



Artigo Original

Polimorfismo Genético, Terapia Farmacológica e Função Cardíaca Sequencial em Pacientes com Insuficiência Cardíaca

Genetic Polymorphism, Medical Therapy and Sequential Cardiac Function in Patients with Heart Failure

Marco Antonio Romeo Cuoco, Alexandre Costa Pereira, Glória de Fátima Alves da Mota, José Eduardo Krieger, Alfredo José Mansur

Instituto do Coração (InCor), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP - Brasil

Resumo

Fundamento: Variantes funcionais do gene da enzima conversora da angiotensina (ECA) podem estar associados com a resposta à terapia em portadores de insuficiência cardíaca (IC).

Objetivo: Testar a hipótese de diferenças na avaliação ecocardiográfica sequencial da fração de ejeção do ventrículo esquerdo de pacientes com IC em tratamento farmacológico, inclusive com inibidores da ECA, em relação ao polimorfismo de inserção (I) e deleção (D) do gene da ECA.

Métodos: Estudamos 168 pacientes (média de idade $43,3 \pm 10,1$ anos), 128 (76,2%) dos quais homens, com IC e ecocardiogramas sequenciais. O polimorfismo I/D foi determinado por reação em cadeia da polimerase. A fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) foi analisada comparativamente aos genótipos. Mais de 90% dos pacientes estavam tomando inibidores da ECA.

Resultados: Houve um aumento significativamente maior na FEVE média em pacientes com o alelo D, em comparação com pacientes com genótipo II ($p = 0,01$) após um seguimento médio de 38,9 meses. O alelo D foi associado com aumento de 8,8% na FEVE média no mesmo período. Além disso, observou-se uma tendência para um efeito do “número de cópias” do alelo D sobre o aumento da FEVE média com o tempo: uma diferença de 3,5% na variação da FEVE entre os pacientes com genótipos II e ID ($p = 0,03$) e de 5% entre os pacientes com genótipos II e DD ($p = 0,02$).

Conclusão: O polimorfismo de deleção do gene da ECA pode estar associado com a resposta ao tratamento farmacológico com inibidores da ECA em portadores de IC. Outros estudos controlados poderão contribuir para uma melhor compreensão das influências genéticas sobre a resposta à terapia. (Arq Bras Cardiol 2008; 90(4): 274-279)

Palavras-chave: Inibidores da enzima conversora da angiotensina, genética, insuficiência cardíaca.

Summary

Background: Functional variants of angiotensin-converting enzyme (ACE) gene may be associated with response to therapy in patients with heart failure (HF).

Objective: To test the hypothesis of differences in sequential echocardiographic evaluations of left ventricular ejection fraction in patients with HF on medical therapy, including ACE inhibitors in relation to insertion (I) / deletion (D) polymorphism of the ACE gene.

Methods: We studied 168 patients (mean age 43.3 ± 10.1 years), 128 (76.2%) men, with HF and sequential echocardiograms. The I/D polymorphism was determined by polymerase chain reaction. Left ventricular ejection fraction (LVEF) was analyzed comparatively to genotypes. More than 90% of patients were on ACE inhibitors.

Results: There was a significantly greater increase in mean LVEF in patients with the D allele compared to patients with the II genotype ($p=0.01$) after a mean follow-up of 38.9 months. The D allele was associated with an increase of 8.8% in mean LVEF over the same period. Furthermore, there was a tendency toward a D allele “copy number” effect on the increase of mean LVEF over time: a 3.5% difference in LVEF variation between patients with the II and the ID genotypes ($p = 0.03$) and a 5% difference between patients with the II and DD genotypes ($p=0.02$).

