

FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO GENE DO POLIMORFISMO DA ECA I/D NA POPULAÇÃO BRASILEIRA

GENOTYPIC AND ALLELIC FREQUENCIES OF I/D POLYMORPHISM OF ACE GENE IN THE BRAZILIAN POPULATION

Juarez INÁCIO¹, Luiz Ricardo GOULART FILHO², Gismar Silva VIEIRA³

RESUMO: A alta incidência de doenças cardiovasculares e o sucesso no tratamento de pacientes infartados, através do uso de inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA), intensificaram os estudos que objetivaram determinar uma associação entre o gene da ECA e o infarto agudo do miocárdio (IAM). A prévia identificação de uma provável associação do polimorfismo I/D do gene da ECA ao IAM é a principal justificativa desta investigação, e visa determinar as freqüências genotípicas e alélicas deste polimorfismo na população brasileira. Tais freqüências foram obtidas de amostras aleatórias provenientes de um banco de sangue de um hemocentro estadual, apenas com a identificação da origem amostral por região. O DNA foi isolado a partir da camada de leucócitos e o polimorfismo I/D (presença e/ou ausência de uma inserção *Alu* no intron 16) do gene da ECA foi determinado pela reação em cadeia da polimerase. A freqüência alélica na população brasileira, em geral, foi de 0,39 e 0,61 para os alelos I e D, respectivamente, semelhante a outras populações. Contudo, houve pequena variabilidade genotípica entre as regiões brasileiras, com variações principalmente entre os homocigotos II e DD, tendo como freqüências genotípicas médias II=0,20, ID=0,43 e DD=0,37, exceto para a região Sul, que foi uma variação genotípica significativamente diferente das demais, com tendência ao aumento do genótipo DD (0,54) e diminuição do heterocigoto (0,24), provavelmente devido à diferente composição étnica.

UNITERMOS: Enzima conversora da angiotensina; População Brasileira; Freqüência Alélica; Freqüência Genotípica.

INTRODUÇÃO

O sucesso no tratamento de pacientes infartados, através do uso de inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA), intensificou os estudos que objetivaram a determinação de associações entre o gene da ECA e o infarto do miocárdio. Cambien, Poirier e Lecerf (1992) demonstraram que o polimorfismo I/D do gene da ECA estava relacionado ao infarto agudo do miocárdio. Ainda que tais achados tenham sido comprovados por vários trabalhos científicos (BEOHAR, DAMARAJU, EVANS et al, 1994; LUDWIG et al, 1995; MATTU et al, 1995; PRATHER, 1995; RUIZ et al, 1994; TIRET et al, 1993), algumas investigações experimentais contestam estes resultados (BOHN et al, 1993; KATSUYA et al, 1995; LINDPAINTNER et al, 1995;). O desequilíbrio gênico de certas populações influenciado pelos fatores de riscos convencionais pode mascarar o verdadeiro efeito deste gene (ARAÚJO, 2003).

Como o sistema renina-angiotensina (SRA) é uma importante via metabólica na regulação da homeostase arterial, coordenando os processos de vasoconstrição e vasodilatação, passou-se a estudar os principais genes desta

via e seus polimorfismos na população. A determinação das freqüências genotípicas e alélicas do gene da ECA, na população brasileira, é condição básica para realizar comparações posteriores com diferentes grupos de patologias cardiovasculares que podem estar associadas a esse polimorfismo. Desta maneira objetivou-se determinar e comparar as freqüências alélicas e genotípicas entre as cinco regiões brasileiras.

MATERIAL E MÉTODOS

A colheita de amostras de sangue de 210 pessoas pertencentes a todos os estados brasileiros foi feita no Hemominas de Uberlândia. A seleção das amostras foi aleatória, obedecendo a seqüência de entrada. As proporções foram determinadas de acordo com o número de habitantes de cada região. As amostras foram coletadas no período de março de 1997 a junho de 1998. As 210 amostras de sangue ficaram assim distribuídas por região: Sul (30), Sudeste (92), Centro-Oeste (15), Norte (15) e Nordeste (58).

As amostras de sangue, colhidas de 210 pacientes foram conservadas a 4° C até o momento da extração do

¹ Doutorando, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Genética e matemática Aplicada à Biologia.

² Professor Titular, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia.

³ Diretor Técnico, Laboratório BioGenetics Tecnologia Molecular Ltda, Uberlândia, MG.

