

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Evolução temporal da função renal entre pacientes criticamente doentes: papel dos polimorfismos I/D e -262A>T do gene da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)**

**PÓS GRADUANDO: JOSÉ ALBERTO RODRIGUES PEDROSO, MD**

**ORIENTADORA.: CLARICE S. ALHO, MSc., PHD.**

PORTO ALEGRE / RS - AGOSTO- 2006

**Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Biociências  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Evolução temporal da função renal entre pacientes criticamente doentes: papel dos polimorfismos I/D e -262A>T do gene da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)**

Dissertação que foi desenvolvida como pré-requisito  
para obtenção de Título de Mestre em  
Biologia Celular e Molecular pelo PPGBCM-PUCRS

**José Alberto Rodrigues Pedroso  
Orientadora: Clarice Sampaio Alho**

**Porto Alegre, RS  
Agosto / 2006**

## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	1
RESUMO	2
REVISÃO DA LITERATURA SOBRE O TEMA ESTUDADO	3
INTRODUÇÃO	3
SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA	4
O GENE ECA	4
O EFEITO DA INSERÇÃO <i>Alu</i> NO INTRON 16: O POLIMORFISMO I/D	6
OUTROS POLIMORFISMOS NO GENE ECA	7
O POLIMORFISMO -262A>T	8
O GENE DA ECA NA PRÁTICA MÉDICA	9
CONSIDERAÇÕES FINAIS	11
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	13
MANUSCRITO COM OS RESULTADOS DO TRABALHO EXPERIMENTAL	19
Title of The Paper	19
Abstract	21
Introduction	22
Subjects and Methods	23
Results	28
Discussion	30
Conclusions	32
Aknowledgement	33
References	33
Table 1	38
Table 2	39
Table 3	40
Figure 1	41
Figure 2	42
Figure 3	43
Figure 4	44
CONSIDERAÇÕES FINAIS	45

## **Apresentação**

Ainda que a origem do homem moderno tenha uma linha evolutiva única, há uma ampla diversidade genética entre as populações humanas. Estas foram condicionadas, ao longo dos anos, pelas interações ambientais que ajustaram, a cada geração, os grupos de indivíduos às pressões do meio. As mais particulares características no reservatório de genes, obtidas em decorrência do processo evolutivo, fazem com que varie amplamente toda e qualquer associação entre manifestações fenotípicas e marcadores genéticos, dependendo da população humana em questão.

O papel do gene da Enzima Conversora da Angiotensina (ECA) vem sendo amplamente discutido, principalmente por sua influência nos mecanismos de regulação pressórica vascular. Diversas evidências são apresentadas na literatura, correlacionando-o a diversas patologias, sendo área de interesse médico crescente a ocorrência específica de alterações nefrológicas, por interferirem na homeostase corporal e produzirem comprometimento hemodinâmico.

Um considerável número de polimorfismos deste gene vem sendo estudado. Há particular interesse num polimorfismo intrônico, o I/D, o qual está presente em praticamente todos os trabalhos da área médica que tentam estabelecer correlação entre genótipos da ECA e desfechos clínicos de morbi-mortalidade.

Outros, com bem menos investigações conduzidas, despertam o interesse por sua situação gênica peculiar, como é o caso do polimorfismo -262A>T. Localizado em uma região promotora, seu papel ainda é controverso, com resultados às vezes contraditórios quanto à sua influência.

O objetivo desta Dissertação de Mestrado foi conduzir uma análise da frequência destes dois polimorfismos do gene da ECA entre pacientes criticamente doentes, internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Buscou-se identificar se seus genótipos interferem de alguma maneira na evolução da função renal durante a primeira semana de sua internação em UTI.

## Resumo

A disfunção de múltiplos órgãos e a Insuficiência renal aguda compartilham muitos dos fatores fisiopatológicos envolvidos na sua instalação. Estudos recentes correlacionam a herança genética com a suscetibilidade à disfunção de órgãos entre pacientes criticamente doentes. Muitos consideram que o gene da ECA poderia ser um potencial candidato a fator de risco genético em pacientes de UTI. Em nosso estudo, examinamos os efeitos dos polimorfismos I/D e -262A>T do gene da ECA na função renal em pacientes criticamente doentes de uma UTI do sul do Brasil. Um escore de disfunção multiorgânico mundialmente reconhecido, o SOFA (avaliação seqüencial da disfunção do órgão), foi empregado para determinar o estado basal da saúde no primeiro dia de admissão à UTI. Considerando o escore SOFA da admissão e a tendência da função renal (através do escore diário do SOFA renal, determinado pela medida diária da creatinina sérica e da diurese), nós consideramos a hipótese de que os polimorfismos I/D e -262A>T do gene ECA poderiam influenciar na tendência da função renal em pacientes de ICU. Um total de 153 pacientes adultos, criticamente doentes (79 homens e 77 mulheres), foi incluído neste estudo. Nós monitoramos os pacientes diariamente durante sua permanência na UTI e hospitalar (período máximo de observação de 224 dias). Foi observada a progressão à disfunção renal (valores 3 e 4 de escores SOFA) nos primeiros sete dias da internação em UTI e a necessidade de diálise durante este período. As freqüências genotípicas totais em nossa amostra foram II=0.17; ID=0.46; DD=0.37 e AA=0.30; AT=0.55; TT=0.15, e as freqüências alélicas foram I=0.40; D=0.60 e A=0.56; T=0.44. Este é o primeiro estudo delineado para verificar a influência de polimorfismos I/D e -262A>T do gene ECA na disfunção renal aguda entre pacientes de UTI. Nenhuma associação significativa foi encontrada entre a evolução da função renal durante a primeira semana de internação na UTI e os genótipos ou freqüências alélicas dos polimorfismos em questão. Os polimorfismos I/D e -262A>T não apresentaram nenhum impacto significativo na tendência da função renal durante a primeira semana de internação na UTI, igualmente, não houve influência da herança genética sobre a mortalidade nos pacientes criticamente doentes estudados.

## Revisão da Literatura Sobre o Tema Estudado

### INTRODUÇÃO

Na evolução do *Homo sapiens*, independentemente da razão ou origem pela qual se observa diferenciação genética entre as populações existentes na atualidade, importa é considerar, para o estudo médico, que unidos aos genes que conferem o fenótipo característico de cada um dos grupos populacionais, podem estar outros genes que determinam suscetibilidades ou fragilidades fisiológicas (**Collins & McKusick, 2001**).

Os cromossomos humanos e os locos das diferentes populações variam a natureza e as frequências dos diferentes alelos entre os subgrupos populacionais. Algumas variações são virtualmente restritas a um grupo, ainda que não estejam necessariamente presentes em todos os membros do grupo. Existem diferenças acentuadas de frequências alélicas entre grupos populacionais, tanto para alelos que causam doenças genéticas quanto para marcadores genéticos aparentemente neutros em termos seletivos (**Cavalli-Sforza, 1998; Wang et al., 1998; Collins & McKusick, 2001**).

A seqüência de bases do DNA humano está sujeita às mais variadas mutações, rearranjos e/ou reorganizações gênicas, as quais são responsáveis pelas particularidades individuais. O alelo mutado que conferir maior vantagem adaptativa ao indivíduo que o portar será selecionado positivamente, ou seja, a persistência de um alelo mutado como provedor de variabilidade dentro do genoma de uma espécie está sujeita à resposta deste às pressões seletivas. Assim, variantes alélicas polimórficas serão mantidas na população de forma diferencial dependente da repercussão que a mesma venha a ter no fenótipo.

A manutenção do alelo mutante entre os indivíduos de uma população vai depender, portanto, da sua capacidade de expressividade e de penetrância, observadas pelo valor adaptativo que o mesmo confere ao indivíduo que o porta. Alelos polimórficos, que permaneceram no genoma ao longo da evolução da espécie, são existentes entre populações atuais por não haverem apresentado valores adaptativos extremamente baixos no passado (**Carroll, 2003**). Mutações polimórficas podem ser tão deletérias que tornem inviável a vida do indivíduo. No entanto, uma característica genética que não cause letalidade pode apresentar um efeito inicialmente “neutro”, sendo mantida ao longo das gerações sem expressão fenotípica. Num momento evolutivo posterior, porém, tais características podem passar a ter alto ou baixo valor adaptativo (ou mesmo ainda “neutro”) aos detentores desta herança (**Akashi, 1999**).

Os avanços tecnológicos médico-sanitários reduziram a prevalência das doenças infecto-contagiosas que antes representavam a causa primária da mortalidade humana e da reduzida expectativa de vida da população. A atual longevidade humana está, portanto, conferindo o tempo necessário para que o fenótipo decorrente de alguns genes seja manifestado. A expressividade de tais genes, que teria sido inócua no passado recente, agora passa a ser relevante por associar-se às morbidades e disfunções fisiológicas

crônico-degenerativas. A fragilidade diferencial na saúde do ser humano esta, portanto, relacionada à manifestação dos genes que conferem efeitos deletérios (**Partridge, 1997**).

### **SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA**

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um sistema endócrino clássico, que tem sido descrito com detalhes desde a descoberta dos efeitos pressóricos da renina por Tiegerstedts & Bergman no final século XIX (**Hollenberg et al, 1998; Inagami, 1998; Sibinga & Ware, 2000**). Embora seja conhecida sua atividade sistêmica, têm sido identificados SRAs completos em órgãos e tecidos específicos, funcionando como um sistema autócrino/intócrino ou parácrino (**De Mello & Danser, 2000**).

Uma importante componente do SRA é a Enzima Conversora da Angiotensina (ECA; EC 3.4.15.1), uma metalopeptidase zinco-dependente cuja principal função é a conversão da angiotensina I em angiotensina II (um peptídeo vasoativo e estimulador da secreção de aldosterona) e a inativação de bradicinina (**Erdos & Skidgel, 1987**). A ECA é responsável pela remoção de dois resíduos C-terminais da angiotensina I (histidina e leucina), produzindo o octapeptídeo vasoconstritor angiotensina II (**Sibinga & Ware, 2000; Bernstein, 2002**). A maioria da atividade enzimática da ECA está relacionada com membranas celulares, estando ancorada à membrana plasmática através de um domínio hidrofóbico próximo à extremidade C-terminal (**Hooper et al., 1987**), sendo encontrada no endotélio dos vasos sanguíneos e também em outros órgãos, como pulmões, rins, intestino, cérebro, coração e glândulas adrenais (**Niu et al., 2002**). A ECA apresenta um papel crítico no sistema renina-angiotensina na regulação de volume de fluidos intravasculares, resistência vascular e pressão arterial (**Kim & Iwao, 2000**).

O conhecimento crescente sobre os mecanismos do SRA vem permitindo o manejo terapêutico de condições clínicas (com redução do efeito deletério da vasoconstrição sobre o coração e os rins) de patologias como hipertensão e insuficiência cardíaca congestiva, bem como emprego no manejo clínico pós-infarto miocárdico (**Sowers et al, 2001; Jafar et al, 2003**). Estudos fisiológicos, farmacológicos e genéticos demonstram a importância da ECA quanto ao seu efeito nas doenças cardiovasculares, definindo um interesse crescente na compreensão dos mecanismos moleculares que determinam os níveis séricos da ECA em humanos (**Keavney et al., 1998**).

### **O GENE ECA**

O gene da ECA encontra-se localizado no locus 17q23 e contém 26 exons (**Niu et al., 2002**). A estrutura do gene humano da ECA sugere ter havido uma duplicação a partir de um gene da ECA ancestral. Os exons codificam dois domínios homólogos da molécula da ECA, altamente similares em tamanho e seqüência (**Niu et al., 2002**) que indicariam um evento evolutivo de duplicação que poderia ter ocorrido há

mais de 600 milhões de anos (**Hubert et al., 1991**). A expressão do gene da ECA é tecido-dependente, sendo identificadas duas isoformas principais, uma somática (sACE) e outra testicular (tACE). Tais isoformas são devidas ao emprego de promotores alternativos ou splicing diferencial (**Steiner et al., 1987; Kumar et al., 1991; Niu et al., 2002**).

A isoforma somática é codificada pelo gene completo, compreendendo 1306 aminoácidos, transcrita a partir dos exons 1 a 26 - com exceção do 13, removido por splicing. Compreende duas regiões homólogas (exons 1-12, 14-26), contendo dois domínios catalíticos, nas porções amino- e carboxi-, cada qual com o mesmo motivo ligado ao zinco (**Valee et al., 1990**), altamente conservado entre diferentes espécies (**Niu et al., 2002**).

A isoforma testicular da ECA é controlada por um promotor de 91bp, presente no intron 12, coordenando a expressão do exon 13 (específico da isoforma tACE) e da segunda metade do gene (exons 14-26) (**Howard et al., 1993; Bernstein et al., 1989; Hubert et al., 1991; Liao & Roy, 2002**). A proteína da tACE tem um único domínio catalítico N-terminal (**Niu et al., 2002**), determinado pelo exon testículo-específico, enquanto que a sequência remanescente é idêntica ao domínio C-terminal da sACE. (Ehlers et al., 1989; Kumar et al., 1989; Lattion et al., 1989). Evidenciou-se papel importante desta isoforma na fertilidade de ratos machos (**Krege et al., 1995**).

Em 1990 foi descrito o polimorfismo mais conhecido deste gene (**Rigat et al., 1990**), que consiste na presença (alelo I) ou ausência (alelo D) de um fragmento *Alu* de 287 pb próximo à extremidade 3' do intron 16. Essa variação polimórfica produz três possíveis genótipos: II, ID e DD. O polimorfismo I/D da ECA está associado a 47% da variabilidade fenotípica das concentrações da ECA sérica, sendo as concentrações mais elevadas associadas à presença do alelo D (**Rigat et al., 1990**). Além dessa variação, outras mutações polimórficas foram detectadas no gene ECA (**Doria et al., 1994; Villard et al 1996; Keavney et al, 1998; Zhu et al, 2000; Zhu et al, 2001**), porém os estudos populacionais e os diferentes efeitos na modulação vascular dependente da ECA de tais variações genéticas ainda são menos conhecidos quando comparados aos do polimorfismo I/D (**Baudin, 2000; Rupert et al, 2003**).

Um dos objetivos das pesquisas biomédicas é desenvolver a capacidade de prover cuidados em saúde altamente personalizados. Para tanto, é necessário compreender a distribuição da variação genética interindividual dos locos responsáveis por características físicas, suscetibilidade a doenças e resposta ao tratamento. Variações nestes locos comumente exibem uma estruturação relacionada à origem geográfica e podem contribuir em diferenças fenotípicas entre grupos populacionais. Os polimorfismos de inserção *Alu*, como é o caso do polimorfismo I/D, têm importância no estudo genético de populações humanas graças à herança diferencial. Por exemplo, a avaliação simultânea de pelo menos 60 tipos de seqüências *Alu* permite determinar, com uma acurácia mínima de 90%, a identificação correta do continente de origem étnica de um



indivíduo (África, Ásia ou Europa). A acurácia pode chegar a mais de 99% quando estudados mais de 100 polimorfismos *Alu* (**Bamshad et al., 2003**).

As seqüências *Alu* são os mais abundantes elementos móveis do genoma humano, compreendendo mais de 10% deste (**International Human Genome Sequencing Consortium, 2001**). Não estão uniformemente distribuídas no genoma humano, acumulando-se preferencialmente em regiões ricas em genes, podendo influenciar a regulação da expressão gênica (**Korenberg & Rykowski, 1988; Chen et al., 2002**).

