcador, ou associação de marcadores, numa população de indivíduos com DC e numa população controlo. Já anteriormente dissemos que a DC é uma doença multifactorial e poligénica. No presente estudo pretendemos avaliar algumas das interacções gene-gene, que podem existir no homem, associadas à DC. Sabemos, no entanto, que podem existir muitas outras mutações e associações, importantes, não estudadas por nós neste trabalho e que podem aumentar as possibilidades de predição da doença coronária.<sup>(25)</sup>

No presente estudo, verificamos que, os genótipos DD da ECA I/D (41,6% versus 27,9%,  $P < 0,0001$ ), o GG da ECA 8 (36,9 versus 28,2%,  $P=0,023$ ) o AA MTHFR 1298 (53,0% versus 45,2%,  $P=0,049$ ), e o RR da PON I (12,4 versus 7,4%,  $P=0.040$ ) apresentaram uma frequência mais elevada no grupo dos doentes coronários, em relação ao grupo dos controlos, diferença essa com significância estatística.

São por este facto considerados indicadores ou marcadores de associação positiva com a DC, ou seja factores de risco de DC. O odds ratio (OR) é no caso do ECA DD de 1,8 e portanto os

(41,6% vs. 27,9%,  $p < 0.0001$ ), ACE 8 GG (36,9 vs. 28,2%,  $p=0.023$ ), MTHFR 1298AA (53,0% vs. 45,2%,  $p=0.049$ ), and PON1 192RR (12,4 vs. 7,4%,  $p=0.040$ ), were more common in the CAD patients than in the controls, the differences being statistically significant.

These genotypes can therefore be considered as indicators of a positive association with CAD, i.e. as risk factors. The odds ratio for ACE DD is 1.8, and so carriers of this genotype have an 80% higher risk of developing the disease than those with other genotypes. In the case of ACE 8 GG and MTHFR 1298AA, the risk is approximately 50%.

As seemed logical, albeit not fully investigated before, an association of polymorphisms in the same gene but in different loci – ACE DD + ACE 8 GG, AGT 174MM + AGT 235TT and MTHFR 677TT + MTHFR 1298AA – did not increase the risk of CAD in our study. However, the association of two polymorphisms in different genes, whether or not they belonged to different enzyme systems but coding for different proteins and affecting different physiological pathways – (ACE DD or ACE 8 GG) + AGT 235TT, (ACE DD or ACE 8 GG) + MTHFR 1298AA, and (ACE DD or ACE 8 GG) + PON1 192RR – more than doubled the risk, and quadrupled it in the case of (ACE DD or ACE 8 GG) + PON1 192RR.

Polymorphisms do not act in isolation; the risk they confer can be increased or reduced by the presence of other polymorphisms that may have harmful or protective effects. The development of disease also depends on the environment, i.e. on behavioral risk factors that can be modified or controlled; such factors, if favorable, can mean that minor genetic defects do not lead to illness, or if not, can lead to early and severe vascular disease.

Genetic association studies are a fruitful area of research, especially to investigate the genetic contribution of complex phenotypes to the etiology of disease. They may be the only way to reveal population effects. However, their results are difficult to reproduce in subsequent studies, mainly due to problems with study design and inadequate statistical power due to small sample sizes<sup>(25-28)</sup>.

The case-control study presented here has certain features that we believe may have avoided such problems.

We took care to ensure that our sample size

indivíduos portadores deste genótipo, apresentam um risco relativo 80% maior de contrair a doença, em relação aos que não têm este genótipo. No caso do ECA GG e MTHFR AA esse risco é de 50%.