Received: 13/11/03 Accept: 07/04/04

DNA. A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com os procedimentos para microextração, adaptada a partir do protocolo de Sambrook, Fritsch, Maniatis, (1989). A camada de leucócitos foi separada por centrifugação e as células foram lavadas em solução tampão (100 mM Tris-HCl; 500 mM KCl e 15 mM MgCl₂), sendo submetidas à digestão por proteinase K (100 mg/ml). As proteínas e debris celulares foram precipitados por centrifugação. O DNA, em solução no sobrenadante, foi precipitado por etanol e ressuspenso em solução tampão. A reação em cadeia da polimerase foi realizada no equipamento MJ Research (PTC-100-60). O par de iniciadores da reação ("primers")

foi o mesmo descrito por Rigat et al. (1992). A reação consistiu de 1,0 mg de DNA, 2,5 U de Taq DNA polimerase, 10 pmoles de cada primer, 2,5 mM MgCl₂ e 200 mM de dNTPs. Procederam-se 35 ciclos nas seguintes temperaturas e tempos: 94°C/1 min; 60°C/30 seg e 72°C/ 1 min. Os produtos amplificados foram separados em eletroforese de agarose a 2,0% e visualizados em luz ultravioleta na presença de brometo de etídeo. Os amplicons foram classificados em homozigoto normal (II = 490 pb), heterozigoto (I/D = 490 e 203 pb) e homozigoto sem inserção (D/D = 203 pb). As frequências obtidas foram comparadas por meio do teste do qui-quadrado ao nível de 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene da ECA foi eficientemente amplificado e

seus genótipos facilmente identificados, conforme apresentados na Figura 1, e tabulados de acordo com a distribuição por região (Tabela 1).

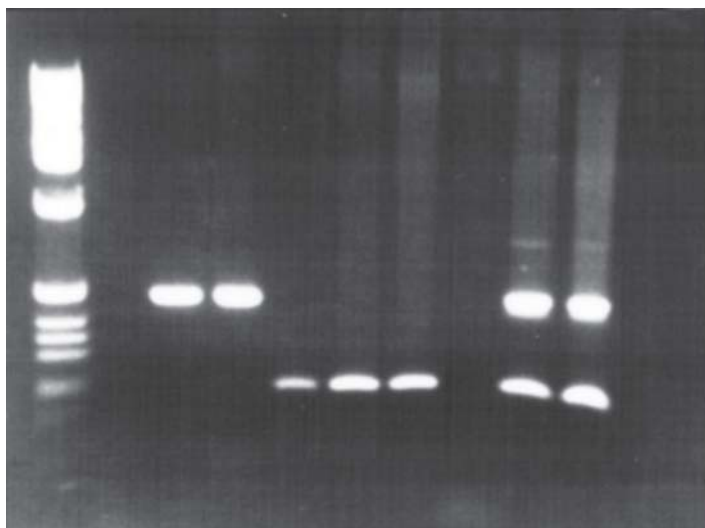


Figura 1

Produtos de amplificação da região polimórfica no intron 16 do gene ECA.

Linha 1 – Marcador de peso molecular.

Linha 2 e 3 – Genótipo II (Homozigoto).

Linhas 4, 5 e 6 – Genótipo DD (Homozigoto).

Linha 7 – Controle negativo da reação.

Linhas 8 e 9 – Genótipo ID (Heterozigoto).

Tabela 1. Distribuição dos genótipos do polimorfismo da ECA I/D, em cada região do Brasil.

Regiões	II	ID	DD	TOTAL
Norte	04	06	05	15
Nordeste	08	27	23	58
Sudeste	21	43	28	92
Sul	07	07	16	30
Centro-Oeste	02	07	06	15
TOTAL	42	90	78	210
Frequência	0,20	0,43	0,37	1,00

As frequências alélicas (Tabela 2) e genotípicas (Figura 2) foram determinadas para cada região e, posteriormente, somadas para se obter uma estimativa para a população brasileira. As frequências para o alelo I foram similares nas cinco regiões estudadas, variando de 0,35 a 0,47. Resultado semelhante também foi observado, para o

alelo D, com frequências alélicas entre 0,53 a 0,65. As frequências alélicas médias na população total foi de 0,39 para o alelo I e de 0,61 para o alelo D. Apenas a Região Sudeste apresentou a mesma frequência relatada por Cambien, Lecerf e Poirier (1992) para o alelo I (0,53).

