

A Importância dos Factores Genéticos Protrombóticos e da sua Associação com Factores de Risco Cardiovascular Clássicos – a Propósito do Estudo de uma Família

Miguel Melo¹, Ana Fagulha², Joana Guimarães¹, Teresa Martins², Francisco Carrilho⁴, Manuela Carvalho⁵

¹ Interno do Internato Complementar de Endocrinologia, Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo dos HUC

² Assistente Hospitalar de Endocrinologia, Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo dos HUC

³ Assistente Graduada de Endocrinologia, Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo dos HUC

⁴ Chefe de Serviço de Endocrinologia, Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo dos HUC

⁵ Directora do Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo dos HUC e Professora da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Resumo

O risco cardiovascular global é determinado pela associação de vários factores de risco, cuja coexistência promove o seu aumento exponencial. Para além dos factores de risco clássicos, outros factores apelidados de «não clássicos» ou «não convencionais» foram descritos mais recentemente, assumindo uma relevância crescente à medida que parecem estar implicados na origem de um número significativo de eventos. Entre estes contam-se a hiperhomocisteinemia, que hoje se sabe condicionar de uma forma independente um risco acrescido de morbidade e mortalidade cardiovascular, os polimorfismos do inibidor-1 do activador do plasminogénio (PAI) e da enzima de conversão da angiotensina (ACE), entre outros.

Apresenta-se o caso clínico de uma doente com diabetes *mellitus* tipo 1 desde os 10 anos de idade, que aos 26 anos sofreu um acidente vascular cerebral (AVC) isquémico. Tinha antecedentes de hipertensão e dislipidemia com vários anos de evolução. Na altura do AVC apresentava complicações macro e micro-vasculares da diabetes (retinopatia proliferativa bilateral, nefropatia com proteinúria não nefrótica, neuropatia sensitivo-motora nos membros inferiores e autonómica cardiovascular e doença vascular documentada no território carotídeo). Um mês antes havia iniciado terapêutica com bomba infusora de insulina, que lhe permitiu pela primeira vez um adequado controlo metabólico glucídico e lipídico. Na sua história familiar são de salientar vários episódios tromboembólicos em idade precoce, alguns dos quais fatais. O estudo genético dos factores pró-trombóticos revelou a presença de homozigotia para a mutação A1298C da metilenotetrahidrofolato reductase (MTHFR). Face a este resultado, procedeu-se ao estudo genético dos mesmos factores na única irmã. Esta não apresenta alterações da MTHFR, mas possui homozigotia para as mutações PAI (4G/4G) e ACE (D/D), ambas associadas a um risco cardiovascular acrescido.

A propósito do estudo desta família, tecem-se alguns comentários sobre a necessidade de actuar de uma forma precoce e eficaz sobre os factores de risco clássicos (diabetes, hipertensão, dislipidemia). O estudo desta família é também um bom exemplo da importância dos factores protrombóticos genéticos e da sua associação com os factores de risco clássicos. O diagnóstico da mutação da MTHFR assume particular relevância, uma vez que a intervenção farmacológica nestes casos permite baixar o risco conferido pelo património genético.

Abstract

Global cardiovascular risk is determined by the association of several risk factors which coexistence promotes their exponential increase. Beyond classical risk factors, other risk factors denominated “non classical” or “non conventional” have been recently described and are assuming an increasing relevance because they seem to be implicated in the origin of a significant number of events. Among those factors are hyperhomocysteinemia, that we now know to constitute an independent risk factor of cardiovascular morbidity and mortality, and the polymorphisms of the PAI – 1 (plasminogen activator inhibitor 1) and of the angiotensin converting enzyme (ACE), among others.