Conclusion: ACE gene deletion polymorphism may be operative in response to medical treatment that included ACE inhibitors in patients with HF. Further controlled studies may contribute to better understanding of genetic influences on response to therapy. (Arq Bras Cardiol 2008; 90(4): 252-256)

Key words: Angiotensin-converting enzyme inhibitors; genetics; heart failure.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Marco Antonio Romeo Cuoco •

Av. Enéas de Carvalho, 44 - 05403-000 - São Paulo, SP - Brasil

E-mail: marcocuoco@cardiol.br, cuocomar@incor.usp.br

Artigo recebido em 20/03/2007; revisado recebido em 10/09/2007; aceito em 30/11/2007.

Introdução

O polimorfismo de inserção (I) e deleção (D) do gene da enzima conversora da angiotensina (ECA) pode estar associado com a resposta do paciente ao tratamento farmacológico. A regressão da hipertrofia ventricular esquerda em pacientes com hipertensão arterial tratados com enalapril foi maior em indivíduos homocigotos para o alelo D¹. Portadores de insuficiência cardíaca e disfunção sistólica com o alelo D que não foram tratados com betabloqueadores apresentaram pior sobrevida livre de transplante². Os benefícios do tratamento com doses elevadas de inibidores da enzima conversora da angiotensina associados com betabloqueadores foram maiores em pacientes DD³. Além disso, apenas portadores de insuficiência cardíaca com genótipos ID e II demonstraram melhora na função sistólica ventricular esquerda após tratamento com espironolactona⁴. Portanto, observações diferentes em pacientes com insuficiência cardíaca indicam que o polimorfismo de inserção/deleção do gene da enzima conversora da angiotensina desempenha um papel significativo na resposta ao tratamento.

Esses achados podem estar associados ao fato de a variabilidade da atividade da enzima conversora da angiotensina ser parcialmente modulada pelas variantes funcionais determinadas por esse polimorfismo bialélico localizado no *ínton* 16 do gene da ECA. A diferença dos dois alelos reside na presença ou ausência de uma seqüência de 287 pares de base e determina o alelo I (inserção) ou D (deleção). O alelo D foi associado com níveis plasmáticos mais elevados e maior atividade da enzima conversora da angiotensina^{5,6}, e também com prognósticos adversos em portadores de insuficiência cardíaca^{2,3,7,8}. Por esse motivo, aventamos a hipótese de que pudesse haver diferenças na avaliação ecocardiográfica seqüencial da fração de ejeção do ventrículo esquerdo no seguimento de pacientes com insuficiência cardíaca em tratamento farmacológico, inclusive com inibidores da enzima conversora da angiotensina, em relação às variantes funcionais do gene da ECA.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a variação na fração de ejeção do ventrículo esquerdo, estimada por exames ecocardiográficos seqüenciais, de portadores de insuficiência cardíaca em tratamento farmacológico, inclusive com inibidores da enzima conversora da angiotensina, encaminhados pelo ambulatório geral de um hospital universitário de referência em cardiologia, em relação às variantes funcionais do gene da ECA.

Métodos

Delimitação do estudo

Entre 1995 e 2001, pacientes de uma coorte inicial em andamento de portadores de insuficiência cardíaca foram genotipados quanto às variantes funcionais do gene da enzima conversora da angiotensina e submetidos a uma avaliação ecocardiográfica seqüencial.

Pacientes

Cento e sessenta e oito pacientes foram estudados no Ambulatório Geral do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os pacientes tinham

entre 19 e 64 anos (média 43,3; desvio-padrão 10,1), sendo que 128 (76,2%) eram homens e 40 (23,8%) eram mulheres. O diagnóstico de insuficiência cardíaca foi estabelecido de acordo com critérios publicados anteriormente⁹. A classificação da etiologia da insuficiência cardíaca seguiu recomendações prévias^{10,11}.

Critérios de inclusão

Pacientes com insuficiência cardíaca sintomática de diferentes etiologias e fração de ejeção ventricular esquerda \leq 45% no ecocardiograma Doppler transtorácico bidimensional foram considerados elegíveis para o estudo. Os pacientes foram avaliados para tratamento cirúrgico de insuficiência cardíaca, inclusive transplante cardíaco. Em especial, os pacientes com valvopatia inscritos no estudo eram aqueles com grave disfunção ventricular esquerda a ponto de não serem considerados elegíveis para reparo ou substituição valvar, mas sim candidatos a transplante cardíaco. Só foram incluídos neste estudo pacientes com pelo menos dois exames ecocardiográficos (no início do estudo e durante o seguimento).

