



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Faculdade de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

TESE DE DOUTORADO

**POLIMORFISMO I/D DO GENE ECA EM PACIENTES COM SÍNDROME DA
ANGÚSTIA RESPIRATÓRIA AGUDA (SARA)**

PÓS-GRADUANDO

Fernando Suparregui Dias, MD, MsC

ORIENTADOR

CLARICE SAMPAIO ALHO

Porto Alegre, RS

Dezembro, 2007

A minha mãe

Pela sua visão e determinação, meu reconhecimento e gratidão.

Aos meus filhos Rafael, Kelli e Fernando

O meu carinho e respeito pela força que emana dos elos que nos unem.

À Simone

Pelo carinho e paciência ao partilhar comigo esta jornada.

Agradecimentos

A minha orientadora, Professora Doutora Clarice Sampaio Alho, pelo apoio constante e a inestimável ajuda na concretização deste projeto.

À médica Fernanda Stringhi e à Acadêmica de Medicina Michelle Eidt pela colaboração e dedicação diária para a coleta dos dados contidos nesta tese.

Aos bolsistas do LabGen Pietra Graebin, Diego d'Avila Paskulin e Francis Jackson de Oliveira Paludo pelo valioso auxílio na extração de DNA e genotipagem.

Ao colega Rodrigo Duquia pelas excelentes sugestões e pelo suporte na análise estatística.

Aos Biólogos Cladinara Sarturi, José Luis Ferraro e Bibiana Butkus pela paciência e competência em auxiliar no entendimento de técnicas de biologia molecular.

Aos médicos da UTI Geral do Hospital São Lucas da PUCRS pelo suporte durante o período de minha pós-graduação.

Aos enfermeiros da UTI Geral do HSL-PUCRS pela valiosa colaboração na coleta de material para análise genômica.

Às secretárias Luisa Moreira e Catia Bonacina pelo modo prestativo, gentil e competente em me auxiliar em todos os trâmites acadêmicos.

Índice

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. CAPÍTULO 1	3
1.1 INTRODUÇÃO	3
Crériterios Diagnósticos e Epidemiologia	4
Classificação	6
Fisiopatologia	7
Impacto da Genética na LPA e SARA	9
O Sistema Renina-Angiotensina	13
O Gene ECA	14
O Efeito da Inserção Alu no Intron 16: O Polimorfismo I/D	16
Polimorfismo I/D do Gene ECA	17
Referências Bibliográficas	20
1.2 OBJETIVOS	27
Objetivos e Hipótese	29
2. CAPÍTULO 2	30
ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME (ACE) INSERTION/DELETION POLYMORPHISM AND ARDS IN A SOUTH BRAZILIAN ICU	31
2.1 Abstract	32
2.2 Introduction	33
2.3 Subjects and Methods	35
2.4 Results	37
2.5 Discussion	38
2.6 References	40
2.7 Tables and Figure	46
3. CAPÍTULO 3	50
3.1 Considerações Finais	51
4. ANEXOS	53
TCLE	54
Carta de aceite pelo CEP PUCRS	58
Ficha de coleta de dados	60
Lista de abreviaturas	65
Carta de recebimento do Periódico Intensive Care Medicine	67

Resumo

O presente estudo tem como objetivo estudar a associação entre o polimorfismo I/D do gene ECA com a susceptibilidade e mortalidade relacionada à SARA, em uma população de pacientes críticos no sul do Brasil.

Todos os pacientes críticos admitidos na UTI Geral do Hospital São Lucas da PUCRS entre janeiro de 2004 e junho de 2006 foram candidatos à pesquisa, dos quais foram arrolados 400 indivíduos. O paciente foi considerado como tendo **síndrome da angústia respiratória aguda** (SARA) ao preencher os critérios do Consenso Americano-Europeu em qualquer momento da internação na UTI.

De cada paciente foram retirados 5mL de sangue para obtenção de DNA e genotipagem do polimorfismo I/D do gene ECA.

A incidência de SARA foi de 11,8%. Os pacientes com SARA foram mais jovens do que os sem SARA ($p=0,0001$). O escore APACHE II da admissão foi semelhante nos grupos de pacientes com ($19,3\pm 6,85$) e sem SARA ($19,4\pm 8,14$), e o grau de disfunção orgânica determinado pelo escore SOFA foi maior entre os pacientes sem SARA no primeiro dia ($p=0,007$) e depois, durante a primeira semana, entre os pacientes com SARA (dia 2 até dia 7, $p=0,009$; $p=0,003$; $p=0,003$; $p=0,001$; $p=0,004$; $p=0,04$, respectivamente). Este estudo não encontrou nenhuma associação entre o polimorfismo I/D do gene ECA e a susceptibilidade à SARA ou à mortalidade. A mortalidade na UTI e na internação hospitalar foi de 42,5% e de 48,9%, respectivamente.

Abstract

The aim of this study was to determine if the polymorphism I/D of the angiotensin converting enzyme (ACE) gene is associated with susceptibility for and mortality related to acute respiratory distress syndrome (ARDS) in a population of critically ill patients in South Brazil.

A cross-sectional study was conducted of consecutive, critically ill patients, admitted to the General ICU in Porto Alegre, Brazil, between January, 2004 and June, 2006.

Four hundred consecutive, critically ill patients were enrolled. A patient was considered having ARDS if he/she had criteria according the American-European Consensus Conference, anytime during the ICU stay.

Interventions: A blood sample (5 ml) was drawn for genotyping I/D ACE gene polymorphism.

The incidence of ARDS was 11.8%. Patients with ARDS were younger than non-ARDS patients ($p < 0.0001$). The APACHE II score was similar in both groups, and the level of organ dysfunction determined by the SOFA score was higher in non-ARDS patients on the first day ($p = 0.007$), and thereafter, higher in the ARDS group (day 2 to day 7, $p = 0.009$; $p = 0.003$; $p = 0.003$; $p = 0.001$; $p = 0.004$; $p = 0.04$, respectively). We were unable to find any association between the I/D polymorphism of ACE gene and susceptibility or mortality in ARDS and non-ARDS patients. ICU and hospital mortality in ARDS patients was 42.5% and 48.9%, respectively.

Capítulo 1

1.1 Introdução

Cr terios Diagnósticos e Epidemiologia

A Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA) caracteriza-se por edema pulmonar devido   intensa resposta inflamatória, o que acarreta altera es significativas na oxigena o e mecânica respiratória (Ashbaugh *et al*, 1967; Bernard *et al*, 1994). A descri o inicial de SARA foi em um grupo de 12 pacientes com insuficiência respiratória de início agudo, hipoxemia e redu o da complacência pulmonar após uma variedade de estímulos como politrauma, pancreatite aguda, contusão pulmonar, embolia gordurosa, pneumonia e aspira o de conteúdo gástrico (Ashbaugh *et al*, 1967). Durante muitos anos várias denomina es e inúmeros cr terios dificultaram a uniformidade na descri o desta síndrome, o que retardou uma melhor compreensão de sua epidemiologia (Krafft *et al*, 1996; Garber *et al*, 1996). Em 1988, chegou a ser proposta uma amplia o dos cr terios de SARA (Murray *et al*, 1988), gerando um escore chamado LIS (*lung injury score*), muito utilizado para estratificar a gravidade da lesão pulmonar. Este escore considera aspectos radiológicos, a fra o inspirada de oxig nio (FiO_2), o nível de pressão positiva ao final da expira o (PEEP) e a complacência pulmonar.

Em 1994 a Conferência de Consenso Americana-Européia estabeleceu cr terios de SARA com base em quatro variáveis: início da lesão pulmonar, oxigena o, achados radiológicos e ausência de manifesta es de insuficiência cardíaca (Bernard *et al*, 1994) que permitiu a realiza o de estudos epidemiológicos globais e uma melhor compreensão de sua distribui o em diferentes países e grupos de pacientes (Zilberberg *et al*, 1996; Luhr *et al*, 1999; Bersten *et al*, 2002; Dias *et al*, 2002; Fialkow *et al*, 2002; Goss *et al*, 2003; Brun-Buisson *et al*, 2004; Rubenfeld *et al*, 2005).

Em uma coorte de 107 pacientes clínicos com lesão pulmonar aguda (LPA), a incidência de SARA foi de 76%. Através de análise multivariada, esses autores mostraram haver rela o com a mortalidade as seguintes variáveis: idade acima de 65 anos, transplante de órgãos, infec o pelo HIV, câncer, cirrose e sepse. A mortalidade neste grupo foi de 58% (Zilberberg *et al*, 1998). Um estudo realizado na Escandinávia, avaliou prospectivamente durante oito semanas, todos os pacientes admitidos em 132 UTIs da Suécia, Dinamarca e Islândia. De 13.346 pacientes com idade superior a 15 anos incluídos, 1.231 apresentaram insuficiência respiratória aguda (IRA), 287 apresentaram

LPA e 221 apresentaram SARA. A incidência de LPA e SARA foi 17,9 e 13,5 por 100.000 habitantes/ano, respectivamente (Luhr *et al*, 1999).

Recentemente, um estudo multicêntrico em 10 países europeus mostrou uma incidência de LPA de 7,1% (n = 463) em uma população de 6.522 indivíduos admitidos em UTI. Um fato interessante deste estudo é que destaca o aspecto dinâmico do *continuum* da LPA, com aproximadamente 2/3 dos pacientes evoluindo para SARA durante a internação. A mortalidade hospitalar de 55% foi relacionada à idade, à gravidade da doença aguda e à disfunção orgânica (Brun-Buisson *et al*, 2004). Nos EUA, um estudo aponta para incidência de LPA de 78,9 e de SARA de 58,7 por 100.000 pessoas/ano, com mortalidade de 38,5% e 41,1%, respectivamente. O fator de risco mais freqüente para o desenvolvimento de LPA foi sepse, principalmente quando o foco é pulmonar e a idade foi um importante fator relacionado ao aumento de mortalidade (Rubenfeld *et al*, 2005). De acordo com informações do banco de dados do ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome) Network, onde foram incluídos 7.455 pacientes de 20 hospitais, a incidência da LPA nos EUA é estimada em 64,2 por 100.000 pessoas/ano (Goss *et al*, 2003).

Na Austrália, a incidência de LPA e SARA é de 34 e 28 casos por 100.000 habitantes/ano, com uma mortalidade de 32% e 34%, respectivamente (Bersten *et al*, 2002). Na América do Sul, a incidência de SARA varia entre 2,3% e 7,7% (Fialkow *et al*, 2002; Dias *et al* 2002; Estenssoro *et al*, 2002). Em uma população de 2.182 indivíduos admitidos na UTI Geral do Hospital São Lucas da PUCRS, entre janeiro de 1997 e setembro de 2001 a incidência de SARA foi de 6.46%, com uma mortalidade de 79%. Esta mortalidade elevada poderia ser conseqüência da predominância de sepse e de choque séptico como fatores de risco e da gravidade da lesão pulmonar avaliada pelo escore LIS (Dias *et al*, 2002).

Classificação da Lesão Pulmonar

Duas barreiras separam a membrana alvéolo-capilar, o endotélio microvascular e o epitélio alveolar (Ware & Matthay, 2000). De acordo com o lado da barreira alvéolo-capilar lesado inicialmente, a SARA pode ser classificada em pulmonar ou primária e extrapulmonar ou secundária. Na SARA pulmonar, a primeira estrutura a ser lesada é o epitélio alveolar, o que leva à ativação dos macrófagos alveolares e da cascata inflamatória, produzindo um quadro de inflamação pulmonar. O dano epitelial provoca alterações no espaço intra-alveolar como edema, deposição de fibrina e colágeno, agregados de neutrófilos e/ou sangue. Na SARA extrapulmonar, a lesão pulmonar é provocada por mediadores inflamatórios produzidos na circulação sistêmica, distante do pulmão. A primeira estrutura a ser lesada, nesse caso, é o endotélio vascular, havendo recrutamento de monócitos, leucócitos, plaquetas e outras células. A alteração patológica devida à SARA extrapulmonar é a congestão microvascular e o edema intersticial (Pelosi *et al*, 2001). A relevância clínica do tipo de SARA tem sido motivo de debate em função da mortalidade (Callister *et al*, 2002). Quando a sepse é o fator etiológico associado, mostra um pior desfecho do que o trauma, inclusive com aumento na mortalidade em uma avaliação comparativa de um mesmo centro ao longo de uma década (Pola *et al*, 2000).