A origem e amplificação destes elementos são eventos evolutivamente recentes, coincidentes com a divisão dos primatas há mais de 65 milhões de anos. Assim, dado que não há evidência de que exista qualquer tipo de processo que remova especificamente elementos *Alu* do genoma, o estado ancestral do polimorfismo de inserção *Alu* é aquele em que o elemento está ausente em determinado local genômico. As seqüências *Alu* replicam-se e a cópia resultante insere-se aleatoriamente em uma nova posição no genoma. (**Batzer & Deininger, 2002**). Cada nova inserção é um evento único. Indivíduos que compartilham estes elementos herdaram-nos de um ancestral comum. Alguns elementos *Alu* produzem eventos deletérios (mutações), não sendo transmitidos à sua descendência. Em sua maioria, porém, os elementos móveis foram inseridos no ancestral em regiões gênicas, mantendo-se preservados, às vezes modificados por seleção, e agora afetando o controle da transcrição de um gene adjacente (**Britten, 1996; Batzer & Deininger, 2002**).

### O EFEITO DA INSERÇÃO *Alu* NO INTRON 16: O POLIMORFISMO I/D

Dado que a inserção *Alu* (alelo I) tenha ocorrido dentro de um segmento intrônico do gene da ECA, para que o polimorfismo I/D tenha repercussão na expressão do produto final (enzima), ao menos algumas situações que teriam plausibilidade biológica:

(I). Considerando que ela seja uma mutação silenciosa (por ser intrônica), sua repercussão fenotípica ocorreria por supostamente estar a inserção ligada a uma outra mutação, esta sim afetando a expressão final do gene. Em praticamente todas as populações humanas estudadas, o alelo I está presente numa frequência elevada, superior a 0,3 (**Samani et al., 1996**), o que permite inferir que a presença deste alelo foi compatível com a adaptação dos indivíduos portadores do mesmo, nos últimos milhares de anos. Da mesma forma como as inserções da família *Alu* se propagaram, ao longo da evolução (**Batzer & Deininger, 2002; Dewannieux et al, 2003**), dentro do genoma humano, outras centenas de milhares de mutações também alteraram o genoma nos mais variados locais, e com as mais diversas repercussões fenotípicas. As associações relatadas entre a herança do alelo D e os processos vasopressórios patológicos poderia ser entendida, portanto, se assumirmos que a inserção *Alu* está em desequilíbrio de ligação com uma outra mutação que seria a verdadeira responsável pela alteração da atividade da ECA. Dessa forma, o polimorfismo I/D passa a ser apenas marcador da característica genética realmente determinante e as variações encontradas entre as

diferentes populações humanas dependeria da extensão do desequilíbrio de ligação entre as duas mutações polimórficas.

(II). A inserção *Alu* pode ter alterado o mecanismo de *splicing*, afetando, pelo menos em parte, a maquinaria de transcrição da ECA, ou ainda apresentar um papel regulador da expressão do gene ECA ou algum outro a ele relacionado. A manutenção dos segmentos intrônicos é um forte indicativo de sua importância evolutiva. Assim, regiões não codificadoras do genoma têm se mantido quase que intactas durante milhões de anos devido à relevância do papel por elas desempenhado, por ora desconhecidos. Essas extensas regiões não codificadoras contêm uma coleção de outras unidades de transcrição, cujos RNAs podem estar interferindo na química celular (**Mattick, 2003 (1); Mattick, 2003 (2); Yelin et al., 2003**).

(III). No que se refere ao controle pós-transcricional, foram descritos segmentos intrônicos que transcrevem para microRNAs, os quais são segmentos que formam estruturas RNA fita-dupla (em grampos) após transcritos, que interferem silenciando genes ou reduzindo a taxa de tradução de alguns mRNAs, mecanismo conhecido como de RNA de interferência (**Fire, 1998; Hannon, 2002; McManus et al., 2002**). Experimentalmente, a construção de transgenes com inserções intrônicas sense ou anti-sense parece aumentar o efeito de silenciamento pós transcricional, uma vez que o processo de excisão intrônica por spliceossomas poderia ajudar no alinhamento dos braços complementares do grampo de RNAi, favorecendo sua hibridização (**Smith et al., 2000**).

As porções genômicas não codificadoras (até então pouco exploradas) podem, portanto, interferir na transmissão da informação e, conseqüentemente, no fenótipo final. No entanto, estudos realizados até o momento não demonstraram associação entre expressão de mRNA da ECA e o polimorfismo I/D (**Tamaki et al, 1997; Spruth et al, 1999**).

## **OUTROS POLIMORFISMOS NO GENE ECA**

A suscetibilidade às doenças complexas depende da expressão de poucos ou muitos *loci* gênicos (respectivamente, oligogenia ou poligenia), agindo de forma quantitativa e modulados pelos fatores ambientais. Os *loci* subjacentes aos caracteres quantitativos, denominados *loci* de traços quantitativos ou QTL, são considerados também importantes uma vez podem se relacionar com a mesma suscetibilidade. A análise de polimorfismos múltiplos em um gene candidato, portanto, é definitiva para a detecção do grau contribuição de cada uma das variantes polimórficas à suscetibilidade (**Keavney et al., 1998**). Análises de ligação e segregação mostram que os níveis de ECA sérica são influenciados por um número limitado de QTL, mapeados dentro ou próximo do gene da ECA. Múltiplas variantes que encontram-se em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo I/D foram descritas, mas se desconhece até que ponto cada uma delas está diretamente implicada, isoladamente ou em combinação com outras variantes ainda não descobertas, na determinação dos níveis de ECA (**Keavney et al., 1998**).

**Villard et al. (1996)** propôs duas variantes que influenciariam os níveis de ECA circulante. Uma delas estaria em completo desequilíbrio de ligação, ou seja, fortemente ligada ao polimorfismo I/D, e a segunda mapeada *upstream* a partir do ponto de início de tradução do gene da ECA, o polimorfismo 4656(CT)2/3.

**Keavney et al. (1998)** estudaram 555 membros de 83 famílias caucasianas para 10 polimorfismos bialélicos distribuídos ao longo de 26 kb do gene ECA e verificaram um forte desequilíbrio de ligação operando nesta região do cromossomo 16. Três clados com relações filogenéticas foram determinados e excluindo-se seqüências *upstream* ao gene ECA, a herança dos haplótipos explicou 36% da variação fenotípica total da ECA. A variação residual poderia ser, pelo menos em parte, explicada pela ação de genes não ligados ao *locus* ECA.

**Zhu et al. (2001)** genotiparam 13 polimorfismos do gene ECA em 1343 nigerianos de 332 famílias. Seis polimorfismos (incluindo o I/D) foram significativamente associados com a concentração de ECA. Dois polimorfismos de troca simples de nucleotídeo (SNP) foram mais fortemente associados à concentração da ECA: a transversão -262A>T na região 5'UTR, e a transição A11860G no exon 17, responsáveis isoladamente por 6% e 19% da variância total da atividade da ECA, respectivamente. Demonstraram também que quanto mais distantes de -262A>T e A11860G, maior seria o poder de predição fenotípica das demais variantes polimórficas. **Zhu et al.** sugerem que -262A>T e A11860G não sejam em si mesmas mutações funcionais, mas que estejam em desequilíbrio de ligação com variantes funcionais. Os dois polimorfismos em questão apresentaram associação estatisticamente significativa com a pressão arterial sistólica na população de Africanos estudada. No que se refere à pressão diastólica, o incremento nos níveis pressóricos foi diretamente proporcional ao número de cópias do alelo T do primeiro polimorfismo. Os autores apontam o achado (não explicado pelo estudo) de que os alelos do polimorfismo -262A>T apresentaram efeito oposto no que se refere à concentração de ECA sérica e Pressão arterial: o alelo T foi associado com uma redução na concentração de ECA sérico, mas no entanto relacionado a um aumento na Pressão arterial. Estes resultados são controversos, pois em outros estudos, em população diversa (caucasóides), o alelo A foi o que associou-se a níveis mais baixos de ECA sérica (**Villard et al., 1996; Keavney et al., 1998**). Para o polimorfismo A11860G, os resultados de **Zhu et al. (2001)** foram consoantes havendo associação entre alelo G e maior atividade ECA e elevados níveis tensionais. No entanto, por se tratar de um polimorfismo no exon 17, a variação A11860G não refinou os achados já descritos para o polimorfismo I/D (intron 16). Apenas a análise conjunta das variantes -262A>T e A11860G foi capaz de refinar a avaliação fenotípica (**Zhu et al., 2001**).

### **O POLIMORFISMO -262A>T**

O polimorfismo -262A>T é um SNP inicialmente identificado por Villard et al. em 1996, originalmente descrito como -240A>T. **Zhu et al. (2001)** alterou a nomenclatura para -262A>T e indicou-o como polimorfismo ACE4, para diferenciá-los de outros polimorfismos daquele estudo. Conforme visto acima, em

estudos do polimorfismo de transversão -262A>T foi observado uma discrepância, ainda não compreendida, com relação ao alelo A, pois o mesmo estaria simultaneamente associado com níveis séricos mais elevados de ECA circulante e níveis pressóricos mais baixos. Este achado de Zhu *et al.* (2001) em populações nigerianas não é compartilhado por estudos com outros grupos populacionais, como franceses e britânicos (Villard *et al.*, 1996; Keavney *et al.*, 1998), os quais relatam haver associação entre o alelo A e níveis mais baixos de ECA circulante. Todos os polimorfismos estudados por Zhu *et al.* (2001), em seqüências *upstream* ao polimorfismo -262A>T, têm um efeito oposto ao encontrado no estudo europeu, sugerindo que estes polimorfismos por si só não sejam mutantes funcionais que afetem a concentração da ECA, mas estejam em forte desequilíbrio de ligação com variantes relevantes da ECA (tal qual o polimorfismo I/D).

Quando considerados os polimorfismos I/D e -262A>T, verificamos que os mesmos apresentam uma razoável distância nucleotídica. Este último apresenta-se em uma região genômica (ainda pouco estudada do gene da ECA) *upstream* ao códon de iniciação AUG que em eucariotos a modula a capacidade traducional.

### O GENE DA ECA NA PRÁTICA MÉDICA

Estudos fisiológicos, farmacológicos e genéticos demonstram a importância da ECA e sua inibição na patogênese e tratamento de diversas doenças cardiovasculares, e existe um interesse crescente na definição dos mecanismos moleculares que determinam os níveis séricos da ECA em humanos (Keavney, 1998).

O conhecimento crescente sobre o sistema permitiu o manejo terapêutico de condições clínicas, como hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva e manejo pós-infarto miocárdico, com redução do efeito deletério sobre o coração e os rins e da progressão da insuficiência renal em diabéticos e proteinúricos (Morgan *et al.*, 2001; Sowers *et al.*, 2001; Roses, 2002; Jafar *et al.*, 2003).

Do ponto de vista farmacológico, desde o desenvolvimento dos primeiros inibidores específicos da ECA (iECA) de administração oral (Ondetti *et al.*, 1977), houve uma verdadeira revolução no desenho de drogas anti-hipertensivas envolvidas com o sistema renina-angiotensina, como novos agentes iECA com perfil farmacocinético diferenciado, uma nova classe de antagonistas do receptor da Angiotensina que realizam bloqueio seletivo de receptores AT1 (veja revisão de Smith *et al.*, 1992; Hollenberg *et al.*, 1998; Inagami, 1998; Burnier & Brunner, 2000; Unger & Sandmann, 2001; Unger, 2002), bloqueadores da renina (Allan *et al.*, 1997; Hollenberg *et al.*, 1998; Stanton, 2003) ou inibidores simultâneos da ECA e endopeptidase neutra (NEP), denominados inibidores de vasopectidases (Azizi *et al.*, 2000; McKenzie & Cowley, 2003; veja revisão de Campbell, 2003).

Cada vez mais se sustenta que a informação genética poderá servir como ferramenta prognóstica na prática médica, de forma que os dados genéticos poderão ser úteis na identificação das suscetibilidades individuais servindo como fator de risco ou de proteção (DeAngelis *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2000; Roses,

2000; Sander, 2000; Guttmacher, 2001; Venter, 2001; Guttmacher, 2002). Neste sentido, diferentes estudos tentam demonstrar associações entre variações genotípicas ou alélicas e desfechos fenotípicos.

O gene da ECA tem papel-chave na modulação da função vascular sistêmica, interferindo na repercussão orgânica de patologias como aterosclerose (Doevedans *et al.*, 2001) ou sepse (Bauer, 2002). Considerando o significado clínico de respostas microvasculares, fatores que alterem o desempenho perfeito da função vascular e endotelial podem desencadear complicações cardiovasculares que interfiram na recuperação de pacientes sépticos (Bauer, 2002).

Estudos importantes, os quais incluíram a análises de populações com mais de mil indivíduos, relacionaram a herança do alelo D ou do genótipo DD com morbidades associadas às disfunções no sistema circulatório relacionadas com vasoconstrição (Kimura *et al.*, 1997; Gardemann *et al.*, 1998; O'Donnell *et al.*, 1998; Bengtsson *et al.*, 1999; Taitinen *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2000; Qu *et al.*, 2001; Montgomery *et al.*, 2002). O mecanismo mais provável pelo qual o alelo D ou genótipo DD pode aumentar o risco às disfunções circulatórias seria através da vasoconstrição das artérias coronárias. Diversos estudos recentes tentam demonstrar associações entre presença de determinado genótipo ou herança de determinado alelo com desfechos fenotípicos, como a hipertensão essencial. Em sua maioria, os estudos associam a variação alélica polimórfica D com a ocorrência de eventos cardiovasculares, como risco aumentado de infarto miocárdico (Cambien *et al.* 1992; veja também meta-análise de Samani *et al.*, 1996).

Pacientes com genótipo DD e com hipertensão essencial apresentam uma resposta alterada ao tratamento anti-hipertensivo a longo prazo com inibidores da ECA, bem como piora na regressão de hipertrofia ventricular e no enchimento diastólico (Baudin, 2000). A resposta hemodinâmica renal a inibidores da ECA também apresenta diferenças associadas com os genótipos do polimorfismo I/D (Mizuri *et al.*, 1997). O genótipo II está associado a um risco reduzido de determinadas patologias, como diabetes tipo 2 (Mizuri *et al.*, 1995). A suposta associação entre processo reestenótico após implante de stent coronariano e tratamento com inibidores da ECA em pacientes com genótipo DD também é controversa (Meurice *et al.*, 2001; Radke & Sigwart, 2001).

No entanto, essa associação não se aplica para todas as populações estudadas. As conclusões não são uniformes quanto a uma associação direta entre a herança do alelo D e risco cardiovascular. Estudos maiores e mais rigorosos, incluindo meta-análises, mostram uma associação mais fraca entre genótipo DD e determinados fenótipos. Outros estudos importantes, também com amostras populacionais consideráveis (superiores a mil indivíduos), não evidenciaram a associação entre a herança de qualquer alelo do polimorfismo I/D e alterações do sistema vascular (Fujimura *et al.*, 1997; Poirier *et al.*, 1998; Hung *et al.*, 1999; Pfohl *et al.*, 1999; Sugiyama *et al.*, 1999; Zee *et al.*, 1999; Zaman *et al.*, 2001; Renner *et al.*, 2002; Poch *et al.*, 2002). A ausência de associação pode ser devida às interações ambientais que modulam e interferem na função vascular (Achard *et al.*, 2001) ou às interações com outros genes, dado que diferentes

variantes gênicas poderão alterar o fenótipo final devido à interferência estrutural ou regulatória sobre o gene ECA.