We present a clinical case of a patient with diabetes *mellitus* type 1 since his ten years of age that suffered an ischemic stroke at 26. She had a history of hypertension and dyslipidemia with several years of evolution. At the time of the stroke she presented macro and microvascular complications of diabetes (bilateral proliferative retinopathy, nephropathy with non nephrotic proteinuria, neuropathy - both motor and sensitive - of the lower limbs, autonomic cardiovascular neuropathy and documented vascular disease of the carotid territory). A month before she had initiated therapy with an insulin infusion pump that permitted for the first time an adequate control of glycaemia and lipids. In her family history there are several precocious thromboembolic episodes, some of them fatal. The genetic study of pro-thrombotic factors revealed the presence of homozigosity for the A1298C mutation of metilenotetrahydrofolate reductase (MTHFR). Confronted by this result we studied the same genetic factors in the patient's sister: she doesn't present alterations of MTHFR, but is homozygote for the PAI (4G/4G) and ACE (D/D) mutations, both associated with an increased cardiovascular risk.

In the context of this clinical case some comments are made on the necessity of acting early and efficaciously over the classical risk factors (diabetes, hypertension, dyslipidemia). The study of this family is also a good example of the importance of prothrombotic genetic factors and their association with classical risk factors. The diagnosis of MTHFR mutation assumes particular relevance, because in these cases pharmacological treatment lowers the risk conferred by the genetic patrimony.

INTRODUÇÃO

A importância de vários factores no condicionamento do risco cardiovascular está hoje bem estabelecida. Vários estudos epidemiológicos demonstraram que a presença de hipertensão arterial, hábitos tabágicos, dislipidemia, obesidade e diabetes *mellitus* conferem um risco de patologia car-

Correspondência:

Miguel Melo

Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo
Hospitais da Universidade de Coimbra
Avenida Bissaya Barreto e Praceta Mota Pinto
3000-075 Coimbra

Tel.: 239400624, Fax. 239

E-mail: jmiguelmelo@mail.telepac.pt

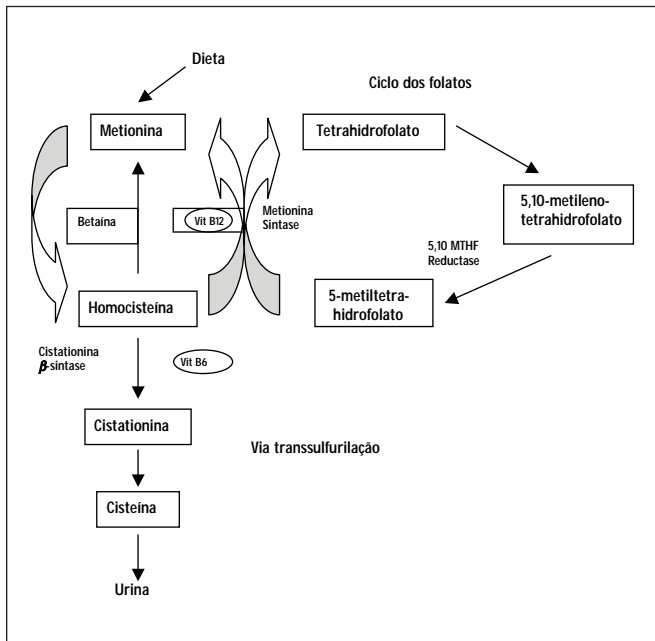


Figura 1 - Metabolismo da homocisteína.