Na tentativa de estabelecer diferenças na mecânica respiratória entre SARA pulmonar e extrapulmonar, foram estudados 21 pacientes, 12 com lesão primária e 9 com lesão secundária. O principal achado foi que os pacientes com SARA pulmonar apresentaram pulmões menos complacentes, sem resposta ao uso de PEEP, enquanto que os com SARA extra-pulmonar tinham um aumento de rigidez da caixa tóraco-abdominal e pulmões mais complacentes, melhorando com o emprego de PEEP. Os autores postulam que haveria dois tipos de resposta na mecânica pulmonar de acordo com a lesão, primária ou secundária (Gattinoni *et al*, 1998). Outro estudo procurou estabelecer diferenças entre SARA pulmonar e extra-pulmonar com base no diagnóstico por imagem radiológica. Os autores encontraram um padrão assimétrico na SARA pulmonar, consolidações entremeadas com lesões do tipo *vidro moído*, enquanto que a

SARA extrapulmonar apresenta predomínio de lesões do tipo *vidro moído* (Goodman *et al*, 1999).

Entretanto, a mortalidade atribuída à SARA pulmonar e extrapulmonar varia consideravelmente (Callister *et al*, 2002), com alguns estudos mostrando apenas uma tendência de aumento na SARA pulmonar (Lim *et al*, 2001; Sunthralingam *et al*, 2001).

Fisiopatologia

A fase aguda da SARA caracteriza-se por edema alveolar rico em proteína em decorrência do aumento da permeabilidade alvéolo-capilar (Ware & Matthay, 2000; Ware & Bernard, 2005).

Os mecanismos pelos quais o endotélio vascular e o epitélio alveolar são lesados são múltiplos, dependendo do tipo da lesão inicial (Ware & Bernard, 2005), entre os quais o estresse produzido pela ventilação mecânica, que provoca uma resposta inflamatória, evidenciada pelo infiltrado de neutrófilos nos pulmões, pelo aumento nos níveis de mediadores inflamatórios e pela propagação da cascata inflamatória (Villar, 2002).

Os mediadores da LPA e SARA podem ser agrupados em humorais e celulares. Os principais mediadores humorais são as citocinas, os eicosanóides, o fator de agregação plaquetária, os radicais livres de oxigênio (RLO₂), as proteases, os produtos da coagulação, os fatores de crescimento e os fatores estimuladores de colônia. Entre os mediadores celulares, os neutrófilos, os macrófagos, as células endoteliais, os pneumócitos tipo II, os fibroblastos e os linfócitos são os principais envolvidos no processo de inflamação e reparo (Günther *et al*, 2001).

Os eventos intermediários que ocorrem entre a recepção de um sinal biológico na membrana celular e a eventual conversão deste sinal em alteração na expressão gênica no nível nuclear, é um importante fator nos mecanismos de regulação da resposta inflamatória. Nesse cenário, o NF- κ B desempenha um papel de extrema importância. O NF- κ B regula a expressão de inúmeros genes envolvidos na inflamação, na imunidade e no crescimento celular, como o TNF- α , interleucinas (IL), proteína inibitória de macrófagos 1 α (MIP-1 α), fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) e

macrófagos (M-CSF), moléculas de adesão e outros elementos como óxido nítrico sintase induzível (iNOS), proteína C reativa e ciclo-oxigenase 2 induzível. De modo semelhante ao NF- κ B, a família de proteínas AP-1 (*activating proteins 1*) desempenha um papel importante na inflamação, na proliferação celular e na apoptose (Shanley & Wong, 2001).

O aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , IL-1 e a IL-8, é um evento importante que ocorre precocemente na SARA. Esses mediadores são importantes para a ativação e preparo dos neutrófilos para sua interação com o endotélio ativado. Os níveis de TNF- α estão elevados precocemente na SARA, podendo desencadear a degranulação dos neutrófilos e a síntese de proteases e formação de RLO₂. Além dessas alterações pró-inflamatórias, pode haver falha na expressão e síntese de citocinas anti-inflamatórias como a IL-4, IL-10 e IL-13. A combinação dessa resposta agrava a resposta inflamatória e a gravidade da evolução clínica (Günther *et al*, 2001).

Os mediadores lipídicos como os eicosanóides, os leucotrienos e o fator de agregação plaquetária (FAP) desempenham um importante papel na evolução da LPA e da SARA. O leucotrieno B4 (LTB₄) tem uma potente quimiotaxia para os neutrófilos aumenta a permeabilidade vascular e promove intensa vasoconstrição. O tromboxano A₂ (TxA₂) induz à vasoconstrição, enquanto a prostaciclina (PGI₂) e a prostaglandina E (PGE) são potentes vasodilatadores. O FAP induz a broncoespasmo e à vasoconstrição (Günther *et al*, 2001).

A geração de RLO₂ deriva principalmente dos neutrófilos ativados, podendo resultar em oxidação do DNA, de proteínas e de lipídeos, o que contribui para a degradação do parênquima pulmonar (Günther *et al*, 2001).

O endotélio e o epitélio são capazes de sintetizar quantidades significativas de fatores pró-coagulantes e anti-fibrinolíticos em condições de inflamação ou sepse. No lado endotelial, a expressão do fator tecidual está aumentada e a expressão e a síntese do inibidor 1 do ativador do plasminogênio também está aumentada. A trombomodulina, que em condições fisiológicas é expressa de modo intenso na circulação pulmonar, está significativamente reduzida na sepse e na SARA, prejudicando a capacidade dos pulmões em degradar rapidamente a trombina. A ativação da cascata da coagulação pode resultar

em microtrombose e microembolia, acarretando mais dano funcional ao paciente com SARA (Günther *et al*, 2001).

Impacto da Genética na LPA e SARA

Uma questão importante na LPA e na SARA é por que alguns pacientes morrem como resultado de uma inflamação descontrolada ou por sepse, enquanto outros se recuperam sem maiores problemas? Estudos epidemiológicos indicam que a incidência e o desfecho da SARA depende parcialmente da natureza da doença precipitante e da suscetibilidade individual (Villar, 2002), porém marcadores de suscetibilidade poderão indicar diferenças entre indivíduos ou populações, responsáveis pela resposta ao estímulo inflamatório (Villar *et al*, 2003).

Os eventos celulares envolvidos na mediação da inflamação, na lesão tecidual e no reparo são controlados em nível molecular, não podendo ser totalmente explicados sem se considerar a função dos genes participantes nesta resposta e seus produtos (Villar & Siminovitch, 1999). Em estudos experimentais foi demonstrado que a VM com volume corrente (VC) elevado causa a expressão de genes de mediadores pró-inflamatórios (Copland *et al*, 2003). Existem evidências de que a resposta imune humoral e celular é objeto de controle genético polimórfico, o que poderia explicar a diversidade de manifestações, e desfechos e de risco de tornar-se crônica entre pacientes com a mesma doença. Isso se deve a polimorfismos gênicos, os quais são variantes de genes, em pelo menos 1% da população (Villar, 2002).

A conclusão da seqüência do genoma humano catalogou mais de 1.4 milhões de polimorfismos de um nucleotídeo único (SNP – *single nucleotide polymorphism*), com a maioria das variações ocorrendo em regiões do genoma que não codificam para produtos protéicos (The International SNP Map Working Group, 2001). Quando estes SNPs ocorrem em regiões que codificam proteínas, podem afetar a função ou a eficiência desta proteína ou de um gene (Burke, 2003).

A abordagem genética do polimorfismo de genes que são importantes para a fisiologia normal, levou alguns autores a propor uma avaliação genética em pacientes com risco de desenvolver LPA/SARA, poderia estabelecer graus de predisposição

genética. A associação entre variantes funcionais de um gene responsável pela síntese de um mediador pró-inflamatório e o fenótipo clínico, poderia auxiliar na identificação de importantes processos fisiopatológicos durante o curso da doença (Villar, 2002). Na presente década, alguns genes candidatos foram estudados em pacientes com LPA e SARA [Marshall *et al*, 2002 (ECA); Medford *et al*, 2005 (FCEV); Gong *et al*, 2005 (TNF α -308G>A e TNFB 1/2); Frerking *et al*, 2005 (-26G>A CC16); Jerng *et al*, 2006 (ECA); Gong *et al*, 2007 (MBL-2); Zhai *et al*, 2007 (NFBIA); Bajwa *et al*, 2007 (FEPB -1001T>G e -1543C>T); Adamzik *et al*, 2007 (NFKB1)], mostrando que a biologia molecular através da determinação da predisposição genética, é uma ferramenta importante na identificação da população de pacientes críticos de risco para o desenvolvimento e mortalidade na LPA e SARA.

Sendo a SARA uma condição que cursa com edema pulmonar por aumento de permeabilidade, o efeito do fator de crescimento do endotélio vascular (FCEV), um potente vasodilatador, foi investigado. O FCEV apresenta um polimorfismo 936 C>T, o qual foi estudado para determinar sua participação na suscetibilidade genética da SARA. Um total de 137 indivíduos normais e 220 pacientes submetidos à VM foi avaliado prospectivamente. Os pacientes em VM foram agrupados em: com risco para SARA (n=103) e com SARA (n=112), e 5 foram excluídos da análise. Os genótipos CT e TT foram significativamente mais freqüentes nos pacientes com SARA do que no grupo normal (p=0,02) e no grupo de risco para SARA (p=0,03). O alelo T ocorreu com maior freqüência no grupo com SARA (p=0,04) em comparação com os outros grupos. Não houve diferença na mortalidade entre o grupo de risco para SARA e o grupo com SARA, entretanto os pacientes com SARA e genótipo CT e TT apresentaram escore APACHE III maior do que os com genótipo CC (p < 0,05). Estes achados sugerem que existe associação do alelo T com suscetibilidade para SARA e distúrbios fisiológicos, conforme evidenciado pelo escore APACHE III (Medford *et al*, 2005).

O polimorfismo do gene da proteína B do surfactante pulmonar (SB-P) em pacientes com risco para LPA primária e SARA também foi estudado. O surfactante pulmonar é sintetizado principalmente pelos pneumócitos tipo II e age reduzindo a tensão superficial nos alvéolos, o que permite a expansão normal dos pulmões. Além

disso, o surfactante possui propriedades imunológicas, favorecendo a fagocitose e a quimiotaxia dos macrófagos alveolares (Gong *et al*, 2004).

Em uma coorte de 189 pacientes com fatores de risco para SARA, 72 (38%) desenvolveram a síndrome, sendo a incidência maior nos indivíduos admitidos na UTI com choque séptico e aspiração pulmonar. Trinta e sete indivíduos (20%) possuíam **uma variante** do genótipo SB-P com uma frequência do alelo de 0.10. Após estratificação de acordo com o sexo, houve um aumento significativo na **razão de possibilidades** para a ocorrência de SARA em mulheres com a variante mutante do alelo SB-P de 4.5 (IC, 1.1-18.8; $p=0,03$), o que não ocorreu nos homens (Gong *et al*, 2004).

Um polimorfismo -26G>A na região que codifica para proteína 16 das células claras (CC16) foi associado à redução dos níveis séricos de CC16 em pacientes com asma (Liang *et al*, 1998). A CC16 exerce inibição potente da quimiotaxia dos neutrófilos e atividade da fosfolipase A_2 (Nagase *et al*, 2000). O polimorfismo CC16 -26G>A foi estudado em uma população de 117 pacientes com SARA e 373 indivíduos saudáveis. Não houve diferença nas frequências dos genótipos da proteína CC16 entre os pacientes com SARA e os indivíduos saudáveis, levando os autores a concluir que este polimorfismo não afeta a suscetibilidade e o desfecho da SARA (Frerking *et al*, 2005).

Os polimorfismos -308G>A e TNFB1/2 do gene do FNT- α têm sido associados à suscetibilidade para a ocorrência e mortalidade na sepse (Mira *et al*, 1999). Em outro estudo, a influência do polimorfismo -308G>A na suscetibilidade para SARA foi heterogênea e dependente do tipo de lesão pulmonar, primária ou secundária. A mortalidade em 60 dias mostrou diferença estatisticamente significativa dependente da herança genética em relação ao SNP -308 G>A ($p=0,01$), especialmente no grupo de pacientes com idade inferior a 67 anos. O polimorfismo TNFB1/2 não mostrou associação com mortalidade (Gong *et al*, 2005).