Como se nos afigurava lógico, mas ainda não tinha sido suficientemente investigado, a associação de polimorfismos pertencentes ao mesmo gene, mas em loci distintos (ECA DD+ ECA 8 GG; AGT 174 MM + AGT 235 TT e MTHFR 677 TT+ MTHFR 1298AA) não aumentou o risco de doença coronária, no nosso estudo. A associação de dois polimorfismos pertencentes a genes diferentes (ECA DD ou ECA 8 GG + AGT 235 TT; ECA DD ou ECA 8 GG + MTHFR 1298 AA; ECA DD ou ECA 8 GG + PON 192 RR), pertencentes ou não a diferentes sistemas enzimáticos, mas podendo codificar diferentes proteínas e interferir em eixos e caminhos fisiopatológicas diferentes, dobrou o risco de DC e quadruplicou este risco, no caso da associação da ECA I/D ou ECA 8 com a PON1 192 RR.

Sabendo-se que os polimorfismos que eventualmente comportem risco acrescido não existem isolados, o seu risco pode ser modulado, quer no sentido do aumento ou da diminuição, pela presença de outros polimorfismos deletérios ou protectores. O aparecimento de doença dependerá ainda do meio, ou seja, dos factores de risco comportamentais, susceptíveis de intervenção ou de controlo, que podem fazer, se favoráveis, que deficiências genéticas minor não levem à doença ou, se desfavoráveis, que essas mesmas deficiências levem ao aparecimento de doença vascular precoce e grave.

Os estudos de associação genética são uma estratégia de pesquisa útil, em especial na investigação etiológica do contributo genético nos fenótipos “complexos,” podendo ser o único método eficaz e capaz de desvendar efeitos populacionais. No entanto, estes estudos são difíceis de reproduzir. Os factores mais importantes e responsáveis pela incapacidade para reproduzir estas associações em estudos subsequentes resultam muitas vezes de um mau desenho do estudo e a falta de um poder estatístico adequado devido ao tamanho inadequado da amostra.<sup>(25-28)</sup>

O estudo caso-controlo que efectuamos, apresenta algumas qualidades, pois pensamos ter contornado certos aspectos referidos.

was sufficiently large, with a total of 596 subjects (298 cases and 298 controls). The cases were all recruited consecutively from patients admitted with CAD in order to avoid selection bias, while the controls were selected from the electoral register of the same population and matched for gender and age. Of course, only coronary angiography could have made certain that none of the controls had coronary disease, but the use of an invasive exam would have involved serious ethical difficulties. In order to avoid such bias, all doubtful cases were thoroughly investigated by means of non-invasive exams.

Unlike many other studies, our analysis was not limited to examining whether a single polymorphism presents increased risk, but evaluated various polymorphisms and some of the most important gene-gene associations, some of them never studied before.

The effect of a single nucleotide substitution in a candidate gene may not be evident in a given individual, but if this polymorphism is common in the population, it may have a much greater impact.

It is clear from the literature that for prediction of complex and multifactorial diseases, analysis of multiple polymorphisms and their associations can be much more useful than studying a single genetic marker in isolation<sup>(29)</sup>, since gene-gene interactions can mask the modest effect of a single marker in a complex phenotype<sup>(30-33)</sup>.

We believe that the methodology used in this study was appropriate and that our results may contribute to understanding the far from simple genetic aspects of complex and multifactorial diseases such as CAD.

Our results suggest that the association of polymorphisms in the same gene does not increase the risk of the isolated polymorphism, but that the association of polymorphisms in genes belonging to different enzyme systems is linked to increased risk compared to the isolated polymorphisms. The study may explain the difficulty of interpreting the risk of different polymorphisms in CAD, and may open up new possibilities in this field.

The molecular basis of the heritability of coronary artery disease may reside in this network of genetic interactions, which may have some as yet unknown hierarchical structure.

Research into gene-gene and gene-environment interactions is needed as a basis for

Houve da nossa parte uma preocupação na recolha de uma amostra significativa, pelo que foram incluídos um total de 596 indivíduos (298 casos e 298 controlos). Tentámos também evitar os enviesamentos por falhas no desenho do estudo, recorrendo, nos casos, à análise de todos os doentes internados de forma consecutiva por DC, o que impossibilita enviesamentos pela selecção. Os controlos foram escolhidos a partir dos cadernos eleitorais da mesma população dos casos e emparelhados por sexo e idade. Claro que só a realização de uma coronariografia nos daria a certeza de não estarmos a incluir alguns doentes no grupo dos controlos, mas o uso, nestes casos, de um exame invasivo levantar-nos-ia problemas éticos difíceis de contornar. Por isso e para evitar este possível “enviezamento”, nos casos duvidosos, optámos por ser exaustivos nos pedidos de exames complementares de diagnóstico não invasivo.