Os resultados contrastantes sugerem que o polimorfismo I/D desempenhe uma parcela do complexo espectro de fatores que direcionam à maior ou menor funcionalidade da ECA (**Achard et al, 2001**). Estudos rigorosos e meta-análises indicam, finalmente, que: (I) deve haver uma associação entre o alelo D e a alteração da função vascular em populações determinadas; (II) a comunidade científica pode estar diante de um viés de publicação (III) os vieses de detecção podem produzir associações casuais e (IV) há a necessidade da ampliação das investigações genéticas epidemiológicas (**Keavney et al, 2000; Bonnici et al, 2002**).

Pouco mais de uma dezena de trabalhos foram publicados sobre o polimorfismo -262A>T, envolvendo diferentes desfechos de interesse na saúde humana. Uma meta-análise multiétnica demonstrou associação positiva com risco de doença de Alzheimer (**Kehoe et al., 2003**) e dois estudos familiares mostram associação entre genótipos específicos de polimorfismo e níveis séricos da enzima conversora ou pressão arterial (**Zhu et al., 2001; McKenzie et al., 2005**), com aumento pressórico associado ao número de cópias do alelo T. Nos estudos de caso-controle, há descrições de associação presente entre o polimorfismo -262A>T e redução de risco de infarto do miocárdio com genótipo TT (**Foy, 1997**), e do alelo T com a presença de endometriose (**Hsieh et al., 2004**). Não foi demonstrada associação com outras patologias cardiovasculares, como prolapso da válvula mitral ou doença de Kawasaki (**Chow et al., 2003; Wu et al., 2004**), ou refluxo vesico-ureteral (**Liu et al., 2004**). Resultados contrastantes ocorreram em estudos envolvendo associação com câncer de mama: um trabalho demonstrou redução de risco na presença de um ou dois alelos A (**Koh et al., 2003**); outro, todavia, não demonstrou qualquer correlação com este polimorfismo (**Haiman et al., 2003**).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A capacidade de decifrar o genoma humano, aliada ao estudo de populações humanas, possibilita a compreensão em detalhes cada vez mais precisos de como a informação genética define os demais aspectos do organismo humano. O conhecimento do genoma humano habilita pesquisadores a mapear e identificar marcadores genéticos herdados responsáveis pelo aumento da suscetibilidade de um indivíduo a apresentar características biológicas típicas ou a desenvolver quadros patológicos. Com isso, passa-se a aplicar os conhecimentos genômicos à prática da clínica médica na busca da identificação dos os mecanismos da herança e os mecanismos moleculares através dos quais os genes causam as doenças (**Roses, 2000; Collins & McKusick, 2001**).

Os atuais estudos genômicos da medicina têm por objetivo identificar genes, marcadores genéticos ou conjuntos de genes que, quando herdados, deixam um indivíduo mais suscetível a desenvolver algum

perfil patológico (Wang *et al.*, 1998; Griffith & Grodzinsky, 2001; Guttmacher & Collins, 2002). A identificação de um genótipo, no entanto, nem sempre pode prever o fenótipo final, apenas detectar a predisposição do indivíduo a um determinado fenótipo, uma vez que processos multifatoriais são regulados pela ação conjunta de centenas de genes e interferências ambientais (Collins & McKusick, 2001; Phillips, 2001). Mesmo nesta situação, a identificação diferencial da herança genética é muito funcional como fator diagnóstico a ser introduzido na prática clínica (Roses, 2000; Sander, 2000). Em outras palavras, conhecendo os genes herdados por uma pessoa, espera-se ser possível conhecer em que grau há predisposição dela desenvolver determinadas doenças, o quão suscetível ela seria às doenças infecto-contagiosas e como ela poderia responder a um tratamento farmacológico (Rupert *et al.*, 1999; Bailey *et al.*, 2001; Guttmacher *et al.*, 2001; Quinzii *et al.*, 2001).

Mesmo conhecendo-se a estrutura do genoma humano, a identificação das suas variações polimórficas está apenas no início e as pesquisas ainda buscam detectar quais são os genes, os marcadores e/ou os polimorfismos genéticos candidatos a desencadear os quadros patológicos de interesse. Avaliações populacionais epidemiológicas para a medicina genômica preventiva estão indicando a relação entre a herança de certos alelos, ou marcadores genéticos, e a suscetibilidade ao desenvolvimento de quadros biológicos mais ou menos degenerativos (Wang *et al.*, 1998; Guttmacher & Collins, 2002).

Estudos populacionais em larga escala, que prevêem a descoberta de genes predisponentes a efeitos deletérios na saúde dos indivíduos, sustentam-se nas diretrizes epidemiológicas usando associações e correlações estatísticas que unem o gene candidato à ocorrência da disfunção (Rupert *et al.*, 1999; Sander, 2000). Mesmo que tais estudos evidenciem uma associação direta significativa entre a presença de um alelo e a manifestação de uma doença complexa, deve-se levar em consideração todo conjunto genético herdado por um indivíduo antes de concluir se os fatores genéticos vão, de fato, afetá-lo fenotipicamente (Collins & McKusick, 2001). A etiologia das doenças complexas não será decifrada sem que se conheçam as influências e as interferências gênicas dentro de cada genoma individual. Se tais interferências forem desconsideradas, haverá risco de equívoco na interpretação da investigação individual (Griffith & Grodzinsky, 2001; Guttmacher & Collins, 2002). Os estudos genômicos na medicina prevêem que a relação entre a herança do marcador genético e a manifestação fenotípica não é integralmente determinística quando se trata da análise individual, pois o que importa não é a herança de um gene variante, mas a capacidade dele de se manifestar (DeAngelis *et al.*, 2000; Phillips, 2001; Quinzii *et al.*, 2001; Roses, 2002).

## BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. Achard JM, Leborgne L, Tribouilloy C, *et al.* (2001). Restenotic process and DD genotype after angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment. *Lancet*, 358 (9283):757-758
2. Allan DR, Hui KY, Coletti C, Hollenberg NK. (1997) Renin vs. angiotensin-converting enzyme inhibition in the rat: consequences for plasma and renal tissue angiotensin. *J Pharmacol Exp Ther.* 283(2):661-665.
3. Akashi H. (1999) Inferring the fitness Effects of DNA Mutations From Polymorphism and Divergence Data: Statistical Power to Detect Directional Selection Under Stationarity and Free Recombination. *Genetics*, 151: 221-238.
4. Azizi M, Massien C, Michaud A, Corvol P. (2000) In vitro and in vivo inhibition of the 2 active sites of ACE by omapatrilat, a vasopeptidase inhibitor. *Hypertension.* 35(6):1226-1231.
5. Bailey D, Zanders E, Dean P.(2001). The end of the beginning for genomic medicine. *Nat. Biotechnol.*, 19, 207-209.
6. Batzer MA & Deininger PL. (2002). Alu repeats and human genomic diversity. *Nat. Rev. Genet.* 3: 370-380.
7. Baudin B. (2000) Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism and drug response. *Clin Chem Lab Med.* 38(9):853-856.
8. Baudin B. (2000). Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism and drug response. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 38: 853-856.
9. Bauer PR. (2002). Microvascular responses to sepsis: clinical significance. *Pathophysiol* 8: 141-148.
10. Bengtsson K, Orho-Melander M, Lindblad U, *et al.* (1999). Polymorphism in the angiotensin converting enzyme but not in the angiotensinogen gene is associated with hypertension and type 2 diabetes: the Skaraborg Hypertension and diabetes project. *J. Hypertens.*, 17: 1569-1575
11. Bernstein KE, Martin BM, Edwards AS, Bernstein EA. (1989). Mouse angiotensin-converting enzyme is a protein composed of two homologous domains *J. Biol. Chem*, 264 (20)11945-11951
12. Bernstein KE. (2002). Two ACEs and a heart. *Nature*, 417: 799-802.
13. Bonnici F, Keavney B, Collins R, Danesh J. (2002). Angiotensin converting enzyme insertion or deletion polymorphism and coronary restenosis: meta-analysis of 16 studies. *Biochem. Mol. J.*, 325:517-520.
14. Britten RJ. DNA Sequence Insertion and Evolutionary Variation in Gene Regulation (1996). *Proc Nat Acad Sci*, 93(18): 9374-9377
15. Burnier M, Brunner HR. (2000) Angiotensin II receptor antagonists. *Lancet.* 355(9204):637-645.
16. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, *et al.* (1992) Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature.* 15;359(6396):641-644.
17. Campbell DJ. (2003) Vasopeptidase inhibition: a double-edged sword? *Hypertension.* 41(3):383-389.
18. Carrol SB. (2003) Genetics and the making of Homo sapiens. *Nature*, 422: 849-857.
19. Cavalli-Sforza LL. (1998). The DNA revolution in population genetics. *Trends Genet*, 14: 60-65.
20. Chen C, Gentles AJ, Jurka J, Karlin S. (2002). Genes, pseudogenes, and Alu sequence organization across human chromosomes 21 and 22. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 2930–2935



21. Chou HT, Chen YT, Shi YR, Tsai FJ. (2003) Association between angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and mitral valve prolapse syndrome. *Am Heart J* 145(1):169-173.
22. Collins FS & McKusick VA. (2001). Implications of the Human Genome Project for medical science. *JAMA*, 285: 540-544.
23. De Mello WC & Danser AHJ. (2000). Angiotensin II and the heart: the intracrin rennin-angiotensin system. *Hypertension*, 35: 1183-1188.
24. DeAngelis CD, Rosenberg RN, Smith JM. (2000). Genomic medicine and the individual patient. *JAMA*, 284: 22-29.
25. Dewannieux M, Esnault C, Heidemann T. (2003). LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nat. Genet.*, 35: 41-48.
26. Doevedans PA, Jukema W, Spiering W, *et al.* (2001). Molecular genetics and gene expression in atherosclerosis. *Int J Cardiol* 80: 161-172.
27. Doria A, Warram JH, Rich SS, *et al.* (1994). Angiotensin I-converting enzyme (ACE): estimation of DNA haplotypes in unrelated individuals using denaturing gradient gel blots. *Hum. Genet.*, 94: 117-123.
28. Erdos EG & Skidgel RA. The angiotensin I converting enzyme. (1987). *Lab. Invest.*, 4: 345-348.
29. Fire A. *et al.* (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
30. Foy CA, Rice GI, Ossei-Gerning N, Mansfield MW, Grant PJ. (1997) Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphisms in patients characterized by coronary angiography. *Hum Genet* 100(3-4):420-425.
31. Fujimura T, Yokota M, Kato S, *et al.* (1997). Lack of association of angiotensin converting enzyme gene polymorphism or serum enzyme activity with coronary artery disease in Japanese subjects. *Am. J. Hypertens.*, 10: 1384-1390
32. Gardemann A, Fink M, Stricker J, *et al.* (1998). ACE I/D gene polymorphism: presence of the ACE D allele increases the risk of coronary artery disease in younger individuals. *Atherosclerosis*, 139: 153-159
33. Griffith LG & Grodzinsky AJ. (2001). Advances in Biomedical Engineering. *JAMA*, 285: 556-561.
34. Guttmacher AE, Collins, FS. (2002). Genomic Medicine. *N. Eng. J. Med.*, 19: 1512-1520.
35. Guttmacher AE, Jenkins J, Uhlmann WR. (2001). Genomic medicine: who will practice it? A call to open arms. *Am. J Med. Genet.*, 106: 216-222.
36. Haiman CA, Henderson SO, Bretsky P, Kolonel LN, Henderson BE. (2003) Genetic variation in angiotensin I-converting enzyme (ACE) and breast cancer risk: the multiethnic cohort. *Cancer Res* 63(20):6984-6987.
37. Hannon GJ (2002). RNA interference. *Nature* 418: 244-251.
38. Howard T, Balogh R, Overbeek P, Bernstein KE. (1993) Sperm-specific expression of angiotensin-converting enzyme (ACE) is mediated by a 91-base-pair promoter containing a CRE-like element. *Mol Cell Biol.* 13(1): 18-27.
39. Hollenberg NK, Fisher ND, Price DA. (1998) Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension.* 32(3):387-392.
40. Hollenberg NK, Fisher ND, Price DA. (1998). Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue. *Hypertension* 32: 387-392.

41. Hooper NM, Keen J, Pappin DJ, **et al.** (1987). Pig kidney angiotensin converting enzyme purification and characterization of amphipathic and hydrophobic forms of the enzyme establishes C-terminal anchorage to the plasma membrane. *Biochem. J.*, 247: 85-93.
42. Hsieh YY, Chang CC, Tsai FJ, Hsu CM, Lin CC, Tsai CH. (2005) Angiotensin I-converting enzyme ACE 2350\*G and ACE-240\*T-related genotypes and alleles are associated with higher susceptibility to endometriosis. *Mol Hum Reprod* 11(1):11-14.
43. Hubert C, Houot AM, Corvol P, **et al.** (1991). Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J. Biol. Chem.*, 266: 15377-83.
44. Hung J, McQuillan BM, Nidorf M, **et al.** (1999). Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and carotid wall thickening in a community population. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19: 1969-1974
45. Inagami T. (1998) A memorial to Robert Tiegerstedt: the centennial of renin discovery. *Hypertension*. 32(6):953-957.
46. International Human Genome Sequencing Consortium (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921
47. Jafar TH, Schmid CH, Stark PC, **et al.** (2003) The rate of progression of renal disease may not be slower in women compared with men: a patient-level meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant*. 18(10):2047-53.
48. Jafar TH, Stark P C, Schmid CH, **et al.** (2003). Progression of chronic kidney disease: the role of blood pressure control, proteinuria and ACE inhibition a patient-level meta-analysis. *Ann. Int. Med.*, 139: 244-252.
49. Keavney B, McKenzie CA, Connel JMC **et al.** (1998). Measured haplotype analysis of the angiotensin I-converting enzyme gene. *Hum. Mol. Genetics.*, 7: 1745-1751.
50. Keavney B, McKenzie CA, Parish S **et al.** (2000). Large-scale test of hypothesised associations between the angiotensin-converting-enzyme insertion/deletion polymorphism and myocardial infarction in about 5000 cases and 6000 controls. International Studies of Infarct Survival (ISIS) Collaborators. *Lancet*, 355: 434-42.
51. Kehoe PG, Katzov H, Feuk L **et al.** (2003) Haplotypes extending across ACE are associated with Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 12(8):859-867.
52. Kim S & Iwao H (2000). Molecular and cellular mechanism of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol. Rev.*, 52: 11-34.
53. Kimura M, Yokota M, Fujimura T, **et al.** (1997). Association of a deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene with left-ventricular hypertrophy in Japanese women with essential hypertension; multicenter study of 1,919 subjects. *Cardiology*, 88: 309-314
54. Koh WP, Yuan JM, Sun CL, van den Berg D, Seow A, Lee HP, Yu MC. (2003) Angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene polymorphism and breast cancer risk among Chinese women in Singapore. *Cancer Res* 63(3):573-578.
55. Korenberg JR & Rykowski MC. (1988). Human genome organization: Alu, lines, and the molecular structure of metaphase chromosome bands. *Cell* 53, 391-400
56. Krege JH, John SW, Langenbach LL, **et al.** (1995). Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature*, 375: 146-148.
57. Krege JH, Kim H-S, Moyer JS, **et al.** (1997). Angiotensin-converting enzyme gene mutations, blood pressures and cardiovascular homeostasis. *Hypertension*, 29: 150-157.