A MBL (*mannose binding lectin*) é uma proteína de reconhecimento padrão, importante na ativação do sistema complemento e opsoninas indutoras de fagocitose (Gadjeva *et al*, 2004). A proteína MBL é codificada pelo gene MBL-2 (*mannose binding lectin-2*), situado no cromossomo 10. Os níveis de MBL circulantes são dependentes de três SNPs nos codons 52 (db SNP ID rs5030737), 54 (db SNP ID rs 1800450) e 57 (db

SNP ID rs 1800451), no exon 1 e um SNP na posição -221 (MBLXY; db SNP ID rs7096202) (Turner, 2003). As variantes alélicas do exon 1 são conhecidas como D, B e C, respectivamente, enquanto o alelo selvagem é conhecido como A. As variantes alélicas no exon 1 e o alelo X no polimorfismo MBLXY estão associados com deficiência nos níveis séricos de MBL, em particular os indivíduos homocigotos para as variantes alélicas raras (Garred *et al*, 1999). Um estudo de casos e controles avaliou 212 pacientes caucasianos com SARA e 442 controles, tendo como hipótese de que o alelo X do polimorfismo MBLXY e as variantes D, B e C dos codons 52, 54 e 57 do gene da MBL2, associam-se ao aumento da suscetibilidade e da mortalidade na SARA (Gong *et al*, 2007). Os pacientes homocigotos para a variante alélica 54B (54BB) tinham maior gravidade na admissão, maior probabilidade de choque séptico e SARA, em comparação com os heterocigotos e homocigotos para o alelo selvagem. A associação com SARA foi especialmente marcada nos pacientes com choque séptico. Nos pacientes que desenvolveram SARA, o genótipo 54BB associou-se a maior número de disfunções orgânicas e mortalidade (Gong *et al*, 2007).

Como anteriormente citado, o NF- κ B é um fator de transcrição que quando se liga a sítios chaves do DNA, regula a expressão de vários genes envolvidos na inflamação, na imunidade, no crescimento celular e na apoptose (Shanley & Wong, 2001). Em células não estimuladas o NF- κ B está presente em sua forma inativa no citoplasma ligado ao seu inibidor I- κ B (NFKBIA). Quando ocorre estimulação, o NFKBIA é rapidamente degradado, liberando ou translocando o NF- κ B no núcleo e ativando os genes alvo (Christman *et al*, 2000). Foram identificados três SNPs nas posições -881, -826 e -297 no promotor do gene do NFKBIA (Mozzato-Chamay *et al*, 2001). Um estudo avaliou 1.210 pacientes caucasianos críticos com fatores de risco para o desenvolvimento de SARA, acompanhados prospectivamente durante 60 dias. Em 382 pacientes houve a ocorrência de SARA e 828 serviram como controles. Nenhum polimorfismo individualmente associou-se ao desenvolvimento de SARA, porém os haplótipos do gene NFKBIA associaram-se globalmente com a ocorrência de SARA, em particular o haplótipo GTC, em pacientes masculinos e com lesão pulmonar direta (Zhai *et al*, 2007).

Um polimorfismo I/D no promotor do NFkB1 foi estudado visando estabelecer associação com a gravidade e mortalidade na SARA. A gravidade da SARA foi avaliada através do escore LIS, sendo um valor acima de 3 considerado grave. Em uma população de 103 pacientes caucasianos adultos com SARA, os portadores do alelo D apresentaram um risco maior de desenvolver SARA grave e o genótipo DD foi mais freqüente nos pacientes com LIS acima de 3 ($p=0,0042$) (Adamzik *et al*, 2007).

O fator estimulador de colônia célula pré-B (FEPB) foi inicialmente isolado de uma biblioteca de cDNA de linfócitos humanos (Samal *et al*, 1994). Em modelos animais de LPA e em humanos, a expressão do FEPB está aumentada no lavado bronco-alveolar (LBA), e já foram descritos 11 SNPs no gene desta citocina (Ye *et al*, 2005).

Os polimorfismos do FEPB -1001T>G e -1543C>T foram avaliados em um estudo de caso-controle com 375 pacientes com SARA e 787 controles com fatores de risco. A variante alélica -1001T>G e os haplótipos relacionados mostraram associação com aumento do risco de desenvolver SARA e de mortalidade na UTI. A variante alélica -1543C>T e os haplótipos relacionados associaram-se a uma diminuição na ocorrência de SARA entre pacientes com choque séptico e um desfecho melhor nos pacientes com SARA (Bajwa *et al*, 2007).

O Sistema Renina-Angiotensina

Há aproximadamente um século, foi descoberta nos rins a existência de um fator capaz de elevar a pressão arterial, o qual foi chamado de renina. A partir de então, foi caracterizado o sistema renina-angiotensina (SRA) como sendo o principal determinante do volume intravascular e da regulação da pressão arterial (Re, 2001).

Um 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 (Murphey *et al*, 2000). 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 principal 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, 2002).

O manejo de condições clínicas como a hipertensão arterial sistêmica (HAS), a insuficiência cardíaca e o pós-infarto agudo do miocárdio, melhorou significativamente com o conhecimento dos mecanismos do SRA (Sowers *et al*, 2001). Estudos fisiológicos, farmacológicos e genéticos, demonstram a importância da ECA quanto ao seu efeito nas doenças cardiovasculares (Keavney *et al*, 1998) e na LPA (Marshall *et al*, 2004).

O Gene ECA

O gene ECA encontra-se localizado no *locus* 17q23 e contém 26 exons (Niu, 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, 2002) que indicariam um evento evolutivo de duplicação que poderia ter ocorrido muito cedo na evolução, entre 118 e 194 milhões de anos (Hubert *et al*, 1991). A expressão do gene da ECA é tecido-dependente, sendo identificadas duas isoformas principais, uma somática (sECA) e outra testicular (tECA). Tais isoformas são devidas ao emprego de promotores alternativos ou **processamento** diferencial (Niu, 2002; Kumar *et al*, 1991). A isoforma somática é codificada pelo gene completo, compreendendo 1306 aminoácidos, transcrita a partir dos exons 1 a 26 com exceção do exon 13, removido por **processamento**. Compreende duas regiões homólogas (exons 1-12, 14-26), contendo dois domínios catalíticos, nas porções amino- e carboxi-**terminal**, cada qual com o mesmo motivo ligado ao zinco (Valee & Auld, 1990), altamente conservado entre diferentes espécies (Niu, 2002). A isoforma testicular da ECA é controlada por um promotor de 91 pares de bases presente no intron 12, coordenando a expressão do exon 13 (específico da isoforma tECA) e da segunda metade do gene (exons 14-26) (Bernstein *et al*, 1989; Niu, 2002). A proteína da tECA tem um único domínio catalítico N-terminal (Niu, 2002), determinado pelo exon testículo-

específico, enquanto que a seqüência remanescente é idêntica ao domínio C-terminal da sECA (Kumar *et al*, 1991).

Em 1990 foi descrito o polimorfismo mais conhecido deste gene, que consiste na presença (alelo I) ou ausência (alelo D) de um fragmento *Alu* de 287 pares de bases 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).

As seqüências *Alu* são os mais abundantes elementos móveis do genoma humano, compreendendo mais de 10% deste (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001), usualmente contendo entre 100 e 300 pares de bases (Roy *et al*, 2000). Não estão uniformemente distribuídas no genoma humano, acumulando-se preferencialmente em regiões ricas em genes, podendo influenciar a regulação da expressão gênica (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 específico que remova 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 mutações com efeitos deletérios, 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 teriam plausibilidade biológica:

(I) Considerando que a inserção seja uma mutação silenciosa (por ser intrônica), sua repercussão fenotípica ocorreria por supostamente estar 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 nos últimos milhares de anos.

Da mesma forma como as inserções da família *Alu* se propagaram ao longo da evolução 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 assumir-se 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 (Batzer & Deininger 2002; Dewannieux *et al*, 2003).

(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, 2003a; Mattick, 2003b).

(III) No que se refere ao controle pós-transcricional, foram descritos segmentos intrônicos que **são transcritos** 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 (Hannon, 2002). Experimentalmente, a construção de transgenes com inserções intrônicas direta ou reversa 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 iRNA, favorecendo sua hibridização (Smith, 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).

Polimorfismo I/D do Gene ECA e SARA

O polimorfismo I/D do gene ECA está associado a uma série crescente de doenças. O alelo D foi identificado como fator de risco para doença vascular renal (Missouris *et al*, 1996), hipertrofia ventricular esquerda em pacientes com hipertensão arterial sistêmica (Celentano *et al*, 1999), pneumonia em idosos (Morimoto *et al*, 2002), morbimortalidade após cirurgia de RM (Völzke *et al*, 2002), tempo de ventilação mecânica após cirurgia de revascularização miocárdica (RM) (Yende *et al*, 2004) e complicações pulmonares após cirurgia de esôfago (Lee *et al*, 2005).

Em pacientes com SARA, o primeiro estudo a demonstrar uma associação positiva entre uma variação polimórfica de um gene candidato e o risco de desenvolver a síndrome foi publicado recentemente. Noventa e seis pacientes com diagnóstico de SARA de acordo com os critérios diagnósticos do AECC (Bernard *et al*, 1994) maiores de 18 anos, tiveram seu genótipo para o gene ECA determinado. Concomitantemente, 88 pacientes críticos com insuficiência respiratória e necessidade de ventilação mecânica invasiva sem diagnóstico de SARA e 174 pacientes submetidos à cirurgia de

revascularização miocárdica, admitidos na UTI e sem insuficiência respiratória aguda, foram avaliados como controles. Os genótipos e a frequência dos alelos em todos os grupos de pacientes foram comparados com 1.906 indivíduos do sexo masculino saudáveis. Como há uma influência étnica para a frequência do gene ECA, apenas pessoas caucasianas foram incluídas em todos os grupos do estudo. Os diagnósticos mais comuns nos pacientes com SARA foram pneumonia (27%), sepse (26%) e trauma (11%) (Marshall *et al*, 2002).

Em todos os grupos a distribuição genotípica esteve em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Quando comparados quanto à gravidade ou tempo de internação na UTI, de acordo com o genótipo da ECA, não houve diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com SARA. Porém, a frequência do genótipo DD e do alelo D foi marcadamente aumentada nos pacientes com SARA em comparação com os indivíduos submetidos à revascularização miocárdica e com insuficiência respiratória e sem SARA, além da população saudável. A mortalidade no grupo com SARA de acordo com a presença dos alelos foi: II 11,1%, ID 27,9% e DD 54,5% ($p < 0,02$). Este estudo foi o primeiro a demonstrar uma associação específica entre um alelo e a mortalidade em decorrência de SARA, conferindo um papel importante ao eixo renina-angiotensina no desenvolvimento e progressão da síndrome (Marshall *et al*, 2002).

O polimorfismo I/D do gene ECA também foi estudado em uma população de pacientes de etnia **mongolóide**. Estudo realizado em Taiwan (Jerng *et al*, 2006) avaliou prospectivamente pacientes admitidos em uma UTI universitária com diagnóstico de SARA de acordo com os critérios do AECC (Bernard *et al*, 1994), tratados entre julho de 2000 e junho de 2003. Foram incluídos 101 pacientes com diagnóstico de SARA (idade média 60 ± 21 anos), 138 pacientes com risco de SARA considerados controles enfermos (idade média 71 ± 16 anos) e 210 indivíduos (idade média 57 ± 13 anos) sem doença, considerados controles hígidos. A frequência dos genótipos e alelos não mostrou desvio do equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, sendo que o alelo D esteve com frequência inferior a 0.3 em todos os grupos. A mortalidade em 28 dias nos pacientes com SARA foi de 42%, de 65% e de 75% para os genótipos II, ID e DD, respectivamente ($p = 0,036$). Este

estudo confirma que também em indivíduos de raça mongolóide o genótipo DD está associado com aumento de mortalidade na SARA.

Referências Bibliográficas

- Adamzik M, Frey UH, Rieman K et al. Insertion/deletion polymorphism in the promoter of NFKB1 influences severity but not mortality of acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 2007;33:1199-1203.
- Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute Respiratory Distress in Adults *Lancet* 1967; II:319-323.
- Bajwa EK, Yu CL, Gong MN, Thompson T, Christiani DC. Pre-B-cell colony-enhancing factor gene polymorphisms and risk of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2007;35:1290-1295.
- Batzer MA & Deininger PL Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet* 2002;3:370-380.
- Bernard GR, Artigas A, Brigham KL et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, Mechanisms, Relevant Outcomes, and Clinical Trial Coordination *Am J Resp Crit Care Med* 1994;149:818-824.
- Bernstein KE. Two ACEs and a heart. *Nature* 2002;417: 799-802.
- Bernstein KE, Martin BM, Edwards AS, Bernstein EA Mouse angiotensin-converting enzyme is a protein composed of two homologous domains *J. Biol Chem* 1989;264:11945-11951.
- Bersten AD, Edibam C, Hunt T, Moran J and The Australian and New Zealand Intensive Care Society Clinical Trials Group. Incidence and Mortality of Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome in Three Australian States *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:443-448.
- Britten RJ. DNA Sequence insertion and evolutionary variation in gene regulation. *PNAS* 1996;93:9374-9377.
- Brun-Buisson C, Minelli C, Bertolini G, Brazzi L, Pimentel J, Lewandowski K, Bion J, Roamdn JA, Villar J, Thorsteinsson A, Damas P, Armaganidis A, Lemaire for the ALIVE Study Group. Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. *Intensive Care Med* 2004;30:51-61.
- Burke W. Genomics as a Probe for Disease Biology. *N Engl J Med* 2003;349:969-974.