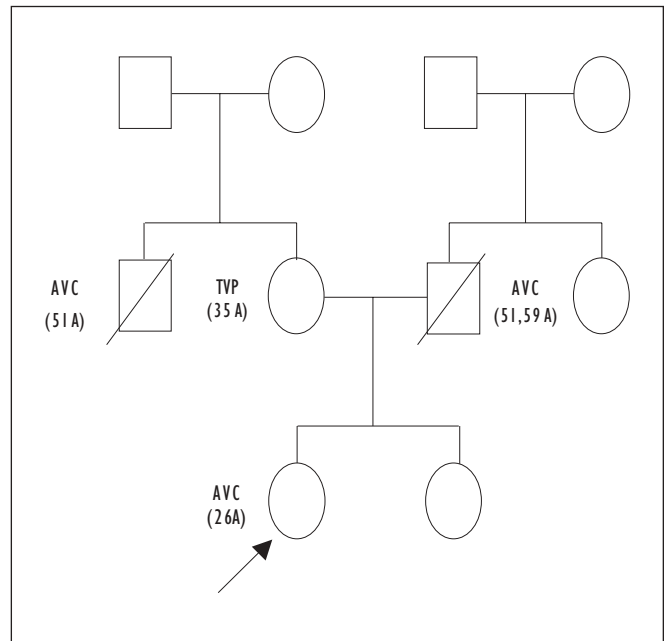


Figura 2 - Heredograma.

diovascular acrescido (1,2); posteriormente, estudos de intervenção reforçaram a sua importância, demonstrando uma redução significativa do risco quando se procedia à sua correção ou melhoria (3). Sabe-se também que a presença de vários destes factores condiciona um aumento exponencial e não um simples aumento aditivo do risco (4). Pela forma aprofundada com que foram estudados nas últimas décadas e pela relevância demonstrada na etiologia da doença aterosclerótica, estes factores de risco são denominados de «clássicos» ou «convencionais». De entre estes factores, a diabetes *mellitus* assume uma importância fulcral,

Quadro I – Evolução dos valores de A1C e dos lípidos séricos do probando após a colocação de bomba infusora de insulina.

	Colocação bomba (1 mês antes do AVC)	Dia do AVC	3 meses após o AVC
A1C (%)	9,7	7,9	6,8
CT (mg/dL)	470	168	162
HDL (mg/dL)	75	33	36
LDL (mg/dL)	301	95	91
TGs (mg/dL)	422	200	173
Terapêutica farmacológica	Lisinopril, indapamida, atorvastatina, ezetimibe, gabapentina, AAS		Lisinopril, indapamida, atorvastatina, ezetimibe, gabapentina, clopidogrel

sabendo-se que o risco de um doente diabético sem doença coronária conhecida é semelhante ao de um doente não diabético com um evento prévio (5).

Apesar disto, a verdade é que o conjunto dos factores de

risco «clássicos» parece ser capaz de prever menos de metade dos eventos cardiovasculares que ocorrem numa determinada população (6). Múltiplos outros factores denominados de «não clássicos» ou «não convencionais» foram descritos nos últimos anos, sendo a evidência da sua relevância ainda escassa nalguns casos. A hiperhomocisteinemia é um dos factores comprovadamente associados a um aumento da morbidade e mortalidade cardiovascular (7). A 5,10 metilenotetrahydrofolato reductase (MTHFR) é uma enzima envolvida no metabolismo da homocisteína e do ácido fólico (Figura 1); a sua menor actividade vai repercutir-se nos níveis de homocisteína e metionina, entre outros. As mutações inactivadoras desta enzima C677T e A1298C demonstraram estar associadas a um aumento do risco de doença coronária e cerebrovascular (8, 9). De uma forma menos consistente, os polimorfismos de deleção (4G) do inibidor-1 do activador do plasminogénico (PAI) e os polimorfismos de deleção (D) da enzima de conversão da angiotensina (ACE) parecem também conferir um risco acrescido (10, 11).

CASO CLÍNICO

O probando desta família (Figura 2) é um indivíduo do sexo feminino que aos 26 anos de idade sofreu um acidente vascular cerebral (AVC) – enfarte lacunar do hemisfério esquerdo – do qual resultou uma hemiparésia direita. Trata-se de uma doente com diabetes *mellitus* tipo 1 diagnosticada aos 10 anos de idade, tratada com múltiplas injeções de insulina desde os 15 anos, sempre com um deficiente controlo metabólico apesar de uma boa adesão aos diferentes esquemas terapêuticos prescritos. Foi sempre normoponderal. À data do AVC estavam já presentes várias complicações macro e micro-vasculares da diabetes – retinopatia proliferativa bilateral, nefropatia com proteinúria não nefrótica e neu-