58. Kumar RS, Thekkumkara TJ, Sem GC. (1991). The mRNAs encoding the two angiotensin-converting enzyme are transcribed from the same gene by a tissue-specific choice of alternative transcription initiation sites. *J. Biol. Chem.*, 266: 3854-3862.
59. Liao WX & Roy AC. (2002) Lack of association between polymorphisms in the testis-specific angiotensin converting enzyme gene and male infertility in an Asian population *Mol Human Reprod*, 8(3), 299-303
60. Liu KP, Lin CY, Chen HJ, Wei CF, Lee-Chen GJ. (2004) Renin-angiotensin system polymorphisms in Taiwanese primary vesicoureteral reflux. *Pediatr Nephrol* 19(6):594-601.
61. Martínez E, Puras A, Escribano J, *et al* (2000). ACE gene polymorphisms, serum ACE activity and blood pressure in a Spanish-Mediterranean population. *J. Hum. Hypertens.*, 14: 131-135.
62. Mattick JS. (2003). The human genome and the future of medicine. *Med J Aust*, 179, 212– 216.
63. Mattick JS. (2003).Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. *Bioessays*, 25: 930-939.
64. McKenzie CA, Sinsheimer JS, Adeyemo AA, *et al.* (2005) SNP haplotypes in the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene: analysis of Nigerian family data using gamete competition models. *Ann Hum Genet* 69(Pt 2):227-232.
65. McKenzie DB, Cowley AJ. (2003) Drug therapy in chronic heart failure. *Postgrad Med J.* 79(937):634-642.
66. McManus MT, Petersen CP, Haines BB, *et al.* (2002). Gene silencing using micro-RNA designed hairpins. *RNA*, 8: 842 -850.
67. Meurice T, Bauters C, Hermant X, Codron V, VanBelle E, Mc Fadden EP, Lablanche J, Bertrand ME, Amouyel P. (2001) Effect of ACE inhibitors on angiographic restenosis after coronary stenting (PARIS): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 357(9265):1321-1324.
68. Mizuiri S, Hemmi H, Inoue A, et al. (1995) Angiotensin-converting enzyme polymorphism and development of diabetic nephropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nephron.* 70(4):455-459.
69. Mizuiri S, Hemmi H, Inoue A, *et al.* (1997) Renal hemodynamic changes induced by captopril and angiotensin-converting enzyme gene polymorphism. *Nephron.* 75(3):310-314.
70. Montgomery H, Brull D, Humphries SE (2002). Analysis of gene-environment interactions by “stressing-the-genotype” studies: the angiotensin converting enzyme and exercise-induced left ventricular hypertrophy as an example. *Ital. Heart. J.*, 3: 10-14.
71. Morgan T, Griffiths C, Delbridge L. (2002) Low doses of angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin type 1 blockers have a synergistic effect but high doses are less than additive. *Am J Hypertens.* 15(11):1003-1005.
72. Niu T (2002). ACE gene insertion/deletion polymorphism and cardiovascular disease. *Drugs*, 62: 977-993.
73. O'Donnell CJ, Lindpaintner K, Larson MG, *et al.* (1998). Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study. *Circulation*, 97: 1766-1772
74. Ondetti MA, Rubin B, Cushman DW. (1977) Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science.* 196(4288):441-444.

75. Partridge L. Evolutionary Biology and Age-Related Mortality. In: Wachter KW, Finch CE., Eds.(1997) *Between Zeus and the Salmon: The Biodemography of Longevity*; Committee on Population, National Research Council. Washington: National Academy Press, p78-95.
76. Pfohl M, Koch M, Prescod S, **et al.** (1999). Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism, coronary artery disease and myocardial infarction. An angiographically controlled study. *Eur. Heart. J.*, 20: 1318-1325.
77. Phillips JA. (2001). Genomic medicine: managing the complexity. *JAMA*, 286: 1639.
78. Poch E, La Sierra Ad A, Gonzáles-Nuñez D, **et al.** (2002). Genetic Polymorphisms of the renin-angiotensin system and essential hypertension. *Med. Clin. (Barc)*, 118: 575-579.
79. Poirier O, Georges JL, Ricard S, **et al.** (1998). New polymorphisms of the angiotensin II type 1 receptor gene and their associations with myocardial infarction and blood pressure: the ECTIM study. *J. Hypertens.*, 16: 1443-1447.
80. Qu H, Lu Y, Lin S. (2001). Meta-analysis on the association of ACE/ID polymorphism and essential hypertension in Chinese population. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 35: 408-411.
81. Quinzii C, Belpinati F, Pignatti PF. (2001) Predictive genetic testing - new possibilities in determination risk of complex diseases. *Croat. Med. J.*, 42, 458-462.
82. Radke PW, Sigwart U. (2001) Restenotic process and DD genotype after angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment. *Lancet*. 358(9283):757
83. Renner W, Pabst E, Paulweber B, **et al.** (2002). The angiotensin-converting-enzyme insertion/deletion polymorphism is not a risk factor for peripheral arterial disease. *Atherosclerosis*, 165: 175-178.
84. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, **et al.** (1990). Na insertion-deletion polymorphism in the angiotensin-I converting enzyme gene accounting for half of the variance of serum enzyme levels. *J. Clin. Invest.*, 86: 1343-1346.
85. Roses AD (2000). Pharmacogenetics and the practice of medicine. *Nature*, 15: 857-865.
86. Roses AD. (2002) Pharmacogenetics place in modern medical science and practice. *Life Sci.* 15;70(13):1471-1480.
87. Rupert JL, Devine DV, Monsalve MV, **et al.** (1999). Angiotensin-converting enzyme alleles in Quechua, a high altitude South American native population. *Ann. Hum. Biol.*, 26: 375-380.
88. Rupert JL, Kidd KK, Norman LE, **et al.** (2003). Genetic polymorphisms in the renin-angiotensin system in high-altitude and low-altitude native American populations. *Ann. Hum. Gen.*, 67: 17-25
89. Samani NJ, Thompson JR, O'Toole L, Channer K, Woods KL. (1996) A meta-analysis of the association of the deletion allele of the angiotensin-converting enzyme gene with myocardial infarction. *Circulation* 94(4), 708-712.
90. Samani, NJ, Thompson JR, O'Toole L, **et al.** (1996). A meta-analysis of the association of the deletion allele of the angiotensin-converting enzyme gene with myocardial infarction. *Circulation*, 94: 78-712.
91. Sander C. Genomic medicine and the future of health care. (2000). *Science*, 287: 1977-1978.
92. Sibinga NES & Ware JA. (2000). A pair of ACEs, for openers? *Circ. Res.*, 87: 523-525.
93. Smith NA, Singh SP, Wang MB **et al.** (2000). Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407:319-320.
94. Smith RD, Chiu AT, Wong PC, Herblin WF, Timmermans PB. (1992) Pharmacology of nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 32:135-165
95. Sowers JR, Epstein M, Frohlich ED. (2001) Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update. *Hypertension.* 37(4):1053-1059.

96. Sowers JR, Epstein M, Frolich ED. (2001) Diabetes, hypertension and cardiovascular disease: an update. *Hypertension*, 37: 1053-1059.
97. Spruth E, Zurbrügg HR, Warnecke ,C **et al.** (1999). Expression of ACE mRNA in the human atrial myocardium is not dependent on left ventricular function, ACE inhibitor therapy, or the ACE I/D genotype. *J. Mol. Med.*, 77: 804-810
98. Stanton, A. (2003) Potential of rennin inhibition in cardiovascular disease. *JRAAS*, 4(1):6-10.
99. Steiner C, Muller M, Baniahmad A, **et al.** (1987). Lysozyme gene activity in chicken macrophages is controlled by positive and negative regulatory elements. *Nucl. Acids Res.*, 15: 4163-4178.
100. Sugiyama T, Morita H, Kato N **et al.** (1999). Lack of sex-specific effects on the association between angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and hypertension in Japanese. *Hypertens. Res.*, 22:55-59.
101. Taitinen L, Uhari M, Kontula K, **et al.** (1999). Angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism, angiotensinogen gene polymorphisms, family history of hypertension, and childhood blood pressure. *Am. J. Hypertens.*, 12: 858-866.
102. Tamaki S, Iwai N, Ohmichi N, **et al.** (1997). Effect of genotype on the angiotensin-converting enzyme mRNA level in human aorta. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 24: 305-308.
103. Unger T, Sandmann S. (2001) Angiotensin receptor blocker selectivity at the AT1- and AT2-receptors: conceptual and clinical effects. *JRAAS* 1 (S2), Dec 2001
104. Unger T. (2002) Pharmacological properties of angiotensin II antagonists: examining all the therapeutic implications. *JRAAS* 2 (S2), Sep 2002
105. Valee BL, Auld DS. (1990). Zinc coordination, function and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry*, 29: 5647-59.
106. Venter CJ, Adams MD, Myers EW, **et al.** (2001). The sequence of the human genome. *Science*, 291: 1304-1351.
107. Villard E, Tiret L, Visvikis S, **et al.** (1996). Identification of new polymorphisms of the ACE gene, and study of their relationship to plasma ACE levels by two QTL segregation-linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.*, 58: 1268-1278.
108. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, **et al.** (1998). Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*, 280: 1077-1082.
109. Wu SF, Chang JS, Peng CT, Shi YR, Tsai FJ. (2004) Polymorphism of angiotensin-1 converting enzyme gene and Kawasaki disease. *Pediatr Cardiol* 25(5):529-533.
110. Yelin R, Dahary D, Sorek R, **et al.** (2003). Widespread occurrence of antisense transcription in the human genome. *Nat. Biotech.*, 21: 379-386.
111. Zaman MM, Yoshiike N, Date C **et al.** (2001). ACE genetic polymorphism is not associated with hypertension in a cross-sectional sample of a Japanese population: the Shibata Study. *J. Hypertens. Jan.*: 19:47-53.
112. Zee RY, Ridker PM, Stampfer MJ, **et al.** (1999). Prospective evaluation of the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and the risk of stroke. *Circulation*, 99: 340-343.
113. Zhu X, Bouzekri N, Southam L, **et al.** (2001). Linkage and association analysis of angiotensin I-converting Enzyme (ACE)-gene polymorphisms with ACE concentration and blood pressure. *Am. J. Hum. Genet.*, 68: 1139-1148.
114. Zhu X, McKenzie CA, Forrester T, **et al.** (2000). Localization of a small genomic region associated with elevated ACE. *Am. J. Hum. Genet.*, 67: 1144-1153.

## MANUSCRITO COM OS RESULTADOS DO TRABALHO EXPERIMENTAL

### TITLE OF THE MANUSCRIPT

Temporal trends in renal dysfunction among critically ill patients according to I/D and -262A>T ACE polymorphisms

### First name, middle initial and last name of each author / highest academic degree, and institutional affiliation for each author:

- José Alberto Rodrigues Pedroso / MD / Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Porto Alegre, RS – Brazil.
- Diego Paskulin / Biology Student / Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Porto Alegre, RS – Brazil.
- Fernando Suparregui Dias / MD; MSc / Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Porto Alegre, RS – Brazil.
- Everaldo de França / MSc; PhD / Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Porto Alegre, RS – Brazil.
- Clarice Sampaio Alho / MSc; PhD / Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Porto Alegre, RS – Brazil.

### Name of the institution(s) where the work was performed:

Faculdade de Biociências (FaBio) and Hospital São Lucas (HSL) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

### Address for reprints and a statement regarding whether reprints will be ordered:

Faculdade de Biociências. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga, 6681 P12 - 2º andar. 90619-900 - Porto Alegre, RS - Brazil; Telephone number: (55) (51) 33203568; E-mail address: csalho@pucrs.br

**Financial support used for the study, including any institutional departmental funds:**

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Faculdade de Biociências (FaBio), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

**Index words:**

ACE I/D polymorphism; -262A>T polymorphism; genetic risk factors; intensive care unit; acute renal failure.

**Address for the first author and all contributing authors:**

Faculdade de Biociências. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga, 6681 P12 - 2º andar. 90619-900 - Porto Alegre, RS - Brazil; Telephone number: (55) (51) 33203568; E-mail address: [jose-pedroso@uol.com.br](mailto:jose-pedroso@uol.com.br)

**Periodic chosen for submission:**

American Journal of Kidney Disease (AJKD)

## Abstract

Multiple organ failure syndrome and acute renal dysfunction share many of physiologic factors involved in their development. Recent studies correlate the susceptibility to organ dysfunction in critically ill patients with genetic inheritance. Many of them consider the ACE gene could be a possible candidate to elucidate a genetic risk factor in critically ill patients. We aimed to examine the effects of I/D and -262A>T ACE polymorphisms in the renal function in critically ill southern Brazilians patients. A multi-organ worldwide known failure score, the SOFA (Sequential Organ Failure Assessment), was used to determine the basal health state at first day (ICU admission). Considering the admission SOFA score and the trend of renal function (measured by daily renal SOFA scores, determined by daily measure of serum creatinine and diuresis), we hypothesize that ACE polymorphisms could influence in the trend of renal function in ICU patients. A total of 153 critically ill adult patients (79 men and 77 women) were included in this study. We monitored the patients daily during their entire ICU and post-ICU (hospital) stay (measured from the ICU admission day to a maximum of 224 days). We observed progression to renal failure (SOFA scores 3 and 4) in first seven days of ICU stay and need for dialysis. The general genotypic frequencies in our sample were II=0.17; ID=0.46; DD=0.37 and AA=0.30; AT=0.55; TT=0.15, and the allelic frequencies were I=0.40; D=0.60 and A=0.56; T=0.44. This is the first study to verify the influence of I/D and -262A>T ACE polymorphisms in acute renal dysfunction among critically ill patients. No significant association was found between genotypes or allele frequencies and the trend of the renal function. The I/D and -262A>T ACE polymorphisms have no significant impact on the trend of renal function during the first week of ICU stay, neither any influence in mortality in critically ill patients.



## Introduction

Acute renal failure is often present among the critically ill patients in the intensive care unit (ICU). It is characterized by an abrupt reduction in renal function, developing in these subjects due to conditions associated with high mortality.<sup>1</sup> Nowadays, renal failure in multiorgan dysfunction is considered as a causal pathway for mortality and not simply an epiphenomenon, and an independent risk factor for mortality<sup>1,2</sup>.

Acid-base disequilibrium and inflammatory response effects are associated with prolonged hospital and ICU length of stay<sup>3</sup>. As a part of multiple organ failure syndrome (MOFS), acute renal dysfunction has the same physiologic factors involved in its development<sup>4</sup>. Renal vasoconstriction is caused by a disequilibrium among systemic and local vasoactive substances, with changes in glomerular hemodynamic. Renal vasoconstriction can lead to merely hemodynamic acute renal failure, with reduction of glomerular filtration rate, or to acute tubular necrosis, probably caused by hemodynamic systemic failure and inflammatory mediators<sup>5</sup>. Besides better understanding in physiopathological mechanisms, the mortality rates persists elevated<sup>4</sup>.