Critérios de exclusão

Pacientes com valvopatia que seriam candidatos a tratamento cirúrgico convencional, como reparo ou substituição valvar, bem como pacientes com cardiomiopatia hipertrófica, doença pulmonar obstrutiva crônica, infarto agudo do miocárdio, angina instável, grave disfunção renal ou hepática, grave doença arterial periférica, doença cerebrovascular, infecção ativa, neoplasma coexistente e úlcera péptica ativa, foram excluídos do estudo¹².

Etiologia da insuficiência cardíaca

A insuficiência cardíaca foi atribuída à cardiomiopatia dilatada idiopática em 61 (36,3%), cardiomiopatia isquêmica em 36 (21,4%), cardiomiopatia hipertensiva em 25 (14,9%), doença de Chagas em 21 (12,5%), cardiomiopatia alcoólica em 10 (6%), valvopatia em 10 (6%) e cardiomiopatia periparto em 5 (2,9%) pacientes.

Avaliação da função ventricular esquerda

A fração de ejeção ventricular esquerda seqüencial foi determinada por ecocardiograma unidimensional. Em alguns pacientes, foi empregado o método bidimensional, utilizando-se a regra de Simpson. A função ventricular esquerda foi avaliada por ecocardiografistas que desconheciam os genótipos dos pacientes e de acordo com recomendações publicadas anteriormente¹³.

Determinação do genótipo

O DNA genômico foi extraído de leucócitos separados do sangue total por meio de um método convencional¹⁴. O polimorfismo I/D foi detectado pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com *primers* oligonucleotídicos flanqueando os respectivos fragmentos D e I do *ínton* 16 do gene da enzima conversora da angiotensina⁶. A genotipagem foi realizada de maneira "cega" depois que as amostras foram

Artigo Original

separadas por eletroforese em gel de agarose a 1% e coradas com brometo de etídio (1µg/ml). Devido à amplificação preferencial do alelo D em amostras heterozigotas, cada amostra com o genótipo DD foi submetida a uma segunda amplificação independente por PCR com um *primer* capaz de reconhecer uma seqüência específica da forma polimórfica de inserção¹⁵.

Análise estatística

O teste de qui-quadrado foi usado para avaliar associações entre o polimorfismo I/D e as variáveis discretas. O teste *t* de Student foi usado para a comparação das médias de dois grupos, e a ANOVA foi usada para a comparação de mais de dois grupos de variáveis contínuas.

A relação entre o polimorfismo I/D e a evolução dos pacientes com insuficiência cardíaca foi analisada levando-se em conta o padrão de herança genética conferida ao alelo D¹⁶. Dessa maneira, considerando-se um modelo codominante para o alelo D, os três genótipos foram analisados separadamente (DD *versus* ID *versus* II), enquanto considerando-se um modelo recessivo do alelo D, pacientes que tinham o genótipo DD foram comparados com pacientes que tinham o alelo I (DD *versus* ID + II). Por fim, considerando-se um modelo dominante do alelo D, os pacientes com o alelo D foram analisados em relação à homozigose para o alelo I (DD + ID *versus* II).

As análises estatísticas foram feitas com auxílio do programa SAS¹⁷. Valores de *p* < de 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

Ética

O protocolo de estudo foi aprovado pelo Conselho de Ética em Pesquisas Médicas envolvendo Seres Humanos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Resultados

A freqüência genotípica do gene da enzima conversora da angiotensina foi de 32,5% para o genótipo DD, 49,7% para o genótipo ID e 17,8% para o genótipo II. As freqüências genotípicas estavam de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Não foi possível determinar o genótipo de apenas um dos pacientes, em virtude de problemas técnicos.