ropatia sensitivo-motora nos membros inferiores e autonómica cardiovascular. Apresentava também hipertensão arterial e dislipidemia mista com vários anos de evolução, tendo-se a última revelado de difícil controlo; estava medicada com terapêutica farmacológica de associação para ambas as condições (Quadro 1). Cerca de um mês antes do AVC iniciou terapêutica com bomba infusora de insulina, com uma melhoria muito significativa do metabolismo glucídico e lipídico (Quadro 1). Em relação aos antecedentes familiares (Figura 2), são de salientar: no pai, um primeiro AVC aos 45 anos e um segundo AVC aos 59 anos que o vitimou; na mãe, a ocorrência de uma trombose venosa profunda aos 35 anos e a presença de dislipidemia mista; um tio materno faleceu vítima de AVC aos 51 anos. Em nenhum destes familiares havia sido diagnosticada diabetes *mellitus*.

Face à idade jovem da doente e à existência dos antecedentes familiares referidos, procedeu-se ao estudo genético dos factores pró-trombóticos enumerados no Quadro II.

Quadro II – Genótipos do probando e da irmã relativamente aos factores protrombóticos estudados (N – normal; Ht – heterozigoto; HR – homozigoto recessivo).

	Probando	Irmã
Factor V Leiden	Arg/Arg (N)	Arg/Arg (N)
Factor V H1299R	H1299H (N)	H1299H (N)
Protrombina G20210A	G20210G (N)	G20210G (N)
MTHFR C677T	Ala/Val (Ht)	Ala/Val (Ht)
MTHFR A1298C	A1298C (HR)	A1298A (N)
PAI1 4G/5G	4G/5G (Ht)	4G/4G (HR)
Fibrinogénio G/A-455	G/A 455 (Ht)	G/A 455 (Ht)
Glicoproteínas GP3A	PIA1/PIA1 (N)	PIA1/PIA1 (N)
ACE I/D	I/D (Ht)	D/D (HR)
Apo E 2, 3, 4	E2, E3	E2, E3
Apo B R3500Q	R3500R (N)	R3500R (N)
Factor XIII V34L	V34V (N)	V34V (N)

Constatou-se a presença em homozigotia da mutação A1298C da MTHFR, associada a hiperhomocisteinemia; o valor da homocisteinemia em jejum era de 15,4 mmol/L. A doente era também portadora do polimorfismo de deleção 4G do PAI1 e do polimorfismo de deleção (D) da ACE.

Perante estes resultados e uma vez que se trata de uma condição autossómica recessiva, a irmã da doente foi informada do eventual risco de também ser afectada (25%) e da possibilidade de confirmar ou excluir este risco através do mesmo estudo genético. Este foi subsequentemente realizado por vontade da mesma e revelou a existência de dois alelos normais da MTHFR, mas a presença em homozigotia dos polimorfismos 4G/4G do PAI1 e D/D da ACE. De referir que apresentava também dislipidemia mista que motivou intervenção farmacológica.

DISCUSSÃO E COMENTÁRIOS

O estudo desta família é um bom exemplo do aumento exponencial do risco conferido pelo efeito aditivo dos vários factores envolvidos.

No que diz respeito aos factores de risco convencionais, a diabetes *mellitus* assume certamente um papel fulcral. Esta doente apresentava uma doença com cerca de quinze anos de evolução, sempre com deficiente controlo metabólico e já com repercussões macro e microvasculares conhecidas. Embora o papel do controlo glicémico na prevenção da doença macrovascular não seja tão relevante como na prevenção da doença microvascular, vários estudos demonstraram uma associação independente entre os valores médios da glicemia, reflectidos na determinação periódica de A1C, e a ocorrência de eventos coronários e cerebrovasculares (12). Apenas um mês antes da ocorrência do AVC foi possível um adequado controlo glicémico, através da utilização de uma bomba infusora de insulina. Este caso reflecte bem os benefícios que alguns doentes podem ter com o recurso a este tipo de terapêutica.