Ao contrário de muitos outros, não se limitou à análise de um único polimorfismo genético procurando verificar se este apresenta risco acrescido, mas foram avaliados vários polimorfismos e algumas das mais importantes associações gene-gene, algumas já descritas, outras ainda não investigadas.

Uma única substituição de nucleótidos em um gene candidato pode ser insuficiente para demonstrar o seu efeito em termos individuais, mas se este polimorfismo apresentar uma frequência populacional considerável, o seu impacto poderá ser muito mais relevante.

A literatura tem mostrado que no estudo de polimorfismos genéticos na predição do risco em doenças complexas multifactoriais, a análise conjunta de múltiplos marcadores genéticos e múltiplas associações polimórficas, parece ser muito mais importante que a análise de um só marcador isolado, [29] pois a ocorrência de interações gene-gene, pode mascarar o efeito modesto de um simples marcador, num fenotipo complexo. [30-33]

Pensamos ter sido usada uma metodologia correcta na condução do estudo, podendo assim os nossos resultados apresentar alguma utilidade na resolução de um tão complexo problema, como seja a investigação do contributo genético nas doenças complexas multifactoriais, tais como a doença coronária.

Os resultados que obtivemos neste estudo sugerem que a associação de polimorfismos

diagnostic scores that can predict individual risk in multifactorial diseases.

An improved understanding of the enzyme systems involved could mean that drugs that act on those systems would be particularly effective in carriers of certain mutations. One example is coronary patients with high-risk polymorphisms affecting ACE, angiotensinogen and angiotensin receptors, who could benefit from therapy targeting the renin-angiotensin system, such as beta-blockers, ACE inhibitors and angiotensin receptor blockers.

## CONCLUSIONS

The results of the present study suggest that:

1. The association of polymorphisms in the same gene does not increase the risk for CAD compared to the isolated polymorphism.

2. The association of polymorphisms in genes belonging to different enzyme systems, and affecting different physiological systems and pathways, is always linked to increased CAD risk compared to the isolated polymorphisms.

3. The combined risk conferred by multiple risk factors (genetic and environmental) may be considerably greater than the sum of individual risks.

This innovative study may contribute to a better understanding of overall genetic risk for CAD by examining the clustering of polymorphisms rather than considering each polymorphism in isolation.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study, which is part of the RTD project SAPIENS PROJECT 2001 (POCTI/MGI/2001), was funded by the Portuguese Foundation for Science and Technology.

We are grateful to the Clinical Pathology Laboratory and to its Director, Dr. Graça Andrade, for their assistance with all the biochemical analyses in this work.

mutados no mesmo gene não aumente o risco de DC em relação ao polimorfismo isolado, mas que a associação de polimorfismos mutados em genes diferentes e pertencentes a sistemas enzimáticos distintos esteja associada a maior risco coronário do que cada polimorfismo per si. O presente trabalho pode explicar as dificuldades na interpretação do risco dos vários polimorfismos na doença das artérias coronárias. Pode também abrir novas perspectivas nesta interpretação

A hereditariedade da doença coronária, pode ter a sua base molecular nesta rede de interações genéticas, com alguma organização hierárquica, que ainda desconhecemos.

A investigação no campo das interações gene/gene e gene/ ambiente é necessária para desenvolver scores diagnósticos que possam prever o risco individual, nestas doenças multifactoriais.