A comparação entre as características clínicas e demográficas dos pacientes no início do estudo não revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (Tabela 1).

Em relação à etiologia da insuficiência cardíaca, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com genótipos DD, ID ou II.

Houve uma diferença estatisticamente significativa na variação da fração de ejeção do ventrículo esquerdo com o tempo. Houve também um aumento significativo na fração de ejeção média dos pacientes com o genótipo DD, comparado com os pacientes com genótipos ID e II (Figura 1).

Considerando-se o alelo D em um modelo dominante,

Tabela 1 - Características clínicas e demográficas iniciais relativas aos genótipos da enzima conversora da angiotensina

	DD N = 54	ID N = 83	II N = 30	P
Idade (anos) – média (DP)	4,1 (11,2)	43,9 (9,9)	45,6 (8,2)	NS
Sexo (%)				NS
Masculino	82,4	68	85,7	
Feminino	17,6	32	14,3	
Etnia (%)				
Branços	79,2	73,7	82,1	NS
Mulatos	14,6	15,8	14,3	
Negros	6,2	10,5	3,6	
Classe funcional NYHA (%)				NS
I	-	1,4	-	
II	66,7	53,6	60	
III	26,7	40,6	32	
IV	6,7	4,3	8	
Hipertensão (%)	49	42	50	NS
Diabete melito (%)	12	10,5	0	NS
Tabagismo (%)	51,2	47	37,5	NS
Diâmetro diastólico do VE (mm), média (DP)	72,9 (6,8)	73,4 (7)	71 (6,1)	NS
Fração de ejeção, média (DP)	35,8 (5)	35,8 (5,9)	38,4 (6,1)	NS
Meses transcorridos entre os ecocardiogramas, média (DP)	41,5 (27,1)	37,7 (27,7)	43 (26,6)	NS
Inibidores da ECA (%)	97,6	93,8	95,5	NS
Digoxina (%)	95,2	89,2	90,9	NS
Betabloqueadores (%)	21,4	15,4	18,2	NS
Diuréticos (%)	97,6	100	95,5	NS

NS - não-significante.

observamos um aumento estatisticamente significativo no valor médio da fração de ejeção do ventrículo esquerdo com o tempo em pacientes com o alelo D, em relação aos pacientes homozigotos para o alelo I (*p* = 0,01). A presença de pelo menos um alelo D foi associada com um aumento de 8,8% na fração de ejeção após um seguimento médio de 38,9 meses (desvio-padrão de 24), comparado com uma redução de 1,73% nos pacientes com o genótipo II após um seguimento médio de 43 meses (desvio-padrão de 26,6).

Observou-se uma tendência, embora não significativa, para um efeito do “número de cópias” do alelo D sobre a progressão da fração de ejeção: uma diferença de 3,5% entre a progressão da fração de ejeção de pacientes com genótipos II e ID (*p* = 0,03) e de 5% entre pacientes com genótipos II e DD (*p* = 0,02) (Figura 2).