- Callister MEJ, Evans TW Pulmonary versus extrapulmonary acute respiratory distress syndrome: different disease or just a useful concept? *Curr Opin Crit Care* 2002;8:21-25.
- Celentano A, Mancini FP, Crivaro M et al. Cardiovascular Risk Factors, Angiotensin-Converting Enzyme Gene I/D Polymorphism, and Left Ventricular Mass in Systemic Hypertension. *Am J Cardiol* 1999;83:1196-1200.
- Chen C, Gentles AJ, Jurka J, Karlin S Genes, pseudogenes, and Alu sequence organization across human chromosomes 21 and 22. *PNAS* 2002;99:2930–2935.
- Christman JW, Sadikot RT, Blackwell TS. The role of nuclear factor- κ B in pulmonary diseases. *Chest* 2000;117:1482-1487.
- Copland IB, Kavanagh BP, Engelberts D, McKerlie C, Belik J, Post M Early Changes in Lung Gene Expression due to High Tidal Volume. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:1051-1059.
- Dewannieux M, Esnault C, Heidemann T. LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nat. Genet* 2003;35: 41-48.
- Dias FS, Almeida N, Wawrzeniak IC, Nery PB, Froemming JA, Guerreiro MO. Epidemiology of ARDS in a Brazilian ICU *Crit Care* 2002;6(suppl 1):S1.
- Estenssoro E, Dubin A, Laffaire E, Canales H, Sáenz G, Moseinco M, Pozo M, Gómez A, Baredes N Incidence, clinical course, and outcome in 217 patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2002;30:2450-2456.
- Fialkow L, Vieira SRR, Fernandes AK, Silva DR, Bozzetti MC. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome at the intensive care unit of a general university hospital in Brazil. *Intensive Care Med* 2002;28:1644-1648.
- Frerking I, Senger C, Günther A, Walmrath HD, Stevens P, Witt H Landt O; Pison U, Nickel R: Evaluation of the -26G>A CC16 polymorphism in acute respiratory distress syndrome *Crit Care Med* 2005;33:2404-2406.
- Gadjeva M, Takahashi K, Thiel S. Mannan-binding lectin – A soluble pattern recognition molecule. *Mol Immunol* 2004;41:113-21.

- Garber BG, Hébert PC, Yelle JD, Hodder RV, McGowan J: Adult respiratory distress syndrome: A systematic overview of incidence and risk factors. *Crit Care Med* 1996;24:687-695.
- Garred P, Pressler T, Madsen HO et al. Association of mannose binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1999;104:431-437.
- Gattinoni L, Pelosi P, Suter PM, Pedoto A, Vercesi P, Lissoni A Acute Respiratory Distress Syndrome Caused by Pulmonary and Extrapulmonary Disease. Different Syndromes? *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:3-11.
- Gong MN, Wei Z, Xu LL, Miller DP, Thompson BT, Christiani DC. Polymorphism in the Surfactant Protein-B Gene, Gender, and the Risk of Direct Pulmonary Injury and ARDS. *Chest* 2004;125:203-211.
- Gong MN, Zhou W, Williams PL, Thompson BT, Pothier L, Boyce P, Christiani DC: - 308GA and TNFB polymorphisms in acute respiratory distress syndrome *Eur Respir J* 2005;26:382-389.
- Gong MN, Zhou W, Williams PL, Thompson BT, Pothier L, Christiani DC Polymorphisms in the mannose binding lectin-2 gene and acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2007;35:48-56.
- Goodman LR, Fumagalli R, Tagliabue P, Tagliabue M, Ferrario M, Gattinoni L, Pesenti A Adult Respiratory Distress Syndrome Due to Pulmonary and Extrapulmonary Causes: CT, Clinical, and Functional Correlations. *Radiology* 1999;213:545-552.
- Goss CH, Brower RG, Hudson LD, Rubenfeld GD, for the ARDS Network Incidence of acute lung injury in the United States. *Crit Care Med* 2003;31:1607-1611.
- Günther A, Walmrath D, Grimminger F, Seeger W Pathophysiology of Acute Lung Injury. *Sem Respir Crit Care Med* 2001;22:247-258.
- Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002;418:244-251.
- Hooper NM, Keen J, Pappin DJ, et al. Pig kidney angiotensin converting enzyme purification and characterization of amphipathic and hydrophilic forms of the enzyme establishes C-terminal anchorage to the plasma membrane. *Biochem. J.* 1987;247: 85-93.

- Hubert C, Houot AM, Corvol P et al. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem* 1991;266:15377-83.
- International Human Genome Sequencing Consortium Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409:860-921.
- 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* 2006;34:1001-1006.
- Keavney B, McKenzie CA, Connel JMC et al. Measured haplotype analysis of the angiotensin I-converting enzyme gene. *Hum. Mol. Genetics* 1998;7:1745-1751.
- Krafft P, Fridrich P, Pernerstorfer T et al The Acute Respiratory Distress Syndrome: definitions, severity and clinical outcome. *Intensive Care Med* 1996;22:519-529.
- Kumar RS, Thekkumkara TJ, Sem GC 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* 1991;266:3854-3862.
- Laiang IA, Goldblatt J, Eber E, Hayden CM, Rye PJ, Gibson NA, Palmer LJ, Burton PR, Le Souef PN. A polymorphism of the CC16 gene is associated with an increased risk of asthma. *J Med Genet* 1998;35:463-467.
- Lee JM, Lo AC, Yang SY et al. Association of Angiotensin-Converting Enzyme Insertion/Deletion Polymorphism With Serum Level and Development of Pulmonary Complications Following Esophagectomy. *Ann Surg* 2005;241:659-665.
- Lim CM, Kim EK, Lee JS, Shim TS, Lee SD, Koh Y, Kim YS, Kim DS, Kim WD Comparison of the response to the prone position between pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 2001;27:477-485.
- Luhr OR, Antonsen K, Karlsson M et al. Incidence and Mortality after Acute Respiratory Failure and Acute Respiratory Distress Syndrome in Sweden, Denmark, and Iceland *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1849-1861.

- Marshall RP, Gohlke P, Chambers RC et al. Angiotensin II and the fibroproliferative response to acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286:L156-L164.
- Marshall RP, Webb S, Bellingan GJ, Montgomery HE, Chaudhari, McAnulty RJ, Humpries SE, Hill MR, Laurent GJ: Angiotensin Converting Enzyme Insertion/Deletion Polymorphism Is Associated With Susceptibility and Outcome in Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:646-650.
- Mattick JS Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. *Bioessays* 2003a;25:930-939.
- Mattick JS The human genome and the future of medicine. *Med J Aust*, 2003b;179,:212- 216.
- Medford ARL, Kenn LJ, Bidwell JL, Millar AB: Vascular endothelial growth factor gene polymorphism and acute respiratory distress syndrome. *Thorax* 2005;60:244-248.
- Mira JP, Cariou A, Grall F et al. Association of TNF2, a TNF- α promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality. *JAMA* 1999;282:561-568.
- Missouriis CG, Barley J, Jeffrey S, Carter ND, Singer DRJ, MacGregor GA. Genetic risk for renal artery stenosis: Association with deletion polymorphism in angiotensin 1-converting enzyme gene. *Kidney International* 1996;49:534-537.
- Morimoto S, Okaishi K, Onishi M et al. Deletion Allele of the Angiotensin-Converting Enzyme Gene as a Risk Factor for Pneumonia in Elderly Patients. *Am J Med* 2002;112:89-94.
- Mozzato-Chamay N, Corbett EL, Bailey RL et al. Polymorphisms in the I κ B- α promoter region and risk of disease involving inflammation and fibrosis. *Gennes Imunn* 2001;2:153-155.
- Murphey LJ, Gainer JV, Vaughan DE et al. Angiotensin-Converting Enzyme Insertion/Deletion Polymorphism Modulates the Human In Vivo Metabolism of Bradykinin. *Circulation* 2000;102:829-832.
- Murray JF, Matthay MA, Luce JM, Flick MR An Expanded Definition of the Adult Respiratory Distress Syndrome. *Am Rev Resp Dis* 1988;138:720-723.

- Nagase T, Uozomi N, Ishiii S, Kume K, Izumi T, Ouchi Y, Schimizu T. Acute lung injury by sepsis and acid aspiration: A key role for cytosolic phospholipase A2. *Nat Immunol* 2000;1:42-46.
- Niu T. ACE gene insertion/deletion polymorphism and cardiovascular disease. *Drugs* 2002;62:977-993.
- Pelosi P, Caironi P, Gattinoni L. Pulmonary and Extrapulmonary Forms of Acute Respiratory Distress Syndrome *Sem Resp Crit Care Med* 2001;22:259-268.
- Pola MD, Navarrete-Navarro P, Rivera R, Fernández-Mondejar E, Hurtado B, Vasquez-Mata G Acute Respiratory Distress Syndrome: Resource Use and Outcomes in 1985 and 1995, Trends in Mortality and Comorbidities. *J Crit Care* 2000;15:91-96.
- Re RN. The clinical implication of tissue rennin angiotensin systems. *Curr Opin Cardiol* 2001;16:317-327.
- Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F et al. An insertion-deletion polymorphism in the angiotensin-I converting enzyme gene accounting for half of the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990;86:1343-1346.
- Roy AM, Carroll ML, Nguyen SV et al. Potential Gene Conversion and Source Genes for Recently Integrated Alu Elements. *Genome Research* 2000;10:1485-1495.
- Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, Stern EJ, Hudson LD Incidence and Outcomes of Acute Lung Injury. *N Engl J Med* 2005;353:1685-1693.
- Samal B, Sun Y, Stearns G, Xie C, Suggs S, McNiece I. Cloning and Characterization of the cDNA Encoding a Novel Human Pre-B-Cell Colony-Enhancing Factor. *Mol Cell Biol* 1994;14:1431-1437.
- Samani NJ, Thompson JR, O'Toole L, Channer K, Woods KL A meta-analysis of the association of the deletion allele of the angiotensin-converting enzyme gene with myocardial infarction. *Circulation* 1996;94:708-712.
- Shanley TP, Wong HR. Signal Transduction Pathways in Acute Lung Injury: NF- κ B and AP-1. In Wong HR, Shanley TP. *Molecular Biology of Acute Lung Injury*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2001.
- Sibinga NES, Ware JA. A pair of ACEs, for openers? *Circ Res* 2000;87: 523-525.

- Smith NA, Singh SP, Wang MB et al Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 2000;407:319-320.
- Sowers JR, Epstein M, Frohlich ED. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update. *Hypertension*. 2001;37:1053-1059.
- Spruth E, Zurbrügg HR, Warnecke C et al 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* 1999;77:804-810.
- Sunthralingam G, Regan K, Keogh BF, Morgan CJ, Evans TW Influence of direct and indirect etiology on acute outcome and 6-month functional recovery in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2001;29:562-566.
- Tamaki S, Iwai N, Ohmichi N et al Effect of genotype on the angiotensin-converting enzyme mRNA level in human aorta. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1997;24:305-308.
- The International SNP Map Working Group A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001;409:928-933.
- Turner MW. The role of mannanose binding lectin in health and disease. *Mol Immunol* 2003;40:423-429.
- Valee BL, Auld DS. Zinc coordination, function and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* 1990;29: 5647-59.
- Villar J Genetics and the pathogenesis of adult respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care* 2002;8:1-5.
- Villar J, Flores C, Méndez-Alvarez S Genetic susceptibility to acute lung injury. *Crit Care Med* 2003;31:S272-S275.
- Villar J, Siminovitch KA Molecular intensive care medicine. *Intensive Care Med* 1999;25:652-661.
- Völzke H, Engel J, Kleine V et al. Angiotensin I-Converting Enzyme Insertion/Deletion Polymorphism and Cardiac Mortality and Morbidity After Coronary Artery Bypass Graft Surgery. *Chest* 2002;122:31-36.
- Ware LB, Matthay MA The Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med* 2000;342:1334-1349.