Relativamente à hipertensão arterial, a doente apresentou desde o diagnóstico valores próximos dos objectivos terapêuticos, tendo no entanto sido necessário recorrer ao tratamento farmacológico de associação (lisinopril e indapamida). Já os valores dos lipídios séricos permaneceram sempre claramente acima do desejado apesar das várias estratégias terapêuticas específicas utilizadas, que incluíram a associação de uma estatina a um fibrato e, posteriormente, a associação de uma estatina com o inibidor da absorção do colesterol ezetimibe. Apenas com o início da terapêutica com bomba infusora de insulina e simultaneamente com a melhoria do controlo glicémico, foi possível obter valores de triglicéridos, colesterol total e lipoproteínas séricas dentro dos objectivos.

A hiperhomocisteinemia é hoje reconhecida como um factor de risco independente de morbilidade e mortalidade cardiovascular. Apesar disto, a amplitude de normalidade ainda não está consensualmente definida (13). O NHANES III (National Health and Nutrition Examination Survey) propõe 11,4 mmol/l no homem e 10,4 mmol/l na mulher como limite superior (percentil 95). Dados epidemiológicos sugerem que o risco aumenta progressivamente com os níveis de homocisteína, duplicando por volta dos 12mmol/l (7). A MTHFR é uma enzima que catalisa a redução do 5,10-metilenotetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, sendo este último o dador do grupo metil para a conversão de homocisteína em metionina (Figura 1). Deste modo, a consequência imediata a nível metabólico da inactividade da MTHFR é o aumento dos níveis de homocisteína plasmática total e a diminuição dos níveis de metionina. Uma vez que o bloqueio não resulta no aprisionamento de ácido fólico na forma de metileno-tetrahidrofolato, não há interferência com a disponibilidade de folatos reduzidos para a síntese de bases púricas e pirimídicas (14). Isto explica porque estes doentes não têm anemia megaloblástica. O défice de actividade da MTHFR é herdado como uma condição autossómica recessiva, situando-se o gene que a codifica no cromossoma 1p36. A ausência total de actividade da enzima manifesta-se na infância por uma encefalopatia progressiva que conduz à morte em idade jovem. Indivíduos com mutações das quais resultem enzimas com actividade intermédia não vão ter manifestações neu-

rológicas, sendo identificados geralmente pela ocorrência de eventos cardiovasculares em idade precoce. É este o caso das mutações C677T e A1298C; ambas codificam uma enzima termolábil e com actividade diminuída. No caso da primeira, a sua associação com risco aumentado de doença coronária e vascular cerebral está já bem documentada (13, 15). A segunda, descrita mais recentemente, está associada a um risco comprovadamente aumentado quando associada com a primeira na forma de heterozigotia composta, não tendo ainda sido publicado um estudo que aborde especificamente o seu papel independente na determinação do risco. No entanto, uma vez que ambas codificam enzimas com actividades «in vitro» semelhantes, será de prever que o seu papel será idêntico ao da mutação C677T. O diagnóstico destas condições assume particular relevância uma vez que se trata de um dos poucos exemplos em que o risco conferido por um factor genético pode ser anulado com sucesso através de uma intervenção farmacológica simples e económica – a administração de ácido fólico em doses iguais ou superiores a 1 mg/dia (7).

A coexistência de mais este factor no probando, juntamente com uma dieta não suplementada em ácido fólico, poderá ter contribuído para o aumento exponencial do risco e subsequente desenvolvimento de doença aterosclerótica clínica em idade jovem. De referir que sendo a irmã homozigota normal para este gene, os pais serão à partida heterozigotos e logo não afectados, pelo que os eventos que sofreram não poderão ser atribuídos à existência deste polimorfismo. O tio materno falecido poderia ser homozigoto afectado.

