

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITO DO POLIMORFISMO GÊNICO DA ENZIMA CONVERSORA DA
ANGIOTENSINA, NA SUA CONCENTRAÇÃO SÉRICA, EM PACIENTES
COM INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA**

Luciana Beatriz Tiago

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia para
a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG
Setembro/2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITO DO POLIMORFISMO GÊNICO DA ENZIMA CONVERSORA DA
ANGIOTENSINA, NA SUA CONCENTRAÇÃO SÉRICA, EM PACIENTES
COM INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA**

Luciana Beatriz Tiago

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho
Orientador

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia para
a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG
Setembro/2002

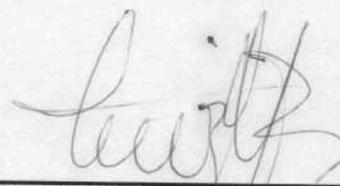
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITO DO POLIMORFISMO GÊNICO DA ENZIMA CONVERSORA DA
ANGIOTENSINA, NA SUA CONCENTRAÇÃO SÉRICA, EM PACIENTES
COM INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA**

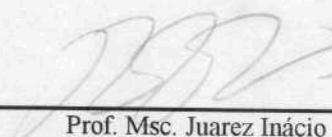
Luciana Beatriz Tiago

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM 10/09/02

NOTA 100



Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho
Orientador



Prof. Msc. Juarez Inácio
Co-orientador



Msc. Juliana Alves São Julião
Membro da Banca Examinadora

Uberlândia ____ de ____ de 2002.

A fertilidade da imaginação é imprescindível para que se efetue a passagem do imperfeitamente ao menos imperfeitamente conhecido, aquilo a que chamamos descobrimento.

DARWIN

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Osvaldo e Ivonete, que sempre estiveram ao meu lado dando-me força, amor, carinho, amizade, compreensão e apoio. Obrigada por tudo, inclusive pelas preces e paciência.

Agradeço a DEUS pela vida, ajuda e oportunidades concedidas.

Ao meu irmão Marcelo pela amizade, apoio e compreensão.

À minha querida sobrinha Anna Júlia por me dar forças para continuar. Obrigada Aninha por você existir!

Ao meu namorado, Juscelino, pelo amor, carinho, compreensão, apoio e amizade. Obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS:

- Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart pela amizade, orientação, ensinamentos, oportunidades e principalmente por ter acreditado na minha força de vontade em realizar este trabalho.
- Ao Prof. Msc Juarez Inácio pela amizade, orientação, ensinamentos e pela participação como membro da Banca Examinadora.
- À Bióloga Msc Juliana São Julião pela participação como membro da Banca Examinadora, pela amizade, ensinamentos e auxílios prestados durante a realização deste trabalho.
- A todos os meus amigos do Laboratório BioGenetics Tecnologia Molecular (Gismar, Cirino, Warlei, Juliana, Iris, Lígia, Jane, Thaene, Nice) pela amizade, compreensão e auxílios prestados.
- À minha querida avó Enedina pela amizade, carinho e conselhos.
- À minha sogra Rejane pela amizade, apoio e compreensão.
- Aos avós de meu namorado, Renato e Anésia; Juscelino e Guilhermina pela amizade e apoio.
- A todos os meus tios e tias que sempre me incentivaram muito.
- Aos meus cunhados Rodrigo e João Cláudio; e à minha cunhada Líbia pela amizade e apoio.
- A todos os meus amigos (Fernando, Júlia, Eder, José Luiz, Marcella, Elisângela, Raquel, Juliana, Rubens, Tatiana, Daniel, Beatriz, Edson, Sirlene) pela amizade, incentivo e auxílios prestados.
- Aos docentes do Instituto de Biologia pelos ensinamentos ministrados durante o curso.
- Ao Laboratório BioGenetics Teconologia Molecular pela oportunidade, pelo auxílio financeiro e por ter acreditado em meu trabalho.
- À Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade oferecida.
- Aos demais que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O polimorfismo I/D do gene da enzima conversora da angiotensina (ECA) tem sido associado com a progressão das doenças renais e provavelmente na mortalidade dos pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) devido a problemas cardiovasculares. Com o intuito de detectar o efeito do polimorfismo gênico da ECA, na sua concentração em níveis séricos, em pacientes com IRC e em indivíduos com função renal normal (grupo controle), foi realizada a genotipagem com base no intron 16 do gene da ECA por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). A medida da atividade da ECA foi procedida utilizando-se o kit da Sigma Diagnostics. Não foram encontradas diferenças significativas entre os genótipos II e ID em relação à concentração sérica da ECA pelo teste de Tukey, de modo que seus maiores níveis plasmáticos foram observados em pacientes com IRC apresentando o genótipo DD