- Ware LB, Bernard GR Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome. In Fink MP, Abraham E, Vincent JL, Kochanek PM. Textbook of Critical Care, 5th ed, Elsevier Saunders, Philadelphia, 2005.
- Ye SQ, Simon BA, Maloney JP et al. Pre-B-cell colony-enhancing factor as a potential novel biomarker in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:361-370.
- Yende S, Quasney MW, Tolley EA, Wunderink RG. Clinical relevance of angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms to predict risk of mechanical ventilation after coronary artery bypass graft surgery. *Crit Care Med* 2004;32:922-927.
- Zhai R, Zhou W, Gong M, Thompson BT, Su L, Yu C, Kraft P, Chistiani DC. Inhibitor κ B- α haplotype GTC is associated with susceptibility to acute respiratory distress syndrome in Caucasians. *Crit Care Med* 2007;35:893-898.
- Zilberberg MD, Epstein SK Acute lung injury in the medical ICU. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1159-1164.

Capítulo 1

1.2 Objetivos

Objetivos:

Estudar uma população de pacientes críticos do sul do Brasil, buscando **investigar** alguma associação entre o polimorfismo I/D do gene ECA **com**:

1. Suscetibilidade à SARA.
2. Mortalidade relacionada à SARA.

Hipótese:

A variante polimórfica I/D do gene que codifica para a ECA, é um alvo genético com potencial para **avaliar** a ocorrência e o prognóstico de SARA.

Capítulo 2

Angiotensin converting enzyme (ACE) insertion/deletion polymorphism and ARDS in a south Brazilian ICU

Title

Angiotensin converting enzyme (ACE) insertion/deletion polymorphism and ARDS in a south Brazilian ICU

Short Title

ACE I/D polymorphism in ARDS

The full name of authors

Fernando Suparregui Dias*; Fernanda Stringhi*; Michelle Eidt*; Pietra Graebin**; Diego d'Ávila Packulin**; Francis Jackson de Oliveira Paludo**; Rodrigo Duquia*; Clarice Sampaio Alho**

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

*Hospital São Lucas (HSL) and **Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Brazil.

Address and name of the author to whom correspondence about the manuscript should be sent

Dr. Fernando Suparregui Dias, M.D., Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga, 6690 General ICU 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil; Telephone number: (55) (51) 33203000; Fax number: (55) (51) 33360304; E-mail address: fersdias@via-rs.net

Key Words

I/D ACE polymorphism; ARDS.

Abstract

Objective: The aim of this study was to determine if the polymorphism I/D of the angiotensin converting enzyme (ACE) gene is associated with susceptibility for and mortality related to acute respiratory distress syndrome (ARDS) in a population of critically ill patients in South Brazil.

Design: A cross-sectional study was conducted of consecutive, critically ill patients, admitted to the General ICU in Porto Alegre, Brazil, between January, 2004 and June, 2006.

Patients: Four hundred consecutive patients were enrolled. A patient was considered having ARDS if he/she fulfilled due criteria according the American-European Consensus Conference, anytime during the ICU stay.

Interventions: A blood sample (5 ml) was drawn for genotyping I/D ACE gene polymorphism.

Measurements and results: The incidence of ARDS was 11.8%. Patients with ARDS were younger than non-ARDS patients ($p < 0.0001$). The APACHE II score was similar in both groups, and the level of organ dysfunction determined by the SOFA score was higher in non-ARDS patients on the first day ($p = 0.007$), and thereafter, higher in the ARDS group (day 2 to day 7, $p = 0.009$; $p = 0.003$; $p = 0.003$; $p = 0.001$; $p = 0.004$; $p = 0.04$, respectively). We were unable to find any association between the I/D polymorphism of ACE gene and susceptibility or mortality in ARDS and non-ARDS patients. ICU and hospital mortality in ARDS patients was 42.5% and 48.9%, respectively.

Conclusions: In this single center association study, we were unable to identify any relationship between the I/D polymorphism in ACE gene and susceptibility to ARDS and mortality.

Introduction

Acute respiratory distress syndrome (ARDS), the most severe form of acute lung injury (ALI), is characterized by acute onset of hypoxemia, bilateral infiltrates on chest radiograph, and pulmonary artery occlusion pressure (PAOP) ≤ 18 mmHg or no clinical evidence of left atrial hypertension [1]. Since its initial description, ARDS has been characterized as a syndrome that develops after different insults [2], which were classified later as direct or primary and indirect or secondary, by an American-European Consensus Conference (AECC) [1]. The strongest clinical evidence supporting a cause-effect relationship between ARDS and a risk factor was identified for sepsis, aspiration of gastric contents, trauma, multiple transfusions [3,4], pulmonary contusion, pneumonia and smoke inhalation [4]. The weakest clinical evidence was identified for disseminated intravascular coagulation [3,4], fat embolism, and cardiopulmonary bypass [4]. Other risk factors for ARDS are near drowning and pancreatitis [1].

In large cohort studies, the incidence of ALI has been estimated to be between 17.9 and 78.9 [5,6,7], and the ARDS incidence between 13.5 and 28 cases per 100,000 person-years [5,6], respectively. Despite all the progress in the care of the critically ill in the last decades, hospital mortality remains around 58% [8,9], mainly due to sepsis and organ failure [10].

The acute phase hallmark of ARDS is a protein-rich edema fluid leaking into the interstitium and alveoli, as a consequence of disruption of the alveolar-capillary barrier [11,12]. The underlying reasons for the impairment of the microvascular endothelium and alveolar epithelium are diverse, such as bacterial products and the release of inflammatory mediators. The elements involved in the injury of the alveolar-capillary barrier encompass cytokines (TNF α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10), activated neutrophils [11], lipid mediators (thromboxane A₂, prostaglandins) and nitric oxide [12]. The consequences of this disarrangement during edema are loss of epithelial fluid transport, reduction in surfactant production, pulmonary bacterial infection, and in severe forms, fibrosis [11]. Also, the activation of the renin-angiotensin system could affect the lungs during ARDS via alterations in vascular permeability, vascular tone and fibroblast activity [13].

Facing this picture, the search for predictors of survival is an important task. Several prognostic factors have been identified as the triggering risk factor, including the severity of respiratory illness, right ventricular dysfunction [14], and the use of vasopressor [15], but the low incidence of ARDS in relatively large groups of patients at risk for developing the syndrome, leads some authors to suggest the involvement of genetic factors [13] as a determinant of susceptibility and mortality. In recent years, some polymorphisms have been implicated with susceptibility and outcome in ALI and ARDS, including those localized in the genes that code for angiotensin converting enzyme (ACE) [13,16], clara cell protein [17, 18], pre-B-cell colony-enhancing factor [19], vascular endothelial growth factor (VEGF) [20], mannose binding lectin-2 [21], TNFB 1/2 [22], inhibitor κ B- α [23] and NFKB1 [24].

The role of ACE in ARDS was identified 20 years ago. Fourrier et al. [25] studied the development of ACE levels during ARDS secondary to sepsis. **Serum ACE levels were decreased in patients with ALI** and correlated with the severity of lung injury in a time-dependent fashion. Patients with decreased ACE levels after one week have persistent injury and lack of repair. There are differences in ACE plasma levels among individuals, but the concentration in members of the same family is quite similar, suggesting a genetic influence [13]. The human ACE gene is located on chromosome 17q23 [13], and shows a polymorphism consisting of the presence (insertion, I) or absence (deletion, D) of a 287-bp *Alu* repeat sequence in intron 16 [13,16]. In 80 healthy white individuals, I/D polymorphism accounted for 47% of the total phenotypic variance of serum ACE, the highest levels being in those with the DD genotype [26]. The D allele has been identified as a risk factor for pneumonia [27], prolonged mechanical ventilation in surgical patients [28], and morbidity and mortality after cardiac surgery [29], and has a significant effect on the degradation of bradikinin, a potent vasodilator that exerts antiproliferative effects and inhibits platelet activation [30]. These features suggest that ACE I/D polymorphism plays an important role in pathophysiology in the critically ill and could possibly be a marker of outcome in these patients.

Therefore, the aim of our study was to examine the possible association between the I/D polymorphism of the ACE gene and (1) susceptibility to ARDS and (2) mortality related to ARDS in a population of critically ill patients in South Brazil.

Material and Methods

Study design and approval

This was an observational, prospective study of consecutive, critically ill patients, admitted to the General ICU of São Lucas Hospital (HSL), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil, between January, 2004 and June, 2006. After ICU admission, each patient or his/her next of kin gave informed consent. The PUCRS Research Ethics Committee approved the study beforehand.

Subjects

All patients admitted to the General ICU during the study period were invited to participate in the study. During the study period, there were 947 admissions in the ICU, of which 87 were readmissions, thereby comprising 860 patients.

Definitions

ARDS was defined according to the AECC [1], and sepsis was defined according to the ACCP/SCCM consensus conference [31].

Blood collection and DNA analysis

A 5 mL blood sample from each patient was collected by an ICU nurse in a sterile tube containing EDTA, during the ICU stay. The blood was refrigerated at 4°C or frozen at - 20°C until DNA extraction.

Genomic DNA was extracted from leukocytes by a standard method [32]. Genotyping protocols for the determination of intron 16 I/D ACE polymorphism gene was previously described by Rigat et al. [26]. The biallelic I/D ACE polymorphism was determined according to the PCR-AFLP method. PCR 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), 0.2 mmol/L of each dNTP, and 2 mmol/L MgCl₂. The I/D ACE polymorphism was amplified using 0.4 pmol of each sense primer, 5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3', and antisense primer, 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 min, followed by 35 cycles at 94°C for 1 min, 60°C for 1 min and 72°C for 1 min, and final extension step for 5 min. 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 database as GI 28921 (GenBank accession number X62855).

Data collection

After ICU admission, patients had prospectively collected demographics (age, gender, and race). An admission diagnosis according to APACHE II diagnostic code and the APACHE II score with data from the first 24 h after ICU admission [33] and, risk factor for ARDS according the AECC [1] were also determined. Patients who met criteria for both sepsis and diffuse pulmonary infection were considered having primary ARDS, assuming that sepsis was the consequence of pulmonary infection [24]. Patients with trauma were considered having secondary ARDS. Organ dysfunction was assessed utilizing the SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) score [34] on a daily basis during the first week and on days 14 and 28 for patients who remained longer in the ICU. The time variable was the length of stay (LOS) in the ICU.

Clinical endpoints of the study were discharge from the ICU or death. Mortality was measured in days until death. Mortality rates of patients were monitored daily during their entire ICU stay. For those patients with multiple ICU admissions during the study period, only data from the first entrance was considered.

Statistical analysis

Statistical calculations were carried out using the SPSS 11.5 statistical package (SPSS, Chicago, USA). Continuous variable results are expressed as means \pm standard deviation (SD) and the categorical variables as frequencies and percentages. Non-normally distributed scalar variables were analyzed as non-parametric data using the Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests. For categorical data, we used the Pearson chi-

squared test. To test Hardy–Weinberg equilibrium, the chi-squared test was used. All reported p values are two-tailed, with 0.05 or less taken as significant.

Results

Demographics

After exclusion of 445 patients without informed consent, 415 patients gave blood for the analysis. In fifteen then genotyping process was not completed due to technical problems, resulting in 400 patients for the final analysis of whom 221 (55.2%) were male (Figure 1). The total mean age of the patient population was 54.08 ± 20.3 years. Demographic and clinical characteristics of ARDS and non-ARDS patients are shown in Table 1. The significant differences between the two groups are presented in this table: even though the ARDS patients were younger, the daily SOFA data during the first ICU week was higher, as well as their LOS in the ICU. The SOFA-7 and SOFA-14 scores and the mortality rates did not show significant differences between the two groups (Table 1). The incidence of ARDS in our patients was 11.8%. ICU and hospital mortality rate were 31.2% and 38.5% in non-ARDS and 42.5% and 48.9% in ARDS patients ($p=NS$), respectively.

The APACHE II score was determined with the worst clinical variables in the first 24 h in the ICU, and according to the diagnostic code, there were 348 non surgical and 52 surgical patients (data not shown). Two hundred and eighty-seven patients showed an ARDS risk factor (primary and/or secondary) as previously defined [1,3] at ICU admission and/or during stay. Risk factors for secondary ARDS were more frequent than risk factors for primary ARDS at a proportion of 3,5:1 (Table 2).