Tabela 2. Frequências Alélicas do Polimorfismo da ECA I/D das regiões brasileiras.

Regiões	Frequência do Alelo I	Frequência do alelo D
Norte	0,47	0,53
Nordeste	0,37	0,63
Sul	0,35	0,65
Sudeste	0,46	0,54
Centro-Oeste	0,37	0,63

As frequências genotípicas foram estatisticamente semelhantes para as regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste ($P > 0,05$), com uma pequena variação na distribuição genotípica, porém não significativa, com uma frequência média de 0,20, 0,43 e 0,37 para os genótipos II, ID e DD, respectivamente. Em comparação com os dados de Araújo (1998), pode-se observar que as frequências foram similares: II (0,20), ID (0,40) e DD (0,40) tanto em pacien-

tes infartados quanto em pacientes controles.

Contudo, na região Sul, as frequências genotípicas foram estatisticamente diferentes das demais regiões ($P < 0,05$). O genótipo II (0,22) teve uma frequência similar às demais regiões, com diferenças significativas apenas para os genótipos ID (0,24) e DD (0,54). Este acréscimo na frequência do genótipo DD, sugere uma composição étnica diferente das demais regiões.

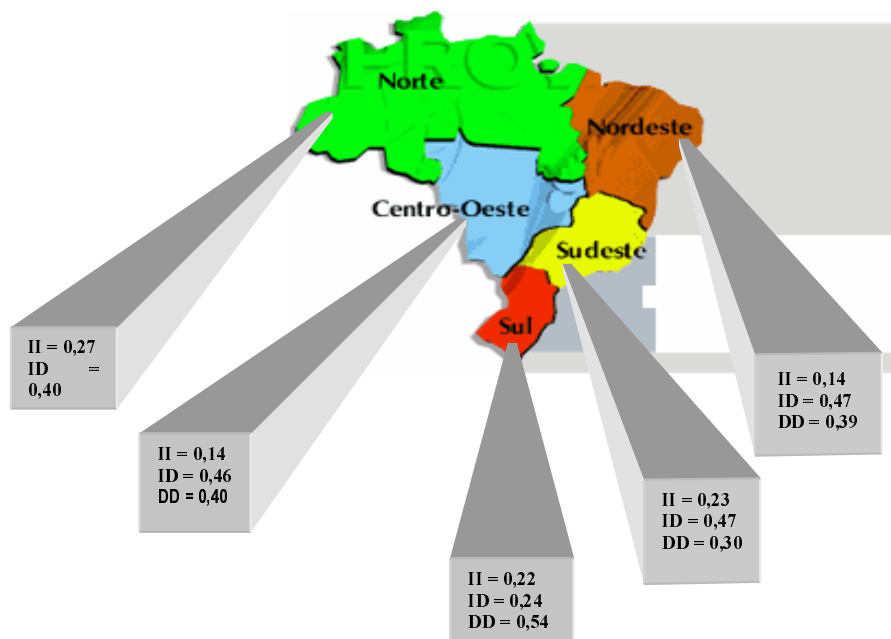


Figura 2. Distribuição das frequências genotípicas das cinco regiões do Brasil.

CONCLUSÃO

As frequências alélicas e genotípicas para as regiões brasileiras foram semelhantes, exceto para a região Sul, que apresentou frequências genotípicas estatisticamente diferentes, provavelmente devido à diferente formação étnica regional.

As frequências alélicas da ECA nas regiões brasileiras apresentaram valores médios de 0,39 para o alelo I e 0,61 para o alelo D. Os genótipos do polimorfismo I/D da ECA apresentaram as seguintes frequências: II=0,20, ID=0,43 e DD=0,37.

ABSTRACT: The high cardiovascular diseases incidence and the success in treating infarcted patients with angiotensin-converting enzyme inhibitors have determined a search for a possible correlation between the ACE gene and the acute myocardium infarction (AMI). Indeed, previous results have identified a probable association between I/D polymorphism of ACE gene and AMI, which justified the objective of this investigation. We have determined the allelic and genotypic frequencies for the Brazilian population focusing on each geopolitical region. Blood samples were obtained from a state center of donors' blood bank, characterizing only their origin. DNA was isolated from leukocyte layer, and the I/D polymorphism of the ACE gene (presence and/or absence of an *Alu* insertion within intron 16) was determined through the polymerase chain reaction. Allelic frequencies of the Brazilian population were 0.39 and 0.61 for I and D alleles, respectively, similar to other population frequencies. However, there was a small genotypic variability among regions, and variations have occurred mainly in homozygotes (II and DD). Average genotypic frequencies were: II=0.20, ID=0.43 and DD=0.37, except for the Southern population that presented a significant variation for the ID and DD alleles in comparison to all other regions, with an increasing frequency of DD (0.54) and decreasing frequency of ID (0.24), probably due to the different ethnic composition.