Vários estudos demonstraram uma relação entre níveis elevados do PAI e risco aumentado de fenómenos tromboembólicos (16, 17). A posterior identificação do gene do PAI1 no cromossoma 7q21 e sua sequenciação veio possibilitar o reconhecimento de mutações deste gene. É o caso do polimorfismo de deleção 4G, que abrange o promotor do gene; o alelo 4G liga apenas um activador e não um activador e um repressor como o alelo normal 5G, resultando na sobre-expressão do gene PAI1. Alguns trabalhos demonstraram uma associação entre este polimorfismo e risco acrescido de enfarte agudo do miocárdio (10) e de aneurisma da aorta abdominal (18). Aguardam-se estudos que incluam um maior número de doentes e que sejam desenhados especificamente para comprovar a relevância deste polimorfismo.

A enzima de conversão da angiotensina desempenha um papel chave na modulação do tónus vascular e na proliferação de células musculares lisas, através da produção de angiotensina II e da degradação de bradicinina. Em 1988 encontrou-se um defeito genético que parecia ser responsável por 50% da variabilidade inter-individual da actividade da enzima (19). A posterior clonagem do gene permitiu a identificação deste polimorfismo como a inserção de 250 pares de bases no exão 16, tendo sido denominado «polimorfismo de inserção/deleção». A homozigotia DD, com uma frequência estimada na população de 0,27, demonstrou estar associada a doença coronária, tendo mesmo sido proposto que poderia ser responsável por até 35% dos

casos de enfarte agudo do miocárdio em doentes sem outros factores de risco (20). Especula-se também que este poderá ser um dos mecanismos responsáveis pela protecção conferida pelos inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA) não apenas para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca após enfarte agudo do miocárdio, mas também para a ocorrência de novos episódios isquémicos. Mais recentemente, uma meta-análise encontrou uma associação significativa entre o genótipo DD e o AVC isquémico (OR=1,21) (21).

A existência em simultâneo de dislipidemia juntamente com estes dois factores de risco genético confere um risco aumentado mas difícil de quantificar à irmã da doente. Isto obriga a uma vigilância regular e ao tratamento rigoroso da dislipidemia e de outros factores de risco convencionais que entretanto venha a apresentar. Neste caso, não existe qualquer medida que comprovadamente reduza o risco conferido pelo património genético. A existência de heterozigotia para estes genes no probando levanta a possibilidade de homozigotia para a mutação num dos progenitores; os polimorfismos do PAI e ACE poderão eventualmente ser responsáveis por uma parte significativa dos eventos cardiovasculares ocorridos em gerações sucessivas nesta família.

CONCLUSÃO

O estudo desta família é um bom exemplo da importância dos factores pró-aterogénicos de origem genética e da sua associação com os factores de risco denominados «clássicos». À medida que o conhecimento sobre a etiopatogenia molecular da doença aterosclerótica avança, os factores genéticos têm assumido uma importância crescente na explicação dos cerca de 50% de eventos cardiovasculares não explicados pelos factores «convencionais».

De entre os factores genéticos, o diagnóstico da mutação da MTHFR assume particular relevância, uma vez que uma intervenção farmacológica simples e económica – a administração de ácido fólico – permite nestes casos diminuir o risco conferido pelo património genético.

O probando desta família realça a necessidade de uma intervenção sobre os principais factores de risco clássicos (diabetes, hipertensão, dislipidemia) não só incisiva como também precoce, pois sendo a doença aterosclerótica um contínuo, uma intervenção demasiado tardia poderá não ser suficiente para prevenir eventos *major*, mesmo em doentes jovens.