During sepsis, there is a severe production of pro-inflammatory cytokines, involved in MOFS. Considering the clinical repercussion of microvascular control, factors that modify the perfect performance of the vascular and endothelial function can lead to hemodynamic or vascular alterations that intervene with the recovery of septic patients<sup>6</sup>. The renin-angiotensin-aldosterone system and the sympathetic nervous system are activated during endotoxic (septic) shock, with an increase in plasmatic renin activity and renal vasoconstriction<sup>5</sup>.

Individual susceptibility to organ dysfunction in critically ill patients can be related with genetic inheritance<sup>7-10</sup>. Polymorphic variation in human genes can result in structural or regulatory modifications that can alter many metabolic functions. Angiotensin-converting enzyme has a potential role in homeostasis, including effects in vascular tone, permeability, epithelial cell survival and fibroblast activation<sup>11</sup>. It has been demonstrated that an insertion/deletion (I/D) polymorphism in the ACE gene (locus 17q23) affects renal prognosis in some pathologic conditions<sup>12</sup>. ACE activity can be genetically modulated by a 287-bp insertion/deletion polymorphism in intron 16 of ACE gene<sup>12,13</sup>. Studies using the ACE I/D polymorphism have shown a dose effect of the D allele as a genetic risk factor for circulatory dysfunction and vasoconstriction<sup>14-18</sup>, but other authors present controversial results or do not describe any significant association<sup>19-25</sup>.

It is believed that this intronic (noncoding) polymorphism may be a marker for another genetic locus (or loci) with more functional significance. Extensive haplotyping of the region has evaluated the promoter region and a number of exons<sup>11,26</sup>. A transversion A>T (-262A>T) located inside 5'UTR region (which modulates the

translation capability in eukaryotes) is another polymorphism studied in the ACE gene, with some published reports about its influence in human diseases but no one previously published about influence in renal function<sup>27-36</sup>.

Serum creatinine, diuresis and use of vasopressors in an ICU context are important indicators of acute renal failure or predisposition to dysfunction<sup>2</sup>. These variables can be measured by a multiorgan failure score, the SOFA (sequential organ failure assessment) score<sup>37</sup>. Considering the admission SOFA score and the trend of renal function (measured by daily renal SOFA scores), we hypothesize that ACE polymorphisms could influence in the trend of renal function in ICU patients. We aimed to examine the effects of I/D and -262A>T ACE polymorphisms on the evolution of renal dysfunction in critically ill patients.

## Subjects and Methods

**Study design and Inclusion/Exclusion Criteria.** This was a cross sectional study of random, critically ill patients admitted to the general Intensive Care Unit (ICU) of the São Lucas Hospital (HSL) of the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Brazil, between May 1<sup>st</sup>, and November 28<sup>th</sup>, 2002, and between January 1<sup>st</sup>, and June 30<sup>th</sup>, 2005. Each patient was individually invited to participate in the study and gave its informed consent. One member of the family signed the form consent when the patient was unconscious or in no medical conditions to give him/herself the consent. The PUCRS Research Ethics Committee approved this study (protocols # 05-02357, and # 03-01732).

**Patient Selection.** All the patients were southern Brazilians. All the personnel involved in patient care were blind to the selection process and genotyping results. Patients were not eligible if they were under 18 years old or diagnosed with HIV-infection, pregnant or lactating or taking immunosuppressive drugs.

**Selected polymorphisms.** The ACE gene is responsible by synthesis of the Angiotensin Converting Enzyme (ACE). It is located in locus 17q23 and interferes in modulation of systemic vascular function, with organic repercussion of some diseases<sup>38,39</sup>. Many polymorphisms of ACE gene have been described, but the most frequently described in studies is the Insertion/Deletion (I/D) polymorphism<sup>13</sup>. It consists in the presence (allele I) or absence (allele D) of a 287bp Alu fragment inside of the intron 16 of the ACE gene. Although I/D represent an intronic polymorphism, there have been many studies describing a correlation with their isolated or in-haplotype heritage could explain part of the total variability of the ACE enzyme activity and some clinical conditions<sup>26,28,40</sup>. The possible genotypes to the I/D ACE polymorphism are II, ID or DD.

The -262A>T ACE is a single nucleotide polymorphism (SNP) first identified by Villard et al. in 1996<sup>40</sup>, originally described as -240A>T. Zhu et al<sup>28</sup> changed the nomenclature to -262A>T and suggested a new name, the ACE4 polymorphism, for the sake of clarity among other polymorphisms focused in their paper. A recent paper refers to the nomenclature A-239T<sup>41</sup>. The possible genotypes to the -262A>T ACE SNP are AA, AT or TT.

**DNA Collection.** A 5mL blood sample was collected in a sterile system with EDTA from each patient at ICU admission and maintained refrigerated at 4°C or frozen at -20°C until DNA extraction. Genomic DNA was isolated from leucocytes by standard procedures and maintained in freezer (-20°C) as described by Lahiri & Nurnberger<sup>42</sup>.

**Genotyping.** Genotyping protocols for the determination of intron 16 I/D ACE polymorphism gene was previously described by Rigat et al<sup>13</sup>. The biallelic I/D ACE polymorphism was determined according to the PCR–AFLP method. Polymerase Chain Reaction was carried out with a total volume of 25 µL with about 10-100 ng of genomic DNA, 2.5 U Taq DNA Polymerase in Taq Buffer (Invitrogen-Life Technologies, São Paulo, SP, Brazil), the final concentration of each dNTP was 0.2 mmol/L, and 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>. The I/D ACE polymorphism was amplified using 0.4 pmol of each primer sense, 5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3'; and antisense, 5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T-3' (synthesized by Invitrogen-Life Technologies, São Paulo, SP, Brazil) in a PTC- 100 thermocycler (MJ Research, Watertown, MA, USA) as follows: an initial denaturation at 94°C for 10 minutes, followed by 35 cycles at 94°C for 1 minute, 60°C for 1 minute, 72°C for 1 minute, and final extension step for 5 minutes. The genotype was determined by electrophoretic analysis of the amplified DNA segments on a 1.5% agarose gel, on the assumption that the I allele amplified one segment of 480 bp, and the D allele one of 190 bp. The ACE intron 16 gene sequence, and both I/D alleles are registered in the EMBL data base as GI 28921 (GenBank accession number X62855). The -262A>T ACE polymorphism was amplified using 0.3 pmol each primer forward, 5'- TCG GGC TGG GAA GAT CGA GC -3' and reverse, 5'- GAG AAA GGG CCT CCT CTC TCT-3' (synthesized by Invitrogen-Life Technologies, São Paulo, SP, Brazil), in which the underlined nucleotide represents the deliberate primer mismatch designed to introduce an artificial restriction site. Polymerase chain reaction was performed in a total volume of 30 µL with 10-100 ng of genomic DNA, 1.7U Taq DNA Polymerase in Taq Buffer (Life Technologies - Brazil. Invitrogen. São Paulo, SP, Brazil), the final concentration of each dNTP was 0.2 mmol/L, and 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>. Amplification was done using the same thermocycler mentioned before, as follows: initial denaturation at 94°C for 5 minutes, followed by 40 cycles at 94°C for 1 minute, 63°C for 25 seconds, and 72°C for 10 seconds. The final extension step was prolonged to 5 minutes at 72°C. The 137bp PCR amplified product (20 µL) was cleaved in an appropriate buffer with 10U of the XbaI (5'-T/CTAGA-3'; GibcoBRL®-Life

Technologies™, Rockville, MD, USA) in a total volume of 25µL at 37°C for 3 hours. Afterwards, the restriction digests were electrophoresed on a 3% agarose gel, stained with ethidium bromide, and visualized over a UV transilluminator to determine the genotypes AA (137bp fragment); AT (137pb, 116pb, and 21pb fragments); TT (116pb and 21pb fragments) (Figure 1).

In order to confirm that the 137bp PCR amplified product really represents the targeted product, we performed a sequence analysis in MegaBase 1000 capillary DNA sequencer (Amersham Biosciences UK Ltd, Chalfont St Giles, Bucks, UK), also using the designed primers (forward and reverse). The sequence obtained was submitted to a nucleotide-nucleotide BLAST on line alignment (*blast*, at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) with the databases, and we found consensus with the *Homo sapiens* angiotensin-converting enzyme gene, promoter region (GenBank accession number AF229986) and the sequence exported from chromatogram file. The alignment view was performed in ClustalX program (version 1.8, as described in Thompson et al<sup>43</sup>, at <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>) in multiple alignment mode, with sequences loaded in FASTA format.

**Study Subjects.** A total of 153 critically ill adult patients (79 men and 77 women) admitted to the Intensive Care Unit (ICU) at São Lucas Hospital – Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (HSL-PUCRS) were included in this study. We monitored the patients daily during their entire ICU and post-ICU stay which resulted in measurements from the ICU admission day to a maximum of 224 days. This group of critically ill adult patients was previously described partially by D'Avila et al (2006)<sup>44</sup>.

**Clinical Data.** The dysfunction was evaluated using the SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) score obtained during the first seven days from the ICU admission<sup>37,45</sup>. The SOFA is a worldwide applied ICU-risk prediction score that has undergone significant development, validation and refinement during the last decade, and have been employed to risk-adjust patients with longer, more severe illnesses (e.g., sepsis or acute respiratory failure). The score describes organ dysfunction or failure. We list the six evaluated systems and its respective interest clinical conditions, obtained to determine this score: cardiovascular function (systolic and diastolic blood pressure, use of vasopressors), liver function (serum bilirubin levels), respiratory (PaO<sub>2</sub>, FiO<sub>2</sub>), neurologic function (Glasgow coma score), coagulation function (platelet count) and renal function (serum creatinine levels, urine output).

The total SOFA score for a patient is obtained by the sum of the six systems scores (each one with values ranging from 0 to 4), what results in a number varying from 0 to 24. For all systems, the higher the score the worst the specific organ function, and a higher total SOFA scores predicts higher ICU mortality tax.

To compare renal dysfunction, we used the renal SOFA scores. Score 0 corresponds to Creatinine serum levels under 1.2 mg/dL (110 µmol/L); score 1 corresponds to Creatinine serum levels of 1.2-1.9 mg/dL (110-170 µmol/L); score 2 corresponds to Creatinine serum levels of 2.0-3.4 mg/dL (171-299 µmol/L); score 3

corresponds to Creatinine serum levels of 3.5-4.9 mg/dL (300-440  $\mu\text{mol/L}$ ) or oliguria (24-hour diuresis <500 mL); and score 4 corresponds to Creatinine > 5.0 mg/dL (300-440  $\mu\text{mol/L}$ ) or anuria (24-hour diuresis <200 mL). We chose SOFA scores in order to establish comparisons of renal dysfunction between groups instead of the use of a laboratorial index (as creatinine or urea, for example) because in some cases, the mere serum measures of these biochemical analysis do not reflect the real state of renal dysfunction. This is the case of patients submitted to dialysis treatment, in which isolated measures of serum creatinine or urea reflects the effect of machine clearance plus renal clearance, but do not reflect directly the impairment condition of renal function. We used SOFA to measure the renal dysfunction because we consider it more precise and informative.

**Mathematic representation of the Renal SOFA trend in one week.** For each patient, the temporal trend of renal function was obtained considering evolution of Renal SOFA scores from the 1<sup>st</sup> to 7<sup>th</sup> observation day (or earlier, if the length of ICU stays was shorter than 7 days). We plotted the results of the scores (y) versus time (x) and obtained the trend line for each patient using the Microsoft® Excel software. The mathematical equation for the straight line is  $y = Ax + B$ , in which **A** is the declivity and **B** is a constant representing the elevation. We used the **A** coefficient as an indicator of renal function trend along time. Positive A values indicate average progressive crescent renal SOFA scores along the seven days of observation, which means non-favorable evolution. In the other hand, negative **A** coefficients represent a descending line, which means a trend of recovery of the renal function (favorable evolution) along time. The absence of modifications in the renal SOFA scores along the week prompts to an A value of zero.

**Groups for comparison.** As a prognostic score, the total SOFA score in the first day consensually can predict mortality, but there is no consensus in which one is the score number (from 0 to 24) that represents the ideal cutoff point. As different populations are considered in the studies reported in the literature<sup>46</sup>, a selection bias could lead to different cutoff points in different studies. Therefore, in our study we determined the ideal threshold based on higher sensibility and specificity criteria. We performed the determination of prediction to mortality with area under receiver operating characteristic curve (ROC curve) and observed a consistent ICU or hospital death discrimination by total SOFA score in first day, with nearest the same area under the curve for both outcomes (mortality in ICU or in hospital,  $0,73 \pm 0,04$ ,  $p < 0.001$ ).

The better combination of the sensitivity and specificity for predicting death outcomes was obtained using the score 7 in total SOFA in the first day. Lower frequency of deaths was observed in the group with scores under 7 and worst prognosis when the total SOFA score in admission day was equal or above 7 (Figure 2).

The groups for comparison were chosen considering: (i) the score total Renal SOFA of the first (admission) day; and (ii) the trend of renal SOFA along the seven first days. Four distinct groups representing four evolution tendencies of renal function in the first week of ICU stay resulted:

- (i) Group 1: total SOFA in admission day  $< 7$  (good survival prognosis), with similar tendency to renal function in first week (stability or improvement of renal function; **A** coefficient  $\leq 0$ );
- (ii) Group 2: total SOFA in admission day  $< 7$  (good survival prognosis), with opposite tendency of renal function in first week (worsening of renal function; **A** coefficient  $> 0$ );
- (iii) Group 3: total SOFA in admission day  $\geq 7$  (bad survival prognosis), with opposite tendency of renal function in first week (improvement of renal function, **A** coefficient  $< 0$ );
- (iv) Group 4: total SOFA in admission day  $\geq 7$  (bad survival prognosis), with similar tendency of renal function in first week (stability or worsening; **A** coefficient  $\geq 0$ ).

**Other clinical data.** The follow-up of our patients was extended up to the total time that patients stayed in the hospital (up to 224 days). We monitored the patients daily during their entire ICU and hospital stay, measuring their clinical data from the admission day to a discharge of the hospital or death. For diagnosis of sepsis and septic shock we used the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference criteria<sup>47</sup>: at least two of the following criteria: Fever or hypotermia (temperature in the core of the body  $> 38^{\circ}\text{C}$  or  $< 36^{\circ}\text{C}$ ); Tachycardia (ventricular rate  $> 90$  bpm); Tachypnea or Hyperventilation ( $> 20$  breaths/min or  $\text{PaCO}_2 < 32$  mmHg); Leucocytosis or Leucopenia. For illness severity evaluation we used the APACHE-II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II)<sup>48</sup> score obtained on ICU admission day. Clinical endpoints of the study were discharge from the hospital ("survivors") or death ("non-survivors"). Mortality was measured in days until death. For those patients with multiple ICU admission during the study period, only data from the first entrance was considered.

The Delta Renal SOFA is obtained by the simple difference of the Renal SOFA Score number of the 7<sup>th</sup> day of ICU stay (or the last ICU day of stay, if exit was before the 7<sup>th</sup> day), minus the score for renal SOFA in the first Day. In order to observe the evolution of the renal SOFA scores, it has the value of summarize the evolution of an organ dysfunction in the considered period of observation, but do not adequately reflect reversibly alterations occurred inside the considered period.