UNITERMS: Angiotensin-converting enzyme, Brazilian population, Allelic frequency, Genotypic frequency.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, M. A. **O gene da convertase na aterosclerose coronária e infarto agudo do miocárdio.** 1998., 80 f., Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

ARAÚJO, M. A. **Polimorfismos de genes do sistema renina-angiotensina na doença arterial coronariana.** 2003., 121 f., Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

BEOHAR, N.; DAMARAJU, S.; PRATHER, A. Angiotensin-I converting enzyme genotype DD is a risk factor for coronary artery disease. **J. Investig. Med.**, BC Decker, v. 43, n. 3, p. 275-280, Jun, 1995.

BOHN, M.; BERGE, K. E.; BAKKEN, A.; ERIKSSSEN, J.; BERG, K. Insertion/deletion (I/D) polymorphism at the locus for angiotensin I-converting enzyme and parental history of myocardial infarction. **Clin. Genet.**, Copenhagen, v. 44, n. 6, p. 298-301, Dec, 1993.

CAMBIEN, F.; POIRIER, O.; LECERF, L. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. **Nature**, London, v. 359, n. 15, p. 641-643, Oct, 1992.

EVANS, A. E.; POIRIER, O.; KEE, F.; LACERF, L.; MCCRUM, E.; FALCONER, T.; CRANE, J.; O'ROURKE, D. F.; CAMBIEN, F. Polymorphisms of the angiotensin-converting-enzyme gene in subjects who die from coronary heart disease. **Q. J. Med.**, Oxford, v. 87, n. 4, p. 211-214, Apr, 1994.

KATSUYA, T.; KOIKE, G.; YEE, T.W.; SHARPE, N.; JACKSON, R.; HORIUCHI, M.; PRATT, R. E.; DZAU, U. J.; MACMAHON, S. Association of angiotensinogen gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease. **Lancet**, London, v. 345, n. 8965, p. 1603, Jun, 1995.

LINDPAINTENER, K.; PFEFFER, M. A.; KREUTZ, R.; STAMPFER, M. J.; GRODSTEIN, F.; LAMOTTE, F.; BURING, J.; HENNEKENS, C. H. A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. **New Engl. J. Med.**, Boston, v. 332, n. 11, p. 706-11, Mar, 1995.

LUDWIG, E.; CORNELI, P. S.; ANDERSON, J. L.; MARSHALL, H. W.; LAOULEL, J. M.; WARD, R. H. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with myocardial infarction but not with development of coronary stenosis. **Circulation**, Dallas, v. 91, n. 8, p. 2120-2124, Apr, 1995.

MATTU, R. K.; NEEDHAM, E. W.; GLATON, D. J.; FRANGOS, E.; CLARK, A. J.; CAULFIELD, M. A DNA variant at the angiotensin-converting enzyme gene locus associates with coronary artery disease in the Caerphilly Heart Study. **Circulation**, Dallas, v. 91, n. 2, p. 270-274, Jan, 1995.

RIGAT, B.; HUBERT, C.; CORVOL, P.; SOUBRIER, F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin-converting enzyme gene (DCP 1). **Nucleic Acids Res.**, London, v. 20, n. 6, p. 1433, Mar, 1992.

RUIZ, J.; BLANCHE, H.; COHEN, N.; VELHO, G.; CAMBIEN, F.; CAHEN, D.; PASSA, P.; FROGUEL, P. Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene is strongly associated with coronary heart disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Proc Natl Acad Sci**, Washington, v. 91, n. 9, p. 3662-3665, Apr, 1994.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

TIRET, L.; KEE, F.; POIRIER, O.; NICAUD, V.; LECERF, L.; EVANS, A.; CAMBOU, J. .P.; ARVEILER, D.; LUC, G.; AMOUYEL, P. Deletion polymorphism in angiotensin-converting enzyme gene associated with parental history of myocardial infarction. **Lancet**, London, v. 341, n. 8851, p. 991-992, Apr, 1993.