BIBLIOGRAFIA

1. Gordon T, Kannel WB. Predisposition to atherosclerosis in the head, heart, and legs: the Framingham Study. *JAMA* 1972;221:661-66.
2. Genest JJ, McNamara JR, Salem DN, Schafer EJ. Prevalence of risk factors in men with premature coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1991; 67: 1185-89.
3. Ebrahim S, Smith GD. Systematic review of randomised controlled trials of multiple risk factor interventions for preventing coronary heart disease. *BMJ*. 1997 Jun 7; 314(7095):1666-74.
4. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk

- factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 1993; 16: 434-444.
5. Haffner S. M., Lehto S., Rönnemaa T., Pyörälä K., Laakso M. Mortality from Coronary Heart Disease in Subjects with Type 2 Diabetes and in Nondiabetic Subjects with and without Prior Myocardial Infarction. *N Engl J Med* 1998; 339:229-234
 6. Coveny P, Highfield R. *Frontiers of Complexity*. New York: Baltimore Books; 1995.
 7. Graham IM, O'Callaghan P. The role of folic acid in the prevention of cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*. 2000 Dec; 11(6):577-87
 8. Morita H, Taguchi J, Kurihara H, Kitaoka M, Kaneda H, Kurihara Y, Maemura K, Shindo T, Minamino T, Ohno M, Yamaoki K, Ogasawara K, Aizawa T, Suzuki S, Yazaki Y. Genetic polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a risk factor for coronary artery disease. *Circulation*. 1997 Apr 15; 95(8):2032-6.
 9. Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG; MTHFR Studies Collaboration Group. MTHFR 677C-->T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA*. 2002 Oct 23-30; 288(16): 2023-31.
 10. Pastinen T, Perola M, Niini P, Terwilliger J, Salomaa V, Vartiainen E, Peltonen L, Syvanen AC. Array-based multiplex analysis of candidate genes reveals two independent and additive genetic risk factors for myocardial infarction in the Finnish population. *Hum Mol Genet* 1998;7: 1453-1462.
 11. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Ricard S, et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992; 359:641
 12. Selvin E, Marinopoulos S, Berkenblit G, Rami T, Brancati FL, Powe NR, Golden SH: Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 141:421-431, 2004
 13. Kelly PJ, Rosand J, Kistler JP, Shih VE, Silveira S, Plomaritoglou A, Furie KL. Homocysteine, MTHFR 677C/AET polymorphism, and risk of ischemic stroke: results of a meta-analysis. *Neurology*. 2002 Aug 27; 59(4): 529-36.
 14. Rosenblatt DS, *Methylenetetrahydrofolate Reductase Deficiency*, in «Inborn Metabolic Diseases – Diagnosis and Treatment», Springer Verlag, 3rd Ed, 2000; 294-296.
 15. Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG; MTHFR Studies Collaboration Group. MTHFR 677C-->T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA*. 2002 Oct 23-30; 288(16): 2023-31.
 16. Nilsson I, Ljungner H, Tengborn L: Two different mechanisms in patients with venous thrombosis and defective fibrinolysis: low concentration of plasminogen activator or increased concentrations of the plasminogen activator inhibitor. *Brit Med J* 290: 1453-1456, 1985.
 17. Nilsson I, Tengborn L: Impaired fibrinolysis: new evidence in relation to thrombosis. In: Jesperden J, Klufft C, Korsgaard O: *Clinical aspects of fibrinolysis and thrombosis*. Esbjerg: South Jutland Univ. Press 1983. Pp 273-291
 18. Rossaak JJ, Van Rij AM, Jones GT, Harris EL. Association of the 4G/5G polymorphism in the promoter region of plasminogen activator inhibitor-1 with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 2000 May;31(5):1026-32.
 19. Cambien F, Alhenc-Gelas F, Herbeth B, Andre JL, Rakotovao R, Gonzales MF, Allegrini J, Bloch C. Familial resemblance of plasma angiotensin-converting enzyme level: the Nancy Study. *Am J Hum Genet*. 1988 Nov;43(5):774-80.
 20. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Ricard S, et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992 Oct 15;359(6396):641-4.
 21. Casas JP, Hingorani AD, Bautista LE, Sharma P. Meta-analysis of genetic studies in ischemic stroke: thirty-two genes involving approximately 18,000 cases and 58,000 controls. *Arch Neurol*. 2004 Nov; 61(11):1652-6.