**Statistical analysis.** Statistical calculations, including multivariate analysis, were performed using the statistical package SPSS 13 (SPSS, Chicago, Illinois, USA). Unless otherwise stated, continuous variable results are expressed as a mean  $\pm$  standard deviation (SD), and the categorical variables as percentage and frequencies. Means were compared using one-way analysis of variance or the Kruskal-Wallis test for Non normal distributed variables. For the categorical data we used Pearson chi-square test or Fisher exact test.

Pearson's chi-square test was also used to test for Hardy-Weinberg equilibrium. The Kaplan-Meier approach and Cox regression were used in the survival analysis<sup>69</sup>. All reported P values are two-tailed and considered statistically significant when 0.05 or less. ROC Curves were employed during the step of methods definitions and its use was described above.

**Financial Disclosure:** This study was financed by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (process # 505536/2004-8), the Programa de Bolsa / Pesquisa para Alunos da Graduação – Edital PIBIC / CNPq / PUCRS 2005, and Faculdade de Biociências, PUCRS. The study is part of Master Degree thesis of principal author, and was granted by a Brazilian Governmental National Research Agency - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

**Potential conflicts of interest:** There were no conflicts of interests.

## Results

### Clinical Data:

Groups were essentially different by its admission severity (measured by Total SOFA Score), and tendency of renal function. Agreeing with our expectative to be distinct, Group 1 showed the youngest patients ( $p=0.018$ ), lower APACHE-II scores, ( $p=0.001$ ) and lower prevalence of sepsis (42.5%, versus 84% in group 4,  $p=0.001$ ) or septic shock (17.8%,  $p=0.001$ ; see Table 1). ICU length of stay was higher in Group 4 ( $p=0.018$ ). During whole observation period, the lowest prevalence was in group 1 and highest in group 4 ( $p=0.001$ ), and when considering the first week of ICU stay, only Groups 3 and 4 showed deaths (Table 1).

Need for renal replacement therapy in first week was higher in Group 4 ( $p=0.012$ ), with 7 of 9 interventions occurring in this group (14%). Nine patients (5.8%) were submitted to a renal substitutive treatment during ICU care stay. The method of choice to the critically ill unstable patients was the continuous veno-venous hemodialysis (CVVHD). Only one patient without sepsis was submitted to conventional intermittent hemodialysis, recovering function in first week (Group 4). There was only one death in first week among patients with renal dysfunction. It was observed in a septic patient of with abdominal sepsis who had partial recovery of renal function after CVVHD (Group 1), but died in the first week because of other complications (cardiovascular and hematologic). Eight of nine patients submitted to hemodialysis were septic and undergone CVVHD (1 from Group 2; 1 from Group 3; 6 for Group 4). We noticed one death in first week (Group 4), seven of which survived the first week, but gone to death during ICU stay. Two of nine submitted to renal substitutive therapies survived during whole ICU stay (both from group 4).

### **Genotypic Data:**

The frequencies of alleles and genotypes did not differ from the values expected by the Hardy-Weinberg model for both ACE polymorphisms (Table 2).

Although significant difference in clinical characteristics had been observed among the four groups, there was not significant association between genotypic or allelic ECA frequencies and the groups, that is, there were no statistically significant differences in the frequencies for I/D genotypes (II, ID or DD) or -262A>T ACE genotypes (AA, AT or TT) in the four specific prognostic groups (Table 2). In the same way, there was not significant association between the groups and the genotypes when the two polymorphisms were studied together (Table 2).

Considering the observed I/D and -262A>T ACE allele frequencies (I=0.40; D=0.60; A=0.56; T=0.44), the expected frequencies for the haplotypes would be I/A=0.224; I/T=0.176; D/A=0.336; D/T=0.264, and these four haplotypes can generate nine possible double genotypes. There was no significant difference between the expected and observed number of patients for each one of the double genotypes.

### **Relations between Clinical findings and Genotypic data:**

Considering the whole studied population (n=153), we proceeded ANOVA in order to compare means of total SOFA in day 1, Renal SOFA in day 1, Renal SOFA in day 7 or in the last measured day, and Renal Delta SOFA with genotypes, alleles or double genotypes for I/D and -262A>T ACE polymorphisms, we did not observed any difference statistically significant.

At the end of observation period, ICU deaths observed for II, ID and DD genotypes were respectively 10 (38.5%), 27 (39.1%) and 18 (31%) cases (Chi-square test, non-significant p). The same was noted among AA, AT and TT genotypes that had 16 (38.1%), 33 (37.5%) and 6 (26.1%) cases (Chi-square test, non-significant p).

Hospital deaths showed similar results for II, ID and DD, respectively 13 (50%), 36 (52.2%) and 28 (48.3%), cases (Chi-square test; non-significant p). For genotypes AA, AT and TT, similar non-significant results for same statistical study was found, with 18 (42.9%), 48 (54.5%) and 11 (47.8%) cases for each genotype. We performed survival analysis, considering all the deaths. Through Kaplan-Meier survival analysis, according to its ACE I/D genotypes, there was a similar trend to I/D and -262A>T ACE genotypes (non-significant p; see Figure 3).



Figure 4 shows Kaplan-Meier survival curves for considered Groups 1, 2, 3 and 4. As expected by results described in table 1, death rates increases from Group 1 to 4, with this last one presenting the higher death rates ( $p < 0.05$ ).

A Cox proportional hazards regression model for survival time since initiation of ICU stay was constructed, incorporating the two-loci genotypes in an overall model, as illustrated in table 3. Gender, age, occurrence of sepsis or septic shock, need of dialysis treatment and groups (1 to 4) were examined. Models satisfied proportional hazards assumptions ( $p = 0.0001$ ). We observed that only age and occurrence of septic shock had statistical association with deaths. No correlation was found with ACE genotypes for considered polymorphisms. The same analysis was also performed excluding the Groups 1 to 4 but considering other variables (some of them were direct contributors to the delineation of those groups). We noticed a statistically significant association with increased risk of mortality by total SOFA score in the first day and with higher Delta SOFA scores (Table 3) and again, no correlation was found with genotypes for the two focused ACE polymorphisms (data not shown).

## Discussion

The analysis of human genome has suggested that genetic information could be used as a complementary prognostic tool for many severe pathologies<sup>7,8,50,51</sup>. However, some specific genes have a higher and more direct influence on this setting. Otherwise genomic studies designed to identify genes, genetic markers or group of genes that confers susceptibility or resistance to pathologies, specific genotypes cannot yet predict the final phenotype, but only detect the micro-predisposition to a phenotype. Even in this case, the studies try to identify susceptibilities due to genetic heritage or trait<sup>52-58</sup>. Other conclusive studies exhibit several limits common to the “candidate-gene” approach. Despite of large study population size in some papers, a high number of statistical comparisons are necessary to take into account all possible interactions, increasing the probability of a significant association<sup>59-61</sup>.

ACE activity is a rate-limiting step for angiotensin II formation. ACE inhibitors have been shown to reduce blood pressure and slow the progression of renal diseases, with a substantial interindividual variability in treatment response also been noted<sup>62</sup>. Many studies demonstrate importance of renin-angiotensin system in renal disorders, with clinical repercussions associated with genetically modulated ACE serum levels or due to implications in pharmacological system modulation<sup>12,41</sup>.

Previous studies have evaluated association between renin-angiotensin system (RAS) polymorphisms and progression of renal insufficiency secondary to a variety of diseases, but there are still several reasons for discrepancies in genetic studies of progression. Genetic basis of renal failure can be genetically complex, being likely that several genes contribute in conjunction, with individual genes showing quantitative small effects that are difficult to detect or confirm<sup>63</sup>. The diversity of the study population can affect the results of genetic associations. The relevance of newer studies is to evaluate clinical concomitantly with genetic risk factors<sup>63</sup>. The most frequently studied is I/D polymorphism. It may modulate renal response of ACE inhibitors in terms of kidney function in patients with type 1 diabetes<sup>12</sup> and also has proven effects in type 2 diabetic nephropathy<sup>64</sup>. Other works describes influence of ACE polymorphisms as a risk factor for cardiovascular complications in long-term hemodialysis patients<sup>65</sup>, or effects on inflammatory cytokine levels, modulating its production and hence chronic inflammation in HD patients<sup>66</sup>. Few studies describes the -262A>T ACE polymorphism in relation to renal dysfunction. Wetmore *et al* (2006) describes that a specific ACE haplotype predicts survival in patients with end stage renal disease, and the majority of this association was captured by this specific promoter polymorphism<sup>41</sup>.

Critically ill patients admitted in an ICU are individuals that require sophisticated monitoring procedures which include frequent clinical, physiological and biochemical data collection. Any study involving complex clinical features as ICU patients have the possibility of confounding bias. A strategy to minimize this and standardize comparisons over the different countries is the use of predictor scores. They are extensively validating processes of collecting data about the state of health in ICU with prognostic implications. Ceriani *et al*<sup>46</sup> show results similar to ours, demonstrating that the derived SOFA variables were predictive of mortality. They suggest that the total score of the first day is representative of the patient conditions at admission to ICU and that Delta SOFA could be used as a measure of the development of dysfunction, the degree of improvement or its lack, during ICU care. SOFA has the advantage over APACHE II that can be repeated measured along the ICU stay, with direct correlations with significant outcomes. We corroborate the findings of other studies that related higher scores of SOFA in day 1 with higher mortality rates. In ICU patients, the most important risk factors for ARF or mortality from Acute renal failure are often present on admission<sup>67</sup>.

Our aim was to correlate the trend of renal function along the first week of ICU stay with specific ACE genotypes. In order to make comparisons, we decided to adopt a strategy to identify groups of patients according to two factors: the health state in admission day measured by SOFA, and its tendency of renal function along the first week of ICU stay. We were interested in this short period of observation because it is closely related with the original cause of ICU admission. After this period, and sometimes before, many other factors can be superimposed in a patient demanding intensive care, as need for surgeries and their own

complications, diagnostic procedures, nosocomial infections due to need to main drains, tubes or catheters or use of large-spectrum antibiotics.

Changes in organ function in acute renal failure patients during renal replacement therapy and its relation outcome in ICU has been previously studied. A recent work analyzed changes in SOFA score over time (Delta SOFA), with assessment of these values in first 24 hours of initiation of renal replacement therapy related with higher risk of mortality early during their ICU admission<sup>68</sup>. The construction of Groups 1 to 4 showed correspondence with biological outcomes described in table 1, with crescent gravity of cases, according to group. This helps to corroborate the fact that renal dysfunction is associated with higher morbimortality. Our findings of first day SOFA and Delta SOFA scores as independent risk factors for ICU outcome have previously been described in literature<sup>69</sup>.

Table 2, otherwise, showed a statistically similar prevalence of genotypes, haplotypes and alleles for the two focused polymorphisms among the Groups 1 to 4. If the genetic heritages of these polymorphisms have some demonstrable effect in determine SOFA scores or Renal SOFA scores, we should expect a differential prevalence of them in specific groups, what was not demonstrated.

Studies involving genetic polymorphisms and clinical conditions in ICU are not so frequent. The majority is about outcomes of acute respiratory distress syndrome (ARDS), with ACE I/D polymorphism as a significant prognostic factor for the outcome of ARDS, some indicating II as a protective genotype<sup>70</sup>, other showing DD genotype as responsible by susceptibility and worst prognosis of ARDS<sup>11</sup>. To our knowledge, no study has previously investigated I/D and -262A>T ACE polymorphisms and mortality risk in individuals with acute renal failure in ICU.

Complementarily, in our study, we developed a new well-succeeded strategy to the -262A>T ACE SNP determination, which only one step of PCR amplification is necessary. Other authors have been presenting the -262A>T ACE SNP genotyping including two obligatory successive PCR amplifications<sup>26,28,40</sup>.

## Conclusion

Our study is the first to attempt to make an association between I/D and -262A>T ACE polymorphisms and acute renal dysfunction among critically ill patients. In conclusion, we demonstrated that no significant association between genotypes or allele frequencies and the trend of the renal dysfunction was found. The I/D and -262A>T ACE polymorphisms have no significant impact on the trend of renal function during the first week of ICU stay, neither any influence in mortality in critically ill patients.

## Acknowledgement

We would like to acknowledge Mrs. Sidia Maria Callegari-Jacques (MSc; PhD; Universidade Federal do Rio Grande do Sul [UFRGS], Porto Alegre, Brazil) for contributing in statistical analysis for this study.

## References

1. Hoste EA, Kellum JA: Acute Renal Failure in the Critically Ill: Impact on Morbidity and Mortality, in Ronco C, Bellomo R, Brendolan A (eds): Sepsis, Kidney and Multiple Organ Dysfunction. Contrib Nephrol. Basel, Karger, 2004, vol 144, pp 1-11
2. Weisbord SD, Palevsky PM. Acute renal failure in the intensive care unit. Semin Respir Crit Care Med. Jun;27(3):262-73, 2006
3. Kellum JA. Metabolic acidosis in patients with sepsis: epiphenomenon or part of the pathophysiology? Crit Care Resusc. 2004 Sep;6(3):197-203.
4. Piccinni P, Carraro R, Brendolan A: Acute Renal Failure in the Intensive Care Unit, in Ronco C, Bellomo R, Brendolan A (eds): Sepsis, Kidney and Multiple Organ Dysfunction. Contrib Nephrol. Basel, Karger, 2004, vol 144, pp 12-18
5. Knobel E, Santos OFP, Batista MC (ed.) Terapia Intensiva: Nefrologia e distúrbios do equilíbrio ácido-base. São Paulo: Atheneu, 2004, 336p.
6. Bauer PR: Microvascular responses to sepsis: clinical significance. Pathophysiol 8: 141-148, 2002
7. DeAngelis CD, Rosenberg RN, Smith JM: Genomic medicine and the individual patient - byte to bedside: A call for papers. JAMA 284 (20):2642, 2000
8. Collins FC, Green ED, Guttmacher AE, Guyer MS: A vision for the future genomics research. Nature 422:835-847, 2003
9. Phillips JA: Genomic medicine: managing the complexity. JAMA 286: 1639, 2001
10. Guttmacher AE, Collins, FS: Genomic Medicine. N Engl J Med 19: 1512-1520, 2002
11. Marshall RP, Webb S, Bellingan GJ et. Al. Angiotensin Converting Enzyme Insertion/Deletion Polymorphism Is Associated with Susceptibility and Outcome in Acute Respiratory Distress Syndrome. Am J Respir Crit Care Med 166: 646-650, 2002
12. Weekers L, Bouhanick B, Hadjadj S et al. Modulation of the renal response to ACE inhibition by ACE insertion/deletion polymorphism during hyperglycemia in normotensive, normoalbuminuric type 1 diabetic patients. Diabetes. Oct;54(10):2961-7, 2005
13. Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F: PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). Nucleic Acids Res 20(6):1433, 1992