O conhecimento de sistemas enzimáticos envolvidos pode abrir ainda a perspectiva que determinados fármacos que actuam nesses sistemas sejam particularmente eficazes nos portadores dessas deficiências. Refira-se, a título de exemplo, que doentes coronários que apresentem polimorfismos com risco acrescido a nível da ECA, angiotensinogénio e receptores da angiotensina II poderão beneficiar particularmente com terapêuticas que controlem este eixo, como bloqueadores beta, inibidores da ECA e inibidores dos receptores da angiotensina II.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo, sugerem:

1. Que a associação de polimorfismos mutados no mesmo gene, nunca aumentou o risco de DC em relação ao polimorfismo isolado.

2. A associação de polimorfismos mutados em genes distintos, pertencentes a sistemas enzimáticos distintos e interferindo em sistemas e eixos fisiopatológicos diferentes, está associada a maior risco coronário do que cada polimorfismo per si.

3. O risco combinado conferido pelos múltiplos factores de risco (genéticos e ambientais), pode ser consideravelmente maior que a soma dos riscos individuais

4. Este trabalho suscita, de forma inovadora, a possibilidade de tentativa de compreensão do risco genético em termos globais, pela constelação de polimorfismos envolvidos, e não por cada alteração génica isolada.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho, integrado no projecto de Investigação e de Desenvolvimento Tecnológico SAPIENS PROJECT 2001 (POCTI/MGI/2001), foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia.

Agradecemos ao Laboratório de Patologia Clínica na pessoa da sua Directora, Dr.<sup>a</sup> Graça Andrade, a colaboração na efectuação de todas as análises bioquímicas deste trabalho.

Pedido de separatas para:  
Address for reprints:

Maria Isabel Mendonça  
Unidade de Investigação  
e Desenvolvimento  
Hospital Central do Funchal  
Av. Luís de Camões  
9000 Funchal  
Portugal  
Tel: +351.291.744312  
Fax: +351.291.744312  
e-mail:dep.card@srs.pt



## BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

1. Domnita Crisan and Jeanne Carr. Angiotensin I Converting Enzyme. Genotype and Disease Association. *Journal of Molecular Diagnostics* 2002;2(3):105-115.
2. Yoram Yagil and Chana Yagil. The search for the genetic basis of hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005;14:141-147.
3. Stratta P, Bermond F, Guarrera S, Canavese C, Carturan S, Dall'Omo A, Ciccone G, Bertola L, Mazzola G, Fasano E and Matullo G. Interaction between gene polymorphisms of nitric oxide synthase and renin-angiotensin system in the progression of membranous glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 587-595.
4. Cheng S, Grow MA, Pallaud C, Klitz W, Erlich HA, Visvikis S, Chen JJ, Pullinger CR, Malloy MJ, Siest G, Kane JP. A multilocus genotyping assay for candidate markers of cardiovascular disease risk. *Genome Res* 1999;9:936-949.
5. Tiret L, Bonnadeaux A, Poirier O, et al. Synergistic effects of angiotensin-converting enzyme and angiotensin-II type receptor gene polymorphism on risk of myocardial infarction. *Lancet*. 1994; 344:910-4.
6. Wang JG, Staessen JA. Genetic polymorphisms in the renin-angiotensin system: relevance for susceptibility to cardiovascular disease. *Eur J Pharmacol*. 2000;410:289-302.
7. Wang JG, Liu LZagato L et al. Blood Pressure in Relation to Three Candidate Genes in a Chinese Population. *Journal Hypertens* 2004; 22: 937-944.
8. Tiret L, Bonnardeaux A, Poirier O, Ricard S, Marques-Vidal P, Evans A, Arveiler D, Luc G, Kee F, Ducimetiere P, Soubrier F, Cambien F. Synergistic effects of angiotensin converting enzyme and angiotensin II type I receptor gene polymorphisms on risk of myocardial infarction. *Lancet* 1994, 344:910-913.
9. Berge KE, Bakken A, Bohn M, Erikssen J, Berg K. A DNA polymorphism at the angiotensin II type I receptor (AT1R) locus and myocardial infarction. *Clin Genet* 1997;52:71-76.
10. Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 2000;405:421-4.
11. Peng DQ, Zhao SP, Nie S, Li J. Gene-gene interaction of PPAR gamma and ApoE affects coronary heart disease risk. *Int J Cardiol* 2003;92(2-3):257-63.
12. Wilson P, Schaefer E, Larson M, Ordovas J. Apolipoprotein E Alleles and Risk of Coronary Disease. A Meta-analysis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1996;16:1250-1255.
13. Strittmatter W J and Roses A D. Apolipoprotein E and Alzheimer Disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(11): 4725-4727.
14. Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: The sixth report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: *Arch Intern Med* 1997;157:2413-2446.
15. Report of the Expert Committee on Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2002;25:S5-S20.
16. World Health Organization. Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic 1998;Geneva-WHO.
17. 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; 285:2486-2497.
18. Roland Asmar, Athanase Benetos, Jirar Topouchian, Pierre Laurent, Bruno Pannier, Anne Marie Brisac, Ralph Target, Bernard I. Levy. Assessment of Arterial Distensibility by Automatic Pulse Wave Velocity Measurement. Validation and Clinical Application Studies. *Hypertension* 1995;26:435-490.
19. Hernández D, Lacalzada J, Salido E, Linares J, Barragán A, Lorenzo V. Regression of left ventricular hypertrophy by lisinopril after renal transplantation: Role of ACE gene polymorphism. *Kidney Int* 2000;58:889-897.
20. Zhu X, Bouzekri N, Southam L, Cooper RS, Adeyemo A, McKenzie CA, Luke A, Chen G, Elston RC, Ward R. Linkage and Association Analysis of Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE)-Gene Polymorphisms with ACE Concentration and Blood Pressure. *Am J Hum Genet* 2001; 68:1139-1148.
21. Russ AP, Maerz W, Ruzicka V, Stein U, Gross W. Rapid detection of the hypertension-associated Met 235-Thr allele of the human angiotensinogen gene. *Hum Mol Gen* 1993;2:609-610.
22. Doria A, Ji L, Warram JH, Krolewski AS. Dde I polymorphism in the AGTR1 gene. *Hum Mol Genet* 1994; 3:1444.
23. Guo S.W., Thompson, E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 1992; 48: 361-372.
24. Wigginton J.E., Cutler, D.J., Agbecasis, G.R. A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *American Journal of Human Genetics* 2005;76: 887-893.
25. Pernod G, O Ormezzano, G Vanzetto. Gene-gene interactions in myocardial infarction. *Lancet*; 367: 1729-1730.
26. Cardon LR, Bell JL. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2001;2: 91-99.
27. Colhoun HM, McKeigue PM, Davey Smith G. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet* 2003;361: 865-872.
28. Cristina Barlassina, Chiara Lanzani, Paolo Manunta, Giuseppe Bianchi. Genetics of essential hypertension: From Families to Genes. *J Soc Nephrol* 2000; 13: S155-S164.
29. Keith T. Human Genome-Wide Association Studies. Achieving Sufficient Power to Detect Disease Genes with the Quebec Founder Population. *Genetic Engineering and Biotechnology News* 2007; 27(2).
30. Van Geel PP, Pinto YM, Zwinderman AH, Henning RH, Van Boven AJ, Zukema JW, Van Gilst WH. Increased risk for ischaemic events is related to combined RAS polymorphism. *Heart* 2001;85 (4):458-462.
31. Wang, Ji-Guang Liu Lifang, Zagato Laura, Xie Jinxiang, Fagard Robert, Jin Kugen, Wang Jinxiang, Li Yan, Bianchi Giuseppe, Staessen Jan A, Liu Lisheng. Blood pressure in relation to three candidate genes in a Chinese population. *Journal of Hypertension* 2004;22(5):937-944.
32. Rosendaal FR. Genetic studies in complex disease: the case pro association studies. *J Thomb Haemost* 2003;1:1679-80.
33. Cambien François. Genetics and Coronary Heart Disease. *Future Cardiology*, 2005 1(1):17-27.