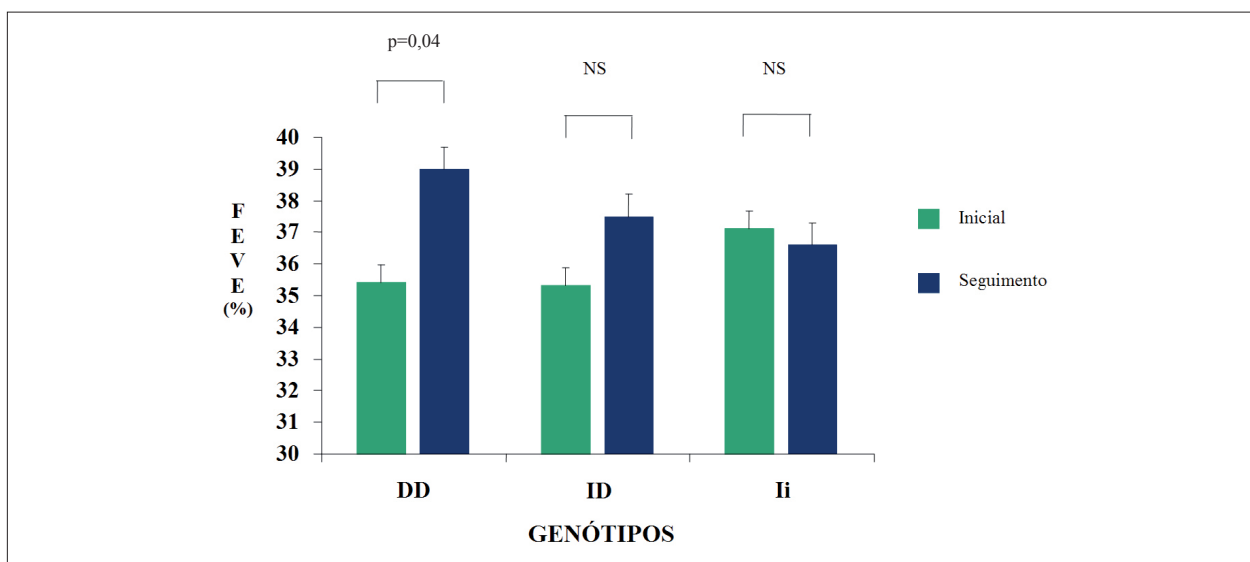


Fig. 1 - Fração de ejeção ventricular esquerda seqüencial relativa aos genótipos DD, ID e II. FEVE - Fração de Ejeção do Ventriculo Esquerdo.

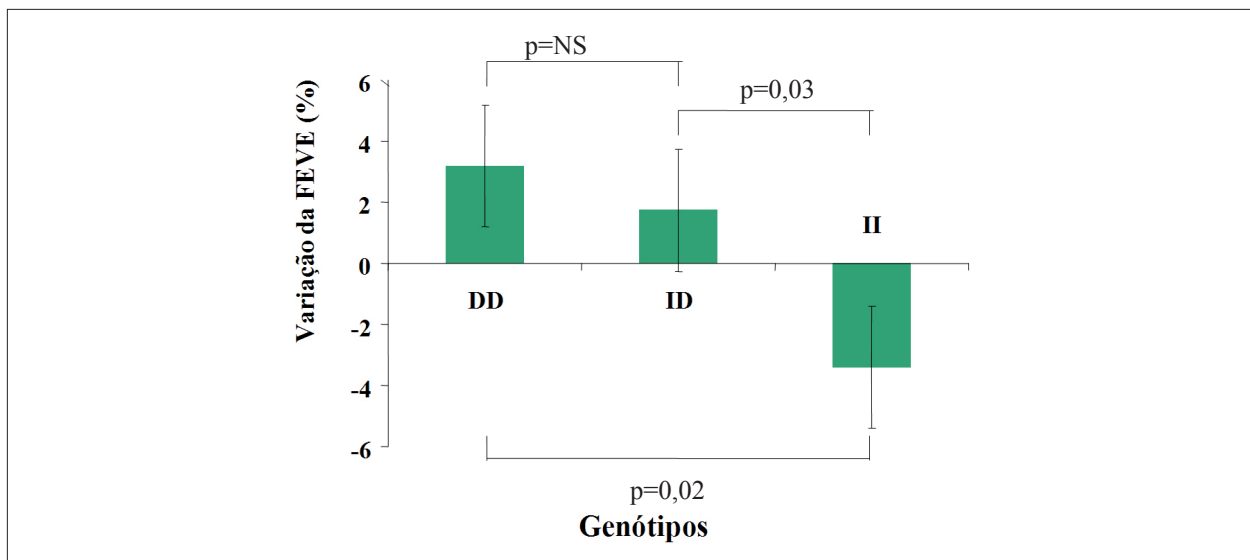


Fig. 2 - Efeito do "número de cópias" sobre a variação na fração de ejeção ventricular esquerda. FEVE - Fração de Ejeção do Ventriculo Esquerdo.