Genotype distribution

We found that total genotype and allele frequencies ($n=400$) for I/D ACE polymorphism was at Hardy-Weinberg equilibrium ($DD=0.41$, $ID=0.44$, $II=0.15$, and $D=0.63$, $I=0.37$; Pearson chi-squared test, $p=0.833$). Also, the isolated frequencies from samples obtained from ARDS or non-ARDS patients did not differ from the values expected by the Hardy–Weinberg model (ARDS patients: $DD=0.45$, $ID=0.36$, $II=0.19$

and $D=0.63$, $I=0.37$; Pearson chi-squared test, $p=0.6801$; non-ARDS patients: $DD=0.34$, $ID=0.46$, $II=0.20$ and $D=0.57$, $I=0.43$; Pearson chi-squared test, $p=0.639$).

We evaluated the influence of the I/D ACE polymorphism among the different patient groups. Genetic susceptibility to ARDS and mortality rates according I/D ACE polymorphism were analyzed in the whole group of patients ($n=400$) (Table 3-A), in patients with risk factor ($n=280$) (Table 3-B), and in Caucasian patients ($n=325$) (Table 3-C). We also investigated the genetic effect of I/D ACE polymorphism on the mortality rates in ARDS patients ($n=47$) (Table 3-D). The results in Table 3 indicate that there were no significant differences among rates of I/D ACE genotypes when we compared the subjects groups.

Discussion

The draft of the human genome allowed a better understanding of the genetic role in diseases. In less than a decade, many genes were found associated with molecular pathophysiology, leading researchers to find out answers for many diseases in genetic polymorphisms, including those affecting critically ill patients.

Our study investigated in a prospective fashion for the first time, the influence of the ACE gene I/D polymorphism in a Brazilian population at risk for ARDS development. The south of Brazil is a region with a predominant European ethnicity, but our study population included patients of non-Caucasian origin as well. Despite this fact, there was no significant difference between Caucasians and non-Caucasians with regard to the distribution of genotypes II, ID and DD (data not shown). The reported allele frequency for the DD genotype varies in ARDS patients between 46% in a European population [13] and 7.9 % in Chinese [16]. In our population, this allele frequency was 45 %, confirming the trend documented by Marshall et al. [13], even with almost 20% of our patients of non-Caucasian ethnicity.

The occurrence of genotype DD has been associated with risk of pneumonia in the elderly [27], prolonged mechanical ventilation [28] or mortality [29] after coronary artery bypass graft surgery, and with a risk factor for intracerebral hemorrhage [35]. In previous ARDS studies, also the genotype DD was associated with higher mortality, more

than the ID or II genotypes [13,16]. In our study, we were unable to demonstrate any association between DD genotype and mortality, in all the ICU population enrolled, in patients with ARDS risk factors only, in Caucasian patients only or in patients with established ARDS. This discrepancy with previous reports has been observed in other SNP studies, such as the CD14 gene, with some authors showing a worse outcome with the TT genotype [36] and others demonstrating that TT genotype is associated with better outcomes [37, 38].

Some authors argue that failure to replicate the same results among association studies, could be a combination of methodological and analytical problems [39] or different effect of risk variants in different genetic backgrounds which if true, severely limits their application in the clinical arena [40]. Others have demonstrated that studies with a small number of individuals show a more pronounced effect on disease risk than do studies with large populations [41].

In our patients, the occurrence of the D allele was associated only with ICU mortality ($p=0.045$). As pointed out before, we are aware of the small-sized sample of our population.

The association between the D allele and the development of ARDS implies a role for the renin-angiotensin system activation in the earlier stages of this syndrome [13]. The activation of the pulmonary renin-angiotensin system could alter vascular permeability, vascular tone, fibroblast activation, and endothelial and epithelial cell survival [42]. In an experimental model, the ACE inhibitor captopril prevented ALI induced by oleic acid in rats, by blocking the activation of nuclear factor κ B (NF κ B) [43]. Since captopril is not a specific inhibitor for NF κ B, some questions are still waiting to be answered: (1) if the genotype DD or the presence of D allele is linked to NF κ B production in ALI; (2) if the inhibition of ACE is more effective in a particular genotype or allele group.

In our study, despite that patients with ARDS were younger than patients without ARDS, they had the same level of APACHE II score. The occurrence of organ dysfunction determined by the SOFA score was higher in patients without ARDS on the first day

($p=0.007$) and thereafter in the group with ARDS on days 2, 3, 5, 6 and, 14. This feature shows that in the critically ill, ARDS is a factor that contributes to organ dysfunction.

An interesting finding in our patients is the high incidence of risk factors for ARDS in the group without this syndrome, particularly sepsis. Sepsis has been associated with ARDS for a long time [2], and in our patients it was the main risk factor for ARDS. This finding is similar to that found by others, where sepsis was responsible for 79% of ALI cases in a large population [7]. The incidence of ARDS in our entire study population was 11.7%, a value higher than the 7.7% found by Estenssoro et al. [8]. This could be explained by the high proportion of patients (72%) with risk factors for ARDS in our study population.

Mortality in the ICU and hospital was higher in ARDS than non ARDS patients but without statistical significance and at rates accepted as usual nowadays [6,7].

Our study had some limitations. First, we had included patients from a single center during a long enrollment period. Second, despite having enrolled 400 critically ill patients, the ARDS population was small, which could explain the lack of association between the ID ACE polymorphism and outcome. Finally, since ARDS is a multifactorial risk factor syndrome, we were unable to identify bias inherent to the risk factors *per se* and other possible concomitant gene polymorphisms.

In conclusion, we found no association between the ID ACE polymorphism and mortality in critically ill patients with and without ARDS.

References

1. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R and the Consensus Committee (1994) The American-European Consensus Conference on ARDS. Am J Respir Crit Care Med 149:818-824
2. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE (1967) Acute Respiratory Distress in Adults. Lancet 2:319-323.
3. Garber BG, Hébert PC, Yelle JD, Hodder RV, McGowan J (1996) Adult respiratory distress syndrome: A systematic overview of incidence and risk factors. Crit Care Med 24:687-695.

4. Pelosi P, Caironi P, Gattinoni L (2001) Pulmonary and Extrapulmonary Forms of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Sem Resp Crit Care Med* 22:259-268.
5. Luhr OR, Antonsen K, Karlsson M Aardal S, Thorsteinsson A, Frostell CG, Bonde J and the ARF Study Group (1999) Incidence and Mortality after Acute Respiratory Failure and Acute Respiratory Distress Syndrome in Sweden, Denmark, and Iceland. *Am J Respir Crit Care Med* 159:1849-1861.
6. Bersten AD, Edibam C, Hunt T, Moran J and The Australian and New Zealand Intensive Care Society Clinical Trials Group (2002) Incidence and Mortality of Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome in Three Australian States. *Am J Respir Crit Care Med* 165:443-448.
7. Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, Stern EJ, Hudson LD (2005) Incidence and Outcomes of Acute Lung Injury. *N Engl J Med* 353:1685-1693.
8. Estenssoro E, Dubin A, Laffaire E, Canales H, Sáenz G, Moseinco M, Pozo M, Gómez A, Baredes N (2002) Incidence, clinical course, and outcome in 217 patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 30:2450-2456.
9. Brun-Buisson C, Minelli C, Bertolini G, Brazzi L, Pimentel J, Lewandowski K, Bion J, Roamdn JA, Villar J, Thorsteinsson A, Damas P, Armaganidis A, Lemaire for the ALIVE Study Group (2004) Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. *Intensive Care Med* 30:51-61.
10. Ferring M, Vincent JL (1997) Is outcome from ARDS related to the severity of respiratory failure? *Eur Respir J* 10:1297-1300.
11. Ware LB, Matthay MA (2000) The Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med* 342:1334-1349.
12. Günther A, Walmrath D, Grimminger F, Seeger W (2001) Pathophysiology of Acute Lung Injury. *Sem Resp Crit Care Med* 22:247-258.
13. Marshal RP, Webb S, Bellingan GJ, Montgomery HE, Chaudhari, McAnulty RJ, Humpries SE, Hill MR, Laurent GJ. (2002) 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.

14. Monchi M, Bellenfant F, Cariou A, Joly LM, Thebert D, Laurent I, Dhainaut JF, Brunet F (1998) Early Predictive Factors of Survival in the Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 158:1076-1081.
15. Villard-Baron A, Girou E, Valente E, Brun-Buisson C, Jardin F, Lemaire F, Brochard L (2000) Predictors of Mortality in Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1597-1600
16. Jerng JS, Yu CJ, Wang HC, Chen KY, Cheng SL, Yang PC (2006) Polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene affects the outcome of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 34:1001-1006.
17. Frerking I, Senger C, Günther A, Walmrath HD, Stevens P, Witt H, Landt O, Pison U, Nickel R (2005) Evaluation of the -26G>A CC16 polymorphism in acute respiratory distress syndrome *Crit Care Med* 33:2404-2406.
18. Lesur O, Langevin S, Berthiaume Y, Légaré M, Bellemare JF, Lévy B, Fortier Y, Lauzier F, Bravo G, Nickmilder M, Rousseau E, Bernard A (2006) Outcome value of Clara cell protein in serum of patients with acute respiratory distress syndrome *Intensive Care Med* 32:1167-1174.
19. Bajwa E, Yu CL, Gong MN, Thompson T, Christiani DC (2007) Pre-B-cell colony-enhancing factor gene polymorphism and risk of acute respiratory distress syndrome *Crit Care Med* 35:1290-1295.
20. Medford ARL, Kenn LJ, Bidwell JL, Millar AB (2005) Vascular endothelial growth factor gene polymorphism and acute respiratory distress syndrome. *Thorax* 60:244-248.
21. Gong MN, Zhou W, Williams PL, Thompson T, Pothier L, Christiani DC (2007) Polymorphisms in the mannose binding lectin-2 gene and acute respiratory distress syndrome *Crit Care Med* 35:48-56.
22. Gong MN, Zhou W, Williams PL, Thompson BT, Pothier L, Boyce P, Christiani DC (2005) -308GA and TNFB polymorphisms in acute respiratory distress syndrome *Eur Respir J* 26:382-389.
23. Zhai R, Zhou W, Gong MN, Thompson T, Su L, Yu C, Kraft P, Christiani DC (2007) Inhibitor κ B- α haplotype GTC is associated with susceptibility to acute respiratory distress syndrome in Caucasians. *Crit Care Med* 35:893-898.

24. Adamzik M, Frey UH, Rieman K, Sixt S, Beiderlinden M, Sifert W, Peters J (2007) Insertion/deletion polymorphism in the promoter of NFKB1 influences severity but not mortality of acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 33:1199-1203.
25. Fourrier F, Chopin C, Wallaert B, Mazurier C, Mangalaboyi J, Durocher A (1985) Compared Evolution of Plasma Fibronectin and Angiotensin-converting Enzyme Levels in Septic ARDS. *Chest* 87:191-195.
26. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gallas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F (1990) An Insertion/Deletion Polymorphism in the Angiotensin 1-converting Enzyme Gene Accounting for Half the Variance of Serum Enzyme Levels. *J Clin Invest* 86:1343-1346.
27. Morimoto S, Okaishi K, Onishi M, Katsuya T, Yang J, Okuro M, Sakurai S, Onishi T, Ogihara T (2002) Deletion Allele of the Angiotensin-Converting Enzyme Gene as a Risk Factor for Pneumonia in Elderly Patients. *Am J Med* 112:89-94.
28. Yende S, Quasney MW, Tolley EA, Wunderink RG (2004) Clinical relevance of angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms to predict risk of mechanical ventilation after coronary artery bypass graft surgery. *Crit Care Med* 32:922-927.
29. Völzke H, Engel J, Kleine V, Schwahn C, Dahm JB, Eckel L, Rettig R (2002) Angiotensin 1-Converting Enzyme Insertion/Deletion Polymorphism and Cardiac Mortality and Morbidity After Coronary Artery Bypass Graft Surgery. *Chest* 122:31-36.
30. Murphey LJ, Gainer JV, Vaughan DE, Brown NJ (2000) AngiotensinConverting Enzyme Insertion/Deletion Polymorphism Modulates the Human In Vivo Metabolism of Bradikinin. *Circulation* 102:829-832.
31. Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* 1992;101:1481-1483.
32. Lahiri DK, Nurnberger JI Jr (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucl Acids Res* 19:5444.
33. Knaus WA, Drapper EA, Wagner DP, Zimmerman JE (1985) APACHE II: A severity of disease classification system. *Crit Care Med* 13:818-829.