14. O'Donnell CJ, Lindpaintner K, Larson MG, et al: Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study. *Circulation* 97: 1766-1772, 1998
15. Taitinen L, Uhari M, Kontula K, et al: Angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism, angiotensinogen gene polymorphisms, family history of hypertension, and childhood blood pressure. *Am J Hypertens* 12: 858-866, 1999
16. Martínez E, Puras A, Escribano J, et al: Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphisms, serum ACE activity and blood pressure in a Spanish-Mediterranean population. *J Hum Hypertens*; 14: 131-135, 2000
17. Montgomery H, Brull D, Humphries SE: Analysis of gene-environment interactions by "stressing-the-genotype" studies: the angiotensin converting enzyme and exercise-induced left ventricular hypertrophy as an example. *Ital Heart J* 3: 10-14, 2002
18. Bengtsson K, Orho-Melander M, Lindblad U, et al: Polymorphism in the angiotensin converting enzyme but not in the angiotensinogen gene is associated with hypertension and type 2 diabetes: the Skaraborg Hypertension and diabetes project. *J Hypertens* 17: 1569-1575, 1999
19. Fujimura T, Yokota M, Kato S, et al: Lack of association of angiotensin converting enzyme gene polymorphism or serum enzyme activity with coronary artery disease in Japanese subjects. *Am J Hypertens* 10: 1384-1390, 1997
20. Poirier O, Georges JL, Ricard S, et al: New polymorphisms of the angiotensin II type 1 receptor gene and their associations with myocardial infarction and blood pressure: the ECTIM study. *Etude Cas-Témoin de l'Infarctus du Myocarde. J Hypertens* 16: 1443-1447, 1998
21. Hung J, McQuillan BM, Nidorf M, et al: Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and carotid wall thickening in a community population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 1969-1974, 1999
22. Pfohl M, Koch M, Prescod S, et al: Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism, coronary artery disease and myocardial infarction. An angiographically controlled study. *Eur Heart J* 20: 1318-1325, 1999
23. Zee RY, Ridker PM, Stampfer MJ, et al: Prospective evaluation of the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and the risk of stroke. *Circulation* 99: 340-343, 1999
24. Renner W, Pabst E, Paulweber B, et al: The angiotensin-converting-enzyme insertion/deletion polymorphism is not a risk factor for peripheral arterial disease. *Atherosclerosis* 165: 175-178, 2002
25. Poch E, La Sierra Ad A, González-Núñez D, et al: Genetic Polymorphisms of the renin-angiotensin system and essential hypertension. *Med Clin (Barc)* 118: 575-579, 2002
26. Keavney B, McKenzie CA, Connel JMC et al: Measured haplotype analysis of the angiotensin I-converting enzyme gene. *Hum Mol Genetics* 7(11):1745-1751, 1998
27. Foy CA, Rice GI, Ossei-Gerning N, Mansfield MW, Grant PJ: Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphisms in patients characterized by coronary angiography. *Hum Genet* 100(3-4):420-425, 1997
28. Zhu X, Bouzekri N, Southam L, et al: Linkage and association analysis of angiotensin I-converting Enzyme (ACE)-gene polymorphisms with ACE concentration and blood pressure. *Am J Hum Genet* 68:1139-1148, 2001

29. Kehoe PG, Katzov H, Feuk L et al: Haplotypes extending across ACE are associated with Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 12(8):859-867, 2003
30. Haiman CA, Henderson SO, Bretsky P, Kolonel LN, Henderson BE: Genetic variation in angiotensin I-converting enzyme (ACE) and breast cancer risk: the multiethnic cohort. *Cancer Res* 63(20):6984-6987, 2003
31. Koh WP, Yuan JM, Sun CL, van den Berg D, Seow A, Lee HP, Yu MC: Angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene polymorphism and breast cancer risk among Chinese women in Singapore. *Cancer Res* 63(3):573-578, 2003
32. Chou HT, Chen YT, Shi YR, Tsai FJ: Association between angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and mitral valve prolapse syndrome. *Am Heart J* 145(1):169-173, 2003
33. Liu KP, Lin CY, Chen HJ, Wei CF, Lee-Chen GJ: Renin-angiotensin system polymorphisms in Taiwanese primary vesicoureteral reflux. *Pediatr Nephrol* 19(6):594-601, 2004
34. Wu SF, Chang JS, Peng CT, Shi YR, Tsai FJ: Polymorphism of angiotensin-1 converting enzyme gene and Kawasaki disease. *Pediatr Cardiol* 25(5):529-533, 2004
35. Hsieh YY, Chang CC, Tsai FJ, Hsu CM, Lin CC, Tsai CH: Angiotensin I-converting enzyme ACE 2350\*G and ACE-240\*T-related genotypes and alleles are associated with higher susceptibility to endometriosis. *Mol Hum Reprod* 11(1):11-14, 2005
36. McKenzie CA, Sinsheimer JS, Adeyemo AA, et al: SNP haplotypes in the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene: analysis of Nigerian family data using gamete competition models. *Ann Hum Genet* 69(Pt 2):227-232, 2005
37. Vincent JL, Moreno R, Takala J, et al: The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 22(7):707-710, 1996
38. Doevdans PA, Jukema W, Spiering W, et al: Molecular genetics and gene expression in atherosclerosis. *Int J Cardiol* 80:161-172, 2001
39. Niu T, Chen X, Xu X: Angiotensin Converting Enzyme gene insertion/deletion polymorphism and cardiovascular disease. *Drugs* 62(76):977-993, 2002
40. Villard E, Tired L, Visvikis S, et al: Identification of new polymorphisms of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene, and study of their relationship to plasma ACE levels by two QTL segregation-linkage. *Am J Hum Genet* 58(6): 1268-1278, 1996
41. Wetmore JB, Johansen KL, Sen S, Hung AM, Lovett DH. An angiotensin converting enzyme haplotypes predicts survival in patients with end stage renal disease. *Hum Genet* 2006 Jun 22; [Epub ahead of print]
42. Lahiri DK, Nurnberger JI Jr: A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19(19):5444, 1991
43. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al: The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24:4876-4882, 1997
44. D'Avila LC, Albarus MH, Franco CR, Aguiar BB, Oliveira JR, [Dias FS](#), Alho CS. Effect of CD14 -260C>T polymorphism on the mortality of critically ill patients. *Immunol Cell Biol*, 84(3):342-348, 2006.

45. Ferreira FL, Bota DL, Bross A, Mélot C, Vincent JL: Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients JAMA 286(14):1754-8, 2001
46. Ceriani R, Mazzoni M, Bortone F, et al: Application of the Sequential Organ failure Assesment Score to cardiac surgery patients. Chest, 123: 1229-1239
47. Levy MM, Fink MP, Marshall JC et al: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med. Apr;31(4):1250-1256, 2003
48. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE: APACHE II: a severity of disease classification system. Crit Care Med 13(10):818-829, 1985
49. Chan YH. Biostatistics 203 – Survival analysis. Singapore Med J 45:249-256, 2004.
50. Guttmacher AE, Collins FS: Genomic Medicine – a primer. N Eng J Med 19:1512-1520, 2002
51. Phillips JA 3<sup>rd</sup>. Genomic medicine: managing the complexity. JAMA 286:1639, 2001
52. Wang DG, Fan JB, Siao CJ et al: Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. Science, 280: 1077-1082, 1998
53. Rupert JL, Devine DV, Monsalve MV, et al: Angiotensin-converting enzyme alleles in Quechua, a high altitude South American native population. Ann Hum Biol 26: 375-380, 1999
54. DeAngelis CD, Rosenberg RN, Smith JM: Genomic medicine and the individual patient. JAMA 284: 22-29, 2000
55. Sander C: Genomic medicine and the future of health care. Science, 287:1977-1978, 2000
56. Bailey D, Zanders E, Dean P: The end of the beginning for genomic medicine. Nat. Biotechnol 19:207-209, 2001
57. Guttmacher AE, Jenkins J, Uhlmann WR: Genomic medicine: who will practice it? A call to open arms. Am J Med Genet 106: 216-222, 2001
58. Collins FS, McKusick VA: Implications of the Human Genome Project for medical science. JAMA 285:540-544, 2001
59. Laurent S. Genotype interactions and intima-media thickness. J Hypertension 20:1477-1478, 2002
60. Wang JG, Stassen JA, Tizzoni L, et. Al. Renal function in relation to three candidate genes. Am J Kidney Dis 38:1158-1168, 2001
61. Balkestein EJ, Wang JG, Struijker-Boudier HA et al. Carotid and femoral intima-media thickness in relation to three candidate genes in a Caucasian Population. J Hypertension 20:1551-1561, 2002
62. Mayer G. ACE genotype and ACE inhibitor response in kidney disease: a perspective. Am J Kidney Dis. 40: 227-235, 2002.
63. Coll E, Campos B, Gonzales-Nuñez D et al. Association between the A1166C polymorphism of the angiotensin II receptor type 1 and progression of chronic renal insufficiency. J Nephrol 16:357-364, 2003.
64. Ha SK, Park HC, Park HS, et al. ACE gene polymorphism and progression of diabetic nephropathy in Korean type 2 diabetic patients: effect of ACE gene DD on the progression of diabetic nephropathy. Am J Kidney Dis, 41:943-949, 2003.

65. Ishimitsu T, Tsukada K, Ohta S, Inada H, Minami J, Ono H, Matsuoka H. Increased cardiovascular risk in long term hemodialysis patients carrying deletion allele of ACE gene polymorphism. *Am J Kidney Dis* 44:466-475, 2004
66. Genctoy G, Altun B, Kiykim AA et al. TNF alpha-308 genotype and rennin-angiotensin system in hemodialysis patients: an effect on inflammatory cytokine levels? *Artif Organs* 29:174-178, 2005
67. de Mendonca A, Vincent JL, Suter PM, Moreno R, Dearden NM, Antonelli M, Takala J, Sprung C, Cantraine F. Acute renal failure in the ICU: risk factors and outcome evaluated by the SOFA score. *Intensive Care Med* 26(7):915-21, 2000
68. Cappi SB, Sakr Y, Vincent JL. Daily evaluation of organ function during renal replacement therapy in intensive care unit patients with acute renal failure. *J Crit Care* 21(2):179-83, 2006
69. Janssens U, Graf C, Graf J, Radke PW, Konigs B, Koch KC, Lepper W, vom Dahl J, Hanrath P. Evaluation of the SOFA score: a single-center experience of a medical intensive care unit in 303 consecutive patients with predominantly cardiovascular disorders. *Sequential Organ Failure Assessment. Intensive Care Med* 26(8):1037-45, 2000
70. Jerng JS, Yu CJ, Wang HC, et al. Polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene affects the outcome of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 34:1001-1006, 2006



Table 1. Clinical characteristics of the patients among groups.

	Group 1 <sup>(i)</sup> (n=73)	Group 2 <sup>(i)</sup> (n=9)	Group 3 <sup>(i)</sup> (n=21)	Group 4 <sup>(i)</sup> (n=50)	p Value
<b>Sex (male/female)<sup>3</sup></b>	35/38	7/2	14/7	21/29	NS
<b>Age [years; mean ±SD] *<sup>1</sup></b>	51 ± 20.2	64.4 ± 19	62.4 ± 15.8	59 ± 18.3	0.018*
<b>APACHE II score [mean ±SD]*<sup>1</sup></b>	16.1 ± 6.3	22.2 ± 6.1	25.8 ± 6.1	23.9 ± 7.5	0.001*
<b>Septic Patients [n (%)]<sup>2</sup></b>	31 (42.5%)	6 (66.7%)	17 (81%)	43 (86%)	0.001*
<b>Septic Shock Patients [n (%)]<sup>2</sup></b>	13 (17.8%)	3 (33.3%)	15 (71.4%)	35 (70%)	0.001*
<b>ICU LOS [days; mean ± SD]<sup>1</sup></b>	14.6 ± 11.2	14.7 ± 11.2	16.4 ± 11.6	22.1 ± 16.3	0.018*
<b>Post-ICU LOS [days; mean ± SD]<sup>1</sup></b>	15.2 ± 21.6	18.9 ± 25.7	11.1 ± 21.5	11.6 ± 22.5	NS
<b>Hospital LOS [days; mean ± SD]<sup>1</sup></b>	37.6 ± 26.7	34.6 ± 25.3	42.3 ± 26.5	45.2 ± 28.8	NS
<b>ICU Outcome in first week [death; n (%)]<sup>2</sup></b>	0	0	2 (9.5%)	4 (8%)	NS
<b>ICU Outcome [death; n (%)]<sup>2</sup></b>	13 (17.8%)	3 (33.3%)	11 (54.2%)	28 (56%)	0.001*
<b>Hospital Outcome [death; n (%)]<sup>2</sup></b>	23 (31.5%)	5 (55.6%)	12 (57.1%)	37 (74%)	0.001*
<b>Day 1 Total SOFA score (0-24) [mean ± SD] *<sup>1</sup></b>	3.8 ± 1.7	4.9 ± 1.3	10.1 ± 2	9.3 ± 2.2	0.001*
<b>Day 1 Renal SOFA (0-4) [mean ± SD] *<sup>1</sup></b>	0.1 ± 0.6	2 ± 1.3	1.2 ± 1.2	1.4 ± 1.7	0.001*
<b>Need for Dialysis during first week</b>	0	1 (11.1%)	1 (4.8%)	7 (14%)	0.012*

n = Count Number; SD = Standard Deviation of the mean; APACHE-II = Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II; SOFA = Sequential Organ Failure Assessment; ICU = Intensive Care Unit; Hospital LOS: total hospital stay, including period before, during and after ICU stay; LOS = Length of stay;

<sup>1</sup> One-way ANOVA <sup>2</sup> Chi-Square Test \* Significance to p<0.05 (i) see material and methods for Groups description

Table 2. Genotypic, allele, and double genotypes frequencies of the I/D and -262A>T ACE polymorphisms studied Groups 1, 2, 3, and 4.

	Group 1 (n=73)	Group 2 (n=9)	Group 3 (n=21)	Group 4 (n=50)	Total (n=153)	p Value*
<b>Genotypes</b>						
II	0.178	0.111	0.190	0.160	0.167	NS
ID	0.452	0.333	0.571	0.420	0.462	
DD	0.370	0.556	0.238	0.420	0.372	
AA	0.301	0.333	0.333	0.200	0.275	NS
AT	0.548	0.222	0.619	0.600	0.575	
TT	0.151	0.444	0.048	0.140	0.150	
<b>Alleles</b>						
I	0.405	0.277	0.476	0.370	0.396	NS
D	0.595	0.723	0.524	0.630	0.604	
A	0.575	0.440	0.640	0.530	0.562	NS
T	0.425	0.560	0.360	0.470	0.438	
<b>Double Genotypes</b>						
II/AA	0.068	0.111	0.048	0.020	0.052	NS
II/AT	0.096	0	0.143	0.140	0.111	
II/TT	0.014	0	0	0	0.006	
ID/AA	0.178	0.111	0.238	0.140	0.170	
ID/AT	0.233	0	0.333	0.280	0.248	
ID/TT	0.041	0.222	0	0	0.033	
DD/AA	0.055	0.111	0	0.040	0.046	
DD/AT	0.219	0.222	0.190	0.240	0.222	
DD/TT	0.096	0.222	0.048	0.140	0.111	

NS: not significant; \* Chi-Square Test, comparing frequency of a same genotype among different groups.