Discussão

No presente estudo, observamos que os pacientes com insuficiência cardíaca e alelo D tratados com inibidores da enzima conversora da angiotensina apresentaram uma melhora considerável na fração de ejeção do ventrículo esquerdo, avaliada por ecocardiogramas seqüenciais, em comparação com os pacientes com o genótipo II.

Esse achado reforça a hipótese da influência das variantes funcionais do gene da ECA sobre a resposta ao tratamento farmacológico para insuficiência cardíaca. Nosso estudo revelou a mesma tendência de estudos publicados anteriormente. Por exemplo, foram observadas maior regressão induzida por enalapril da hipertrofia ventricular esquerda e

melhora no enchimento diastólico ventricular esquerdo em pacientes hipertensos com genótipo DD, comparativamente aos pacientes com o alelo I¹. Em outro estudo, a sobrevida livre de transplante foi ligeiramente menor, sobretudo em pacientes com alelo D e disfunção sistólica ventricular esquerda que não receberam betabloqueadores². Mais recentemente, um estudo analisou pacientes com disfunção sistólica ventricular esquerda e demonstrou que os benefícios proporcionados pela administração de betabloqueadores e altas doses de inibidores da enzima conversora da angiotensina eram maiores para os pacientes DD³. Esses dados indicam que o alelo D pode ser um marcador de resposta farmacológica aos inibidores da enzima conversora da angiotensina e betabloqueadores. Portanto, a determinação

Artigo Original

do polimorfismo de inserção/deleção pode ajudar a orientar a terapia de pacientes com insuficiência cardíaca.

Vale ressaltar que, em um estudo realizado com portadores de insuficiência cardíaca designados aleatoriamente para receber espironolactona, apenas os pacientes que não tinham genótipo DD apresentaram melhora significativa na função ventricular esquerda⁴. Os resultados divergentes observados nesses estudos devem-se, em parte, às diferenças genéticas das populações analisadas, ao número de pacientes estudados e às diferentes classes de medicamentos avaliados, com sítios e mecanismos de ação distintos.

Neste estudo, mais de 90% dos pacientes estavam em uso de inibidores da enzima conversora da angiotensina, mas apenas os que tinham o alelo D apresentaram melhora significativa na fração de ejeção do ventrículo esquerdo ao longo do tempo. Esse achado pode estar relacionado com uma melhor resposta aos inibidores da enzima conversora da angiotensina em indivíduos com maior atividade neurormonal. Na verdade, indivíduos com o genótipo DD apresentam níveis plasmáticos e teciduais mais elevados da enzima conversora da angiotensina¹⁸, e podem ter níveis mais altos de angiotensina II. De acordo com essa observação, um estudo publicado anteriormente mostrou uma maior resposta pressora à infusão de angiotensina I em homens normotensos com genótipo DD, provavelmente em consequência da elevação dos níveis de angiotensina II em indivíduos homocigotos para o alelo D¹⁹. É interessante notar que os mesmos autores demonstraram, mais tarde, que o efeito do enalaprilato intravenoso era significativamente maior e durava mais tempo em homens normotensos com genótipo II²⁰.

A tendência para o efeito do número de cópias do alelo D sobre o aumento da fração de ejeção do ventrículo esquerdo com o tempo poderia ser analisada como a expressão genética e molecular da melhora da função ventricular esquerda observada em pacientes com insuficiência cardíaca em tratamento com inibidores da enzima conversora da angiotensina. De fato, como foi demonstrado em estudos anteriores, os benefícios da inibição da ECA foram mais pronunciados em pacientes com concentrações plasmáticas neurormonais elevadas²¹⁻²³. Além disso, aparentemente o maior benefício em termos de sobrevida é obtido por pacientes com genótipo DD e aumento crescente da inibição neurormonal³. Em nosso estudo, observou-se uma tendência para uma progressão linear da função ventricular esquerda a partir de pacientes com o genótipo II, e provavelmente menor atividade da enzima conversora da angiotensina, para pacientes homocigotos para o alelo D, e provavelmente maior atividade da enzima conversora da angiotensina, que podem ter maior propensão a uma melhor resposta aos inibidores da ECA.