34. Vincent JL, Mendonça A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, Sprung CL, Colardyn F, Blecher S (1998) Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in the intensive care units: Results of a multicentric, prospective study. *Crit Care Med* 26:1793-1800.
35. Slowik A, Turaj W, Dziedzic T, Haefele A, Pera J, Malecki MT, Glodzik-Sobanska L, Szemer P, Figlewicz DA, Szczudlik A (2004). DD genotype of ACE gene is a risk factor for intracerebral hemorrhage. *Neurology* 2004;63:359-361.
36. Gibot S, Cariou A, Drouet L, Rossignol M, Ripoll L (2002) Association between a genomic polymorphism within the CD14 locus and septic shock susceptibility and mortality rate *Crit Care Med* 30:969-973.
37. D'Ávila LC , Albarus MH, Franco CR, Aguiar BB, Oliveira JR, Dias FS, Alho CS (2006) Effect of CD14 -260C>T polymorphism on the mortality of critically ill patients *Immun Cell Biol* 84:342-348.
38. Barber RC, Aragaki CC, Chang LYE, Purdue GF, Hunt JL, Arnoldo BD, Horton JW (2007) CD14 -159 allele is associated with increased risk of mortality after burn injury. *Shock* 27:232-237.
39. Clark MF, Baudouin SV (2006) A systematic review of the quality of genetic association studies in human sepsis. *Intensive Care Med* 32:1706-1712.
40. Morgan TM, Krumholz HM, Lifton RP, Spertus JA (2007) Nonvalidation of Reported Genetic Risk Factors for Acute Coronary Syndrome in a Large-Scale Replication Study. *JAMA* 297:1551-1561.
41. Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. ACE Gene Polymorphism in Cardiovascular Disease. Meta-analyses of Small and Large Studies in Whites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:484-92.
42. Meyer NJ, Garcia JGN (2007) Wading Into the Genomic Pool to unravel Acute Lung Injury Genetics. *Proc Am Thorac Soc* 4:69-76.
43. He X, Han B, Mura M, Xia S, Wang S, Ma T, Liu M, Liu Z (2007) Angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril prevents oleic acid-induced severe acute lung injury in rats. *Shock* 28:106-111.

Figure 1 – Patient allocation

Period January 2004 to June 2006

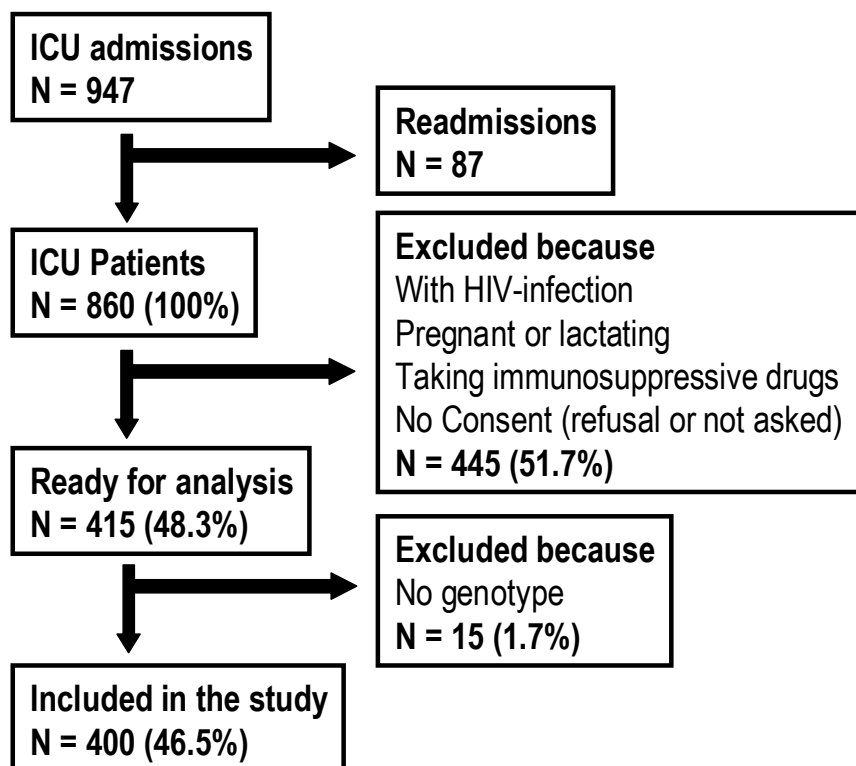


Table 1 - Demographic and clinical profile

	No ARDS	ARDS	P
Number of Patients (%)	353 (88.2)	47 (11.8)	-
Female [N (%)]	153 (43.3)	26 (55.3)	0.121 ^{X2}
Age [median (SD)]	58 (19.7)	34 (19.4)	0.000 ^{AN}
APACHE II Score [mean (SD)]	19.4 (8.14)	19.3 (6.85)	0.902 ^{AN}
SOFA-1 [mean (SD)]	7.5 (2.7)	7.0 (1.9)	0.007 ^{KW}
SOFA-2 [mean (SD)]	6.5 (3.3)	7.0 (2.7)	0.009 ^{KW}
SOFA-3 [mean (SD)]	6.0 (3.1)	7.0 (3.6)	0.003 ^{KW}
SOFA-4 [mean (SD)]	6.0 (3.4)	6.0 (4.1)	0.003 ^{KW}
SOFA-5 [mean (SD)]	6.0 (3.3)	7.5 (3.7)	0.001 ^{KW}
SOFA-6 [mean (SD)]	6.0 (2.9)	6.5 (4.3)	0.004 ^{KW}
SOFA-7 [mean (SD)]	6.0 (2.9)	6.0 (4.3)	0.040 ^{KW}
SOFA-14 [mean (SD)]	5.0 (3.2)	7.5 (3.9)	0.078 ^{KW}
SOFA-28 [mean (SD)]	4.5 (3.6)	4.5 (3.9)	0.896 ^{KW}
Caucasians [N (%)]	288 (81.6)	37 (78.7)	0.637 ^{X2}
ICU LOS [median (min/max)]	13 (1/ 166)	19 (5/ 118)	0.008 ^{KW}
ICU Mortality [N (%)]	110 (31.2)	20 (42.5)	0.117 ^{X2}
Hospital mortality [N (%)]	136 (38.5)	23 (48.9)	0.171 ^{X2}

ARDS: Acute respiratory distress syndrome; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment score obtained daily during the first week from the ICU admission (day 1 to day 7), and in the days 7, 14, and 28; APACHE II: Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II score obtained on ICU admission day; ICU-LOS: Length of stay at intensive care unit, measured by number of days; N: number of patients; SD: standard deviation; X2: Pearson Chi-square test; AN: ANOVA test; KW: Kruskal-Wallis test.

Table 2: Patients with ARDS risk factors

Risk Factor	Total (%)
Number of patients with ARDS risk factor	289 (100)
Direct injury	65 (22.5)
Aspiration	18 (6.2)
Diffuse pulmonary infection	45 (15.6)
Near-drowning	02 (0.7)
Indirect injury	224 (77.5)
Sepsis	194 (67.1)
Severe nonthoracic trauma	12 (4.2)
Hypertransfusion for emergency resuscitation	09 (3.1)
Pancreatitis	09 (3.1)

Table 3: ICU Patients characterization according I/D ACE genotypes

	Total	DD		DI+II		p*	With D		Without D		p*
		n	(f)	n	(f)		n	(f)	n	(f)	
A - Total of ICU patients	400	163	(0.41)	237	(0.59)		341	(0.85)	59	(0.15)	
• With ARDS	47	21	(0.45)	26	(0.55)	0.559	38	(0.81)	9	(0.19)	0.365
• With Risk Factor	289	122	(0.42)	167	(0.58)	0.336	248	(0.86)	41	(0.14)	0.608
• Caucasians	325	137	(0.42)	188	(0.58)	0.234	279	(0.86)	46	(0.14)	0.484
• ICU Mortality	130	52	(0.40)	78	(0.60)	0.832	109	(0.84)	21	(0.16)	0.583
• Hospital Mortality	159	61	(0.38)	98	(0.62)	0.430	132	(0.83)	27	(0.17)	0.307
B - Patients with risk factors only	289	122	(0.42)	167	(0.58)		248	(0.86)	41	(0.14)	
• With ARDS	46	21	(0.46)	25	(0.54)	0.607	37	(0.80)	9	(0.20)	0.254
• Caucasians	233	98	(0.42)	135	(0.58)	0.846	200	(0.86)	33	(0.14)	0.978
• ICU Mortality	111	46	(0.41)	65	(0.59)	0.834	93	(0.84)	18	(0.16)	0.435
• Hospital Mortality	132	51	(0.39)	81	(0.61)	0.259	110	(0.83)	22	(0.17)	0.268
C - Caucasians patients only	325	137	(0.42)	188	(0.58)		279	(0.86)	46	(0.14)	
• With ARDS	37	18	(0.49)	19	(0.51)	0.395	31	(0.84)	6	(0.16)	0.702
• ICU Mortality	110	41	(0.37)	69	(0.63)	0.202	92	(0.84)	18	(0.16)	0.414
• Hospital Mortality	134	48	(0.36)	86	(0.64)	0.052	111	(0.83)	23	(0.17)	0.192
D - ARDS patients only	47	21	(0.45)	26	(0.55)		38	(0.81)	9	(0.19)	
• ICU Mortality	20	8	(0.40)	12	(0.60)	0.578	13	(0.65)	7	(0.35)	0.045
• Hospital Mortality	23	9	(0.39)	14	(0.61)	0.454	16	(0.70)	7	(0.30)	0.120

*Chi-square test; f = frequency

Capítulo 3

Considerações Finais

A SARA é uma síndrome complexa que sofre a interferência de múltiplos fatores. Centenas ou milhares de fatores externos e de fatores intrínsecos podem determinar simultaneamente a susceptibilidade e o desfecho de uma condição crítica como a SARA. Cada efeito externo e cada um dos genes herdados exercerá isoladamente um pequeno efeito, mas que cumulativamente, no somatório com os demais, definirá o desfecho. O estado de saúde, o prognóstico e o desfecho de pacientes com SARA estão, portanto, também relacionados à herança genética que o indivíduo recebeu.

Ainda que centenas de genes possam estar envolvidos na modulação fisiológica de um paciente crítico, aqueles genes que interferem sistemicamente são sempre muito decisivos. Trabalhar com as variantes polimórficas do gene que codifica para a Enzima Conversora da Angiotensina (ECA) foi um esforço na busca de desvendar parte do pequeno efeito que a herança genética poderia ter no momento da SARA.

Como apresentado ao longo deste trabalho, nosso objetivo foi responder à pergunta se uma variante polimórfica do gene que codifica para a ECA poderia influenciar a susceptibilidade à SARA e ao seu desfecho em uma amostra de pacientes críticos residentes no Sul do Brasil. Verificou-se que o efeito da variante polimórfica estudada não foi suficientemente visível para interferir nas condições clínicas dos pacientes estudados.

Pode-se considerar, com base em registros prévios, que a variante polimórfica I/D pode estar, de alguma forma, ligada à função diferencial da ECA. Sendo assim, os resultados mostram que a herança diferencial de alelos deste polimorfismo gênico não é suficiente para passar a ser um fator de risco independente e significativo de susceptibilidade para a gravidade e para a evolução da SARA.

Estudos similares a este, realizados em outras populações, encontraram resultados conflitantes. Isso leva a pensar que, pelo menos, dois importantes fatores estejam ainda interferindo nos resultados: (I) a variação do *back-ground* genético de cada população humana; (II) a variação das rotinas de cada hospital. Tais interferências são definitivas e inevitáveis. Para que se chegue a uma conclusão abrangente acerca do

efeito da herança genética sobre cada fenótipo, são necessários estudos em larga escala e metaanálises.

Em conclusão, com base em observações prévias e no presente estudo propomos que a variante polimórfica I/D do gene que codifica para a ECA, ainda não tem efeito suficientemente forte para ser considerado um alvo genético com potencial diagnóstico e prognóstico para a SARA e seu desfecho. Por outro lado, este estudo coletou dados e DNA de 400 pacientes criticamente enfermos, os quais poderão ser futuramente examinados com o propósito de buscar outras variantes gênicas com potencial para identificar populações de risco.