Table 3. Cox proportional hazards regression model for mortality incorporating I/D and - 262A>T ACE polymorphisms

Variable	Hazard Ratio	Confidence Interval	Overall p value <sup>a</sup>
<b>Considering Groups 1 to 4</b>			0.41
I/D ACE genotype (II)*			0.47
ID	1.10	0.53-2.27	
DD	1.39	0.81-2.39	
- 262A>T ACE genotype (AA)*			0.69
AT	0.77	0.33-1.75	
TT	0.98	0.47-2.05	
<b>Age<sup>b</sup></b>	1.02	1.01-1.04	<b>0.0001</b>
Gender (male)*	1.19	0.71-1.98	0.496
Sepsis (negative)*	0.71	0.33-1.49	0.37
<b>Septic shock (negative)*</b>	0.40	0.19-0.84	<b>0.01</b>
Dialysis (negative)*			0.52
Continuous VVHD	0.31	0.03-2.72	
Intermittent VVHD	0.38	0.03-3.91	
<b>Without considering Groups 1 to 4</b>			
Pre-ICU LOS (days)	1.02	0.99-1.05	0.051
ICU LOS (days)	0.98	0.96-1.01	0.15
Hospital LOS (days)	0.98	0.95-1.01	0.22
Total SOFA (Day 1)	1.18	1.06-1.31	<b>0.0016</b>
Renal SOFA (Day 1)	0.99	0.79-1.24	0.97
Delta SOFA (7 <sup>th</sup> – 1 <sup>st</sup> )	1.36	1.03-1.80	<b>0.03</b>

\*Risk factor listed in parentheses; <sup>a</sup>Overall p value is for the term in the general model, not individual categories

<sup>b</sup>years; LOS: Length of Stay.

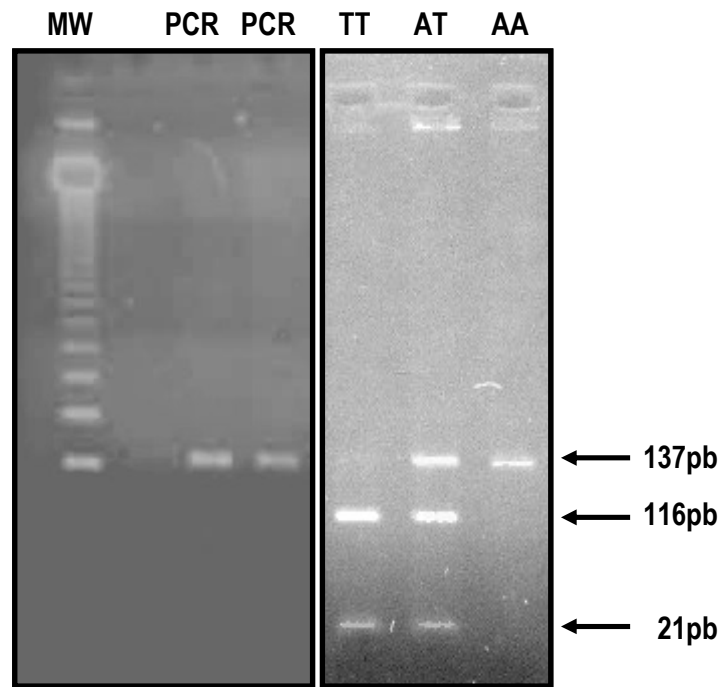


Figure 1 – Electrophoresis image from a representative sample in 3% agarose gel: MW, banding pattern from a 123bp molecular weight marker (GibcoBRL®-Life Technologies™, Rockville, MD, USA); PCR, amplified product with 137bp; TT, banding pattern for TT homozygous (116bp and 21bp fragments); AT, banding pattern for heterozygous (137bp, 116bp, and 21bp fragments); AA, banding pattern for AA homozygous (137bp fragment). Scale of the fragments is on the right

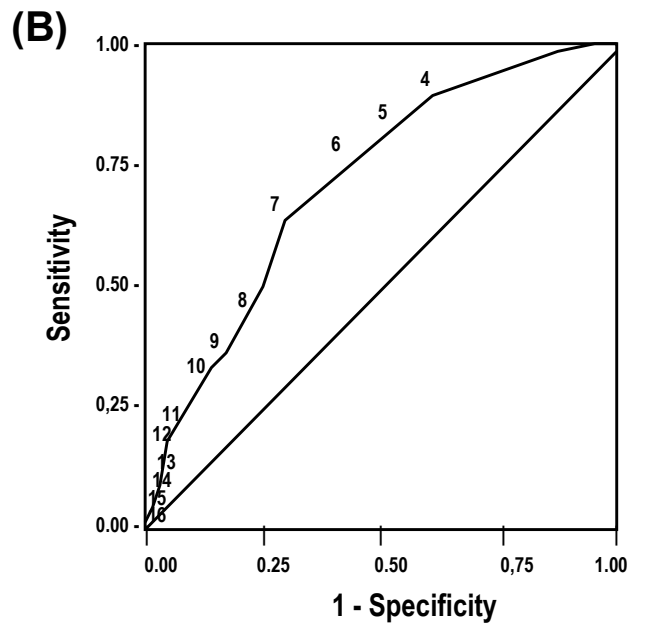
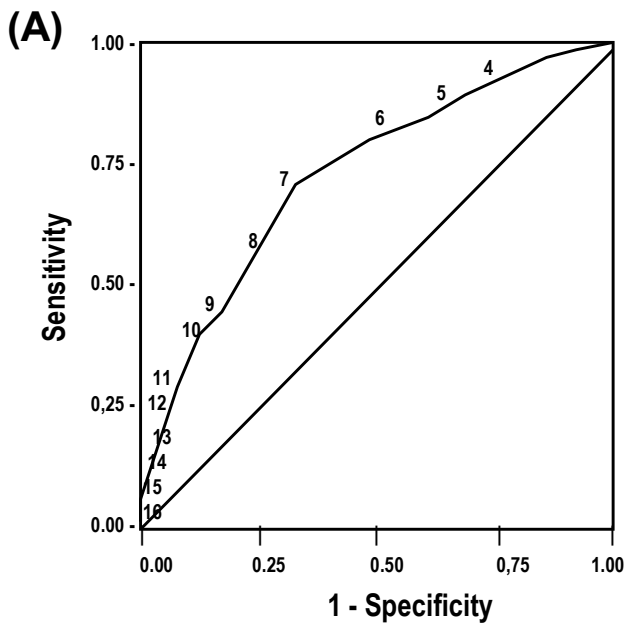
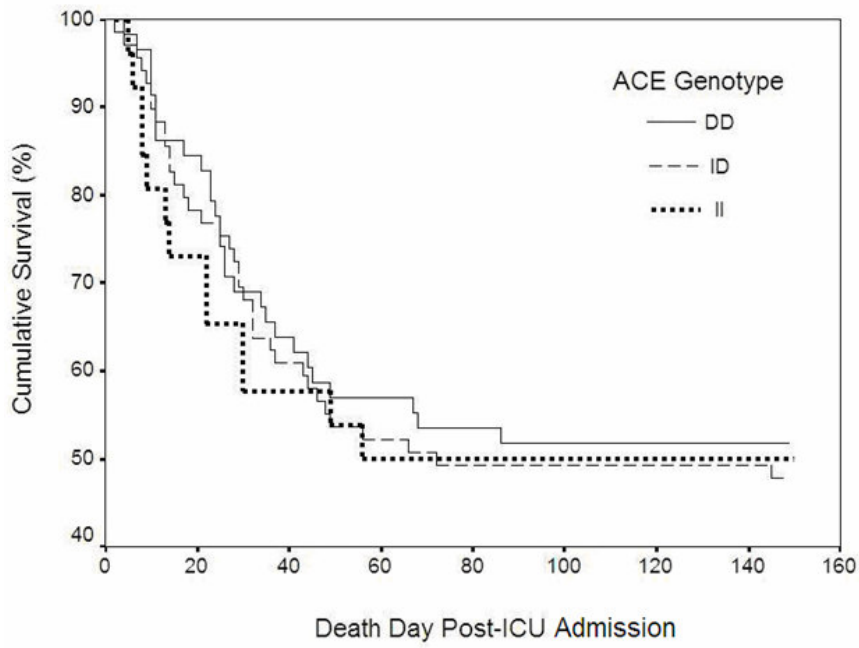


Figure 2. ROC Curve for day 1 total SOFA score: sensibility and specificity of ICU (A) and Hospital (B) mortality (Diagonal segments are produced by ties).

(A)



(B)

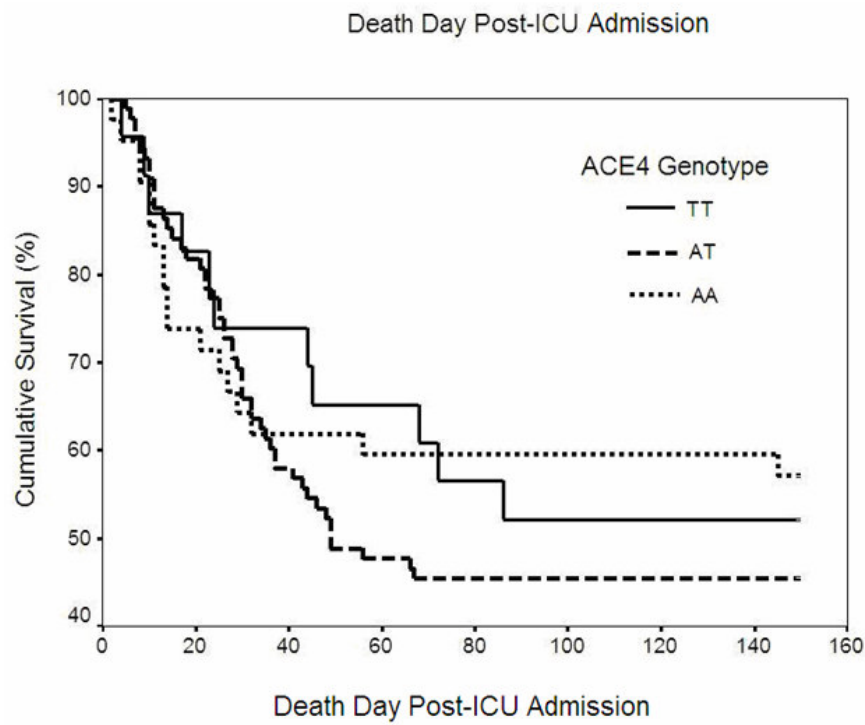


Figure 3. Kaplan-Meier survival curves for I/D (A) and -262A>T (B) ACE polymorphisms.

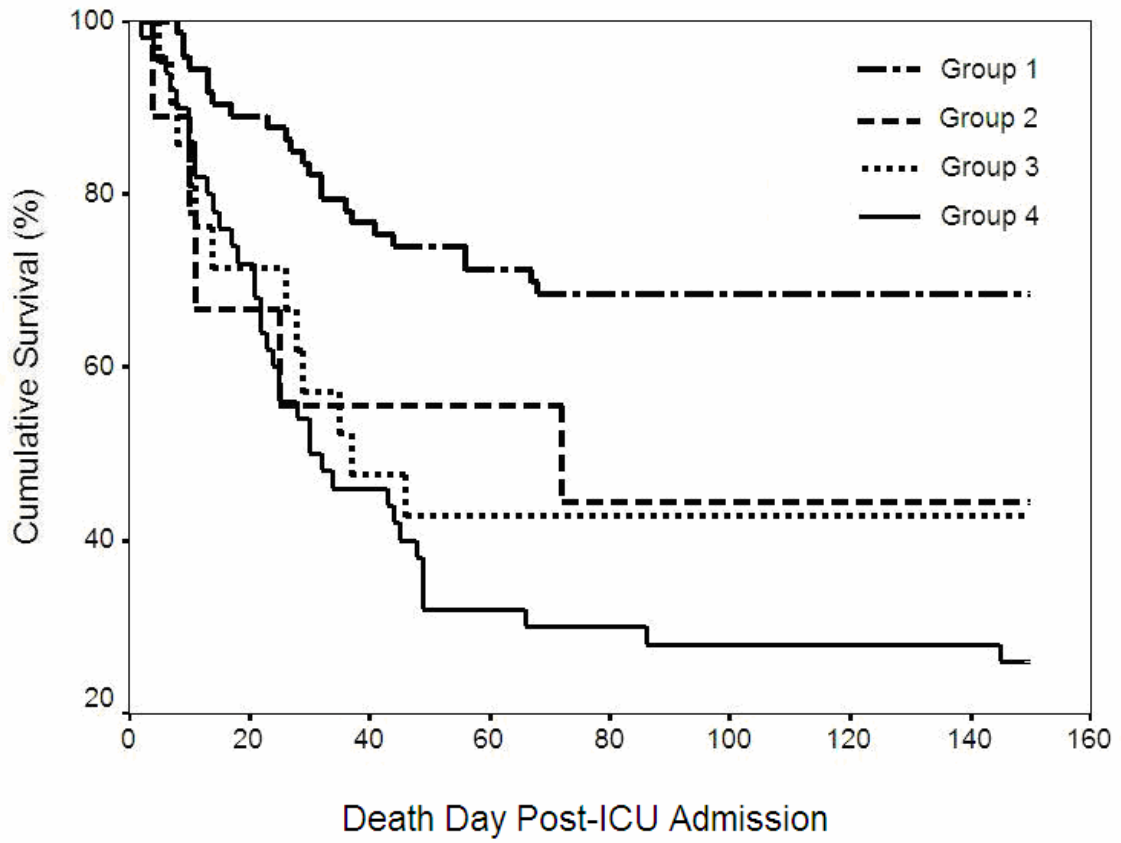


Figure 4. Kaplan-Meier survival curves for considered Groups 1, 2, 3 and 4.

## Considerações Finais

Nos últimos séculos, ocorreram mudanças no comportamento sociocultural do homem cujas conseqüências afetaram diretamente a prevalência de algumas doenças, as causas de morte e a expectativa de vida do ser humano. Tal fato pode permitir que mutações não-letais passem a produzir manifestação fenotípica identificável.

Em qualquer trabalho desenvolvido entre pacientes de Unidade de Terapia Intensiva (UTI), a análise dos dados é complexa, pelo fato de serem pacientes instáveis, com diversas causas de admissão e com evoluções variáveis. Uma estratégia para uniformizar a análise dos dados obtidos a partir destes indivíduos é a adoção de escores padronizados, que permitem uma análise coletiva de casos que individualmente são tão específicos. O trabalho conseguiu demonstrar significativa correlação entre estes escores adotados com os desfechos de interesse (óbito e disfunção renal).

Embora haja registro de interferência da herança diferencial das variantes polimórficas I/D e -262A>T na literatura em muitos desfechos que dependem da homeostasia vascular entre humanos, não ficou definitivamente demonstrado neste trabalho sua influência direta sobre os desfechos de morbimortalidade.

O ineditismo deste trabalho reside em ser este o primeiro estudo, conforme revisão procedida na literatura recente, que apresenta uma investigação da variante polimórfica -262A>T do gene ACE e sua tentativa de correlação com um desfecho nefrológico importante, como a progressão da função renal ao longo da primeira semana de internação, fase crítica para os doentes admitidos em Unidade de Terapia Intensiva. Além disso, um aprimoramento da técnica, originalmente desenvolvido pelo grupo, para a genotipagem do polimorfismo -262A>T, foi aplicado com sucesso, eliminando passo previamente exigido em outros trabalhos da literatura para o estudo deste polimorfismo. A melhora logística e redução de emprego de insumos para determinação do mesmo incentiva do ponto de vista técnico outras pesquisas com este mesmo enfoque.

Embora a correlação entre polimorfismos e quadros clínicos complexos seja desafiadora, trabalhos nesta direção aproximam a Genética da bancada do Médico, e as perspectivas apontam que a identificação de um pool de polimorfismos candidatos poderá vir a ser tão importante nas decisões terapêuticas imediatas quanto às análises bioquímicas tradicionais. O futuro nos dirá.