Limitações do estudo

Nosso estudo tem limitações. O número de pacientes analisados foi relativamente pequeno diante da heterogeneidade das etiologias. No entanto, se levarmos em consideração que a insuficiência cardíaca é a fase final de uma série de condições patológicas, essa heterogeneidade etiológica enriqueceria a nossa observação, uma vez que nos permite avaliar a insuficiência cardíaca e os antecedentes genéticos à luz de

diferentes características patogênicas. Outra possível limitação pode estar relacionada com o pequeno número de pacientes que estavam em uso de betabloqueadores no início do estudo. Esse fato impede uma maior análise da interação dessa terapia com as variantes genéticas da enzima conversora da angiotensina, como foi demonstrado previamente^{2,3}.

Neste estudo, os níveis plasmáticos da enzima conversora da angiotensina não foram determinados porque mais de 90% dos pacientes estavam recebendo terapia com inibidores da ECA. Entretanto, como afirmado anteriormente, os níveis plasmáticos hormonais não revelam por si só a atividade da ativação neurormonal e, portanto, é possível que o efeito tecidual e a sensibilidade do receptor possam desempenhar um papel²³.

Este foi um estudo não-randomizado, e apenas pacientes com exames ecocardiográficos sequenciais foram avaliados. Essas características podem ter levado a um viés de seleção. É possível que pacientes com doença mais avançada e maior incidência de mortalidade não apresentem a mesma associação farmacogenética descrita aqui.

Outra possível limitação reside no fato de que a dose do inibidor da enzima conversora da angiotensina não foi determinada no presente estudo. Pacientes com genótipo DD e insuficiência cardíaca obtêm os maiores benefícios em termos de desfecho com uma dose elevada de inibidores da enzima conversora da angiotensina, como foi publicado recentemente³.

Por fim, a avaliação da função ventricular esquerda pela ecocardiografia, apesar de prática, também pode deixar a desejar. Portanto, são necessários outros estudos para avaliar a fração de ejeção do ventrículo esquerdo por meio da ventriculografia radioisotópica.

Implicações clínicas

Os achados do nosso estudo contribuem para a compreensão da modulação do polimorfismo do gene da enzima conversora da angiotensina na resposta clínica de pacientes com insuficiência cardíaca em tratamento com inibidores da ECA. É necessário que sejam feitos outros estudos para demonstrar se as variantes genéticas da enzima conversora da angiotensina podem ajudar a identificar os pacientes com insuficiência cardíaca mais propensos a apresentar uma maior resposta aos inibidores da ECA e, conseqüentemente, uma melhor evolução clínica.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de tese de doutorado de Marco Antonio Romeo Cuoco pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Referências