Anexos

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título da pesquisa:

Efeitos da Herança de Variantes Gênicas Polimórficas em Pacientes com Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA)

Justificativa e objetivos da pesquisa:

Esta pesquisa tem por objetivo estudar as características genéticas de pessoas internadas em unidades de terapia intensiva (UTIs) para identificar quais são as suas predisposições a desenvolver complicações durante a internação. Algumas pessoas internadas em UTIs podem apresentar uma complicação respiratória grave chamada Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (abreviada por SARA) que pode causar alterações importantes no funcionamento dos outros órgãos do corpo humano.

Cada pessoa tem particularidades próprias em relação as suas características genéticas. Assim, algumas pessoas internadas em uma UTI podem ter maior ou menor predisposição à desenvolver uma complicação como a SARA.

O objetivo principal desta pesquisa é estudar pessoas internadas em UTIs que desenvolveram SARA para entender se há alguma associação entre suas características genéticas e a ocorrência da SARA, e se há associação com as outras complicações decorrentes da SARA.

Para isso, nós analisaremos o material genético (DNA) dos pacientes que estiverem internados na Unidade de Tratamento Intensivo Geral do Hospital São Lucas - UTIG / HSL / PUCRS. O material genético (DNA) será obtido através de uma amostra do sangue que é coletado durante os procedimentos de rotina do paciente internado na UTIG / HSL / PUCRS.

Serão estudados seis segmentos do DNA de cada paciente, isto é, serão estudados seis genes, através dos quais será possível se ter um perfil genético de cada pessoa. Os nomes dos genes que serão estudados são os seguintes: 1- gene CD14; 2 - gene eNOS; 3 - gene ECA; 4 - gene SOD2; 5 - gene TNFB e gene: IL-1Ra.

Após a análise genética, serão comparados os resultados provenientes do estudo do DNA com os dados que refletem o estado geral de saúde do paciente.

Com este estudo esperamos compreender melhor: (I) o quanto as características genéticas influenciam no sucesso da recuperação de um paciente de UTI; (II) o quanto as características genéticas influenciam no sucesso da recuperação de um paciente com SARA; e (III) o quanto as características genéticas influenciam na suscetibilidade das pessoas às diferentes fragilidades biológicas.

Quando isto for desvendado, a medicina poderá contar com mais um indicador biológico que auxiliará no diagnóstico, na prevenção e no tratamento de diferentes doenças complexas.

Os procedimentos a serem utilizados:

Para realizar este trabalho, vamos usar parte de uma amostra do sangue que é coletado durante os procedimentos de rotina do paciente internado na UTIG / HSL / PUCRS. Também serão consultados os dados bioquímicos, fisiológicos e clínicos presentes no prontuário de cada paciente.

Os desconfortos ou riscos esperados:

O paciente não estará exposto a nenhum desconforto em decorrência da participação neste estudo, pois serão utilizadas amostras de material biológico e dados coletados na rotina da UTIG / HSL / PUCRS.

Garantia de resposta a qualquer pergunta;

O paciente (ou responsável) deve sentir-se à vontade para fazer qualquer pergunta a fim de esclarecer suas dúvidas. Os responsáveis pela pesquisa garantidamente responderão.

Rubrica do Paciente (ou responsável)

Rubrica do Pesquisador

Os benefícios que se pode obter:

Neste momento, o paciente não receberá nenhum benefício direto em decorrência deste estudo. Ainda não são bem conhecidos os efeitos que a herança genética tem sobre as pessoas. No entanto, haverá benefícios para a ciência, pois os dados do paciente estarão contribuindo na descoberta de indicadores genéticos que auxiliarão futuramente o diagnóstico, a prevenção e o tratamento das doenças complexas.

No futuro, caso alguma informação considerada importante seja identificada no material genético analisado em decorrência desta pesquisa, os pesquisadores buscarão o paciente (ou familiares) para oferecer-lhe acesso a tal informação.

Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si:

Caso o paciente (ou o responsável) tenha vontade de ser retirado da pesquisa, isso poderá ser feito a qualquer momento, sem necessidade de que se apresentem justificativas e sem que se ele sofra qualquer tipo de prejuízo. Unicamente o paciente (ou o responsável) deverá comunicar aos pesquisadores sua decisão de abandonar a pesquisa, retirando-se o consentimento dado.

Compromisso com informação atualizada do estudo;

Toda e qualquer informação atualizada sobre este estudo estará à disposição de todos os que participam do mesmo. Os resultados deste estudo poderão ser comunicados aos pacientes (ou responsáveis), sempre que solicitados.

Garantia de acompanhamento adequado;

A equipe de profissionais de saúde que atende no UTIG / HSL / PUCRS tem uma rotina estabelecida no acompanhamento dos pacientes da UTI. Esta rotina de atendimento ao paciente não será alterada em nada por ocasião deste estudo. Assim, garantimos que a concordância ou não na participação deste estudo não implicará em qualquer modificação na rotina do tratamento já estabelecido para os pacientes. Os resultados destes exames não terão efeito algum sobre o paciente.

Garantia de Privacidade:

A dignidade e a privacidade do paciente, em relação a qualquer dado utilizado nesta pesquisa, serão mantidas. Os dados dos pacientes estarão protegidos pelos pesquisadores responsáveis contra qualquer tipo de uso que não os previstos na investigação. Além disto, os dados receberão um número pelo qual serão identificados, garantindo assim, também, o anonimato dos pacientes. A identidade do paciente será, portanto, totalmente desconhecida pela equipe do trabalho de pesquisa ou por qualquer outra pessoa.

Permissão para uso da amostra de DNA e outros dados em estudos futuros:

A partir da mesma amostra do material genético, poderão ser futuramente estudados outros segmentos de DNA. Para isso, o paciente (ou responsável) poderá permitir que sua amostra de DNA seja usada em novos estudos. Mesmo que esta permissão seja dada, estudos futuros só poderão ser realizados desde que sejam aprovados antes por um Comitê de Ética em Pesquisa.

Rubrica do Paciente (ou responsável)

Rubrica do Pesquisador

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____ (*preencher com nome do responsável*) fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informação a respeito dos procedimentos do estudo e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar. A equipe do Dr. Fernando S. Dias certificou-me de que todos os dados referentes ao paciente desta pesquisa serão confidenciais, bem como o seu tratamento não será modificado em razão desta pesquisa e que, ainda, terei a liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa se assim o desejar. Assim, como responsável pelo paciente _____ (*preencher com nome do paciente*), dou consentimento para que ele participe da pesquisa.

Paralelamente,
() permito que a amostra de material genético seja usada em pesquisas futuras, sem a necessidade de nova consulta, desde que os novos estudos sejam devidamente aprovados por um Comitê de Ética em Pesquisa e estejam sob responsabilidade do mesmo Pesquisador Coordenador. Fui informado que, também nesta situação, caso alguma informação considerada importante seja identificada no material genético analisado em decorrência da pesquisa, os pesquisadores poderão buscar ao paciente (ou ao responsável) para oferecer-lhe acesso a tal informação.
() não permito que o material genético seja usado em novos estudos.

Caso tenha novas perguntas sobre este estudo, posso telefonar ao Dr. Fernando S. Dias nos telefones (51) 99743803 ou (51) 3320 3000 ramal 3037. Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo, ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso chamar também à Dra. Clarice S. Alho nos telefones (51) 9113 6334 ou (51) 3320 3568 e os responsáveis pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-PUCRS no telefone (51) 3320 3000 ramal 3345. As ligações para os celulares poderão ser realizadas a cobrar.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

		___ / ___ / 20___
Assinatura do Paciente (ou responsável)	Nome do Paciente (ou responsável)	Data
		___ / ___ / 20___
Assinatura do Pesquisador	Nome do Paciente	Data

Na impossibilidade de autonomia para a leitura deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o mesmo foi lido para _____ (*preencher com nome do paciente ou do responsável*) pelo pesquisador _____ (*preencher com nome do pesquisador*) enquanto eu estava presente como testemunha.

		___ / ___ / 20___
Assinatura da Testemunha	Nome da Testemunha	Data

**Carta de Aceite Pelo Comitê de Ética em Pesquisa da
PUCRS**



Ofício nº 838/03-CEP

Porto Alegre, 11 de dezembro de 2003.

Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa intitulado: "Efeitos da herança de variantes gênicas polimórficas em pacientes com síndrome da angústia respiratória aguda (SARA)".

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Délio José Kipper
Coordenador do CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Dr(a) Fernando Suparregui Dias
N/Universidade

Ficha de Coleta de Dados dos Pacientes

Ficha de coleta de dados

**EFEITOS DA HERANÇA DE VARIANTES GÊNICAS
POLIMÓRFICAS EM PACIENTES COM
SÍNDROME DA ANGIÓSTIA RESPIRATÓRIA AGUDA (SARA)**

**Unidade de Terapia Intensiva Geral
Hospital São Lucas da PUCRS
Laboratório de Genética e Biologia Molecular
FaBio – PUCRS**

Nº

Iniciais

RG-HOSPITALAR

Dados Demográficos

Data Internação no hospital / /

Data Internação na UTI / /

Idade Sexo F M Peso Altura

Etnia: Branco Negro Amarelo Pardo Outra

Dados Clínicos

Comorbidades

Câncer Diabetes DPOC SIDA IRC Transplante

Imunossupressão Cirrose Outra

Fatores de Risco para LPA/SARA Sim Não

Primários

Infecção Pulmonar Difusa Aspiração Pulmonar

Inalação de tóxico Contusão pulmonar Afogamento

Secundários

Sepses Trauma não torácico grave

Politransusão de emergência Pancreatite

RG-HOSPITALAR

Nº

Iniciais

Escores Admissão

APACHE II

SOFA

Desfechos Hospitalares - DMOS

DATA									
SOFA	1	2	3	4	5	6	7	14	28
SNC									
SCV									
Respiratório									
Renal									
Hematológico									
Hepático									
Total									

Genotipagem

ECA: II ID DD

RG-HOSPITALAR

Nº

Iniciais

Desfechos Hospitalares

Assinale apenas uma alternativa	Início	Fim
Tempo internação na UTI	/ /	/ /
Período sob ventilação mecânica	/ /	/ /
Período de uso drogas vasoativas	/ /	/ /
Assinale apenas uma alternativa	Sim	Não
Alta da UTI		
Alta do hospital		
Óbito na UTI		
Óbito por hipoxemia refratária		
Óbito por choque refratário		
Óbito por DMOS		
Óbito por outra causa		
Em algum momento da internação na UTI fez uso de:	Sim	Não
Infusão contínua de Insulina		
Corticóide em baixas doses		
Terapia de substituição renal (diálise)		
Transfusão de CH		
Proteína C ativada		

Nº

RG-HOSPITALAR

Iniciais

Desfechos Hospitalares na LPA/SARA

LPA SARA

DATA									
DIA	1	2	3	4	5	6	7	14	28
Regime ventilatório									
FiO2									
PaO2/Fio2									
F. resp.									
VAC (ml/Kg)									
Vol. min.									
Ppl									
PIP									
Paw									
PEEP									
CEst									
LIS									
FC									
PAM									
PVC									
PAPm									
PCP									
IRVP									
IRVS									
ITSVD									
ITSVE									
IC									
DO2									
VO2									
ExtO2									
PIA									

Lista de Abreviaturas

APACHE II – Acute Physiological Age Chronic Health Evaluation II

ECA – enzima de conversão da angiotensina

EUA – Estados Unidos da América

FCEV – fator de crescimento do endotélio vascular

FiO₂ – fração inspirada de oxigênio

FNT α - fator de necrose tumoral alfa

I/D – inserção/deleção

IL - interleucinas

HAS – hipertensão arterial sistêmica

LBA – lavado bronco-alveolar

LPA – lesão pulmonar aguda

LIS – lung injury score

MBL – mannose binding lectin

NF- κ B – fator nuclear kappa beta

PEEP – *positive end-expiratory pressure*

RLO₂ – radicais livres de oxigênio

SARA – síndrome da angústia respiratória aguda

SNP – *single nucleotide polymorphism*

SRA – sistema renina-angiotensina

UTI – unidade de tratamento intensivo

VM – ventilação mecânica

**Carta de Recebimento do Periódico Intensive Care
Medicine**

30-Oct-2007

ICM Reference ICM-2007-00972

Dear Dr.Dias,

We hereby confirm receipt of your manuscript entitled "Angiotensin converting enzyme (ACE) insertion/deletion polymorphism and ARDS in a south Brazilian ICU". Like all work submitted for publication in our journal, it will be examined at our next editorial meeting and, if appropriate, then enter the process of review by out-of-house consultants.

Any questions regarding your manuscript should refer to the above number.

Thank you for considering Intensive Care Medicine for the publication of your work.

Yours sincerely,

Emiliano S. Tizi
ICM Editorial Assistant