1. Sasaki M, Oki T, Iuchi A, Tabata T, Yamada H, Manabe K, et al. Relationship between the angiotensin converting enzyme gene polymorphism and the effects of enalapril on left ventricular hypertrophy and impaired diastolic filling in essential hypertension: M-mode and pulsed Doppler echocardiographic studies. *J Hypertens*. 1996; 14: 1403-8.
2. McNamara DM, Holubkov R, Janosko K, Palmer A, Wang JJ, MacGowan GA, et al. Pharmacogenetic interactions between beta-blocker therapy and the angiotensin-converting enzyme deletion polymorphism in patients with congestive heart failure. *Circulation*. 2001; 103: 1644-8.
3. McNamara DM, Holubkov R, Postava L, Janosko K, MacGowan GA, Mathier M, et al. Pharmacogenetic interactions between angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy and the angiotensin-converting enzyme deletion polymorphism in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2004; 44: 2019-26.
4. Cicoira M, Rossi A, Bonapace S, Zanolla L, Perrot A, Francis DP, et al. Effects of ACE gene insertion/deletion polymorphism on response to spironolactone in patients with chronic heart failure. *Am J Med*. 2004; 116: 657-61.
5. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*. 1990; 86: 1343-6.
6. Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin-converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidylcarboxypeptidase 1). *Nucleic Acids Res*. 1992; 20: 1433.
7. Andersson B, Sylven C. The DD genotype of the angiotensin-converting enzyme gene is associated with increased mortality in idiopathic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1996; 28: 162-7.
8. Cuoco MAR, Pereira AC, Freitas HFG, Mota GFA, Fukushima JT, Krieger JE, et al. Angiotensin-converting enzyme gene deletion polymorphism modulation of onset of symptoms and survival rate of patients with heart failure. *Int J Cardiol*. 2005; 99: 97-103.
9. Mckee PA, Castelli WP, Mcnamara PM, Kannel WB. The natural history of congestive heart failure: the Framingham study. *N Engl J Med*. 1971; 285: 1441-6.
10. Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Br Heart J*. 1980; 44: 672-3.
11. Richardson P, Mckenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'connel J, et al. Report of the 1995 World Health Organization Society and Federation of Cardiology task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation*. 1996; 93: 841-2.
12. The SOLVD Investigators. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fraction and congestive heart failure. *N Engl J Med*. 1991; 325: 293-302.
13. Sahn DJ, De Maria A, Kisslo J, Weyman A. The committee on M-mode standardization of the American Society of Echocardiography. *Circulation*. 1978; 58: 1072-83.
14. Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. A single salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16: 1215.
15. Shanmugam V, Sell KW, Saha BK. Mistyping ACE heterozygotes. *PCR Methods Appl*. 1993; 3: 120-1.
16. Lindpainter K, Pfeffer MA, Kreutz R, Stampfer MJ, Grodstein F, Lamotte F, et al. A prospective evaluation of an angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med*. 1995; 332: 706-11.
17. SAS Institute Inc, SAS/STAT® User's Guide. Version 6. Cary, North Carolina: SAS Institute Inc; 1989.
18. Danser AHJ, Schalekamp MADH, Bax WA, Brink AM, Saxena PR, Rieger GAJ, et al. Angiotensin-converting enzyme in the human heart: effect of the deletion/insertion polymorphism. *Circulation* 1995;92:1387-8.
19. Ueda S, Elliot HL, Morton JJ, Connell JMC. Enhanced pressor response to angiotensin I in normotensive men with the deletion genotype (DD) for angiotensin-converting enzyme. *Hypertension*. 1995; 25: 1266-9.
20. Ueda S, Meredith PA, Morton JJ, Connell JMC, Elliot HL. ACE (I/D) genotype as a predictor of the magnitude and duration of the response to an ACE inhibitor drug (Enalaprilat) in humans. *Circulation*. 1998; 98: 2148-53.
21. The CONSENSUS Trial Study Group. Effect of enalapril on mortality in severe congestive heart failure: results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N Engl J Med*. 1987; 316: 1429-35.
22. Francis GS, Cohn JN, Johnson G, Rector TS, Goldman S, Simon A, for the V-HeFT VA Cooperative Studies Group. Plasma norepinephrine, plasma renin activity, and congestive heart failure: relations to survival and the effects of therapy in V-HeFT II. *Circulation*. 1993 (Suppl VI):VI-40-VI-48.
23. Latini R, Masson S, Anand I, Salio M, Hester A, Judd D, et al, for the Val-HeFT Investigators. The comparative prognostic value of plasma neurohormones at baseline in patients with heart failure enrolled in Val-HeFT. *Eur Heart J*. 2004; 25: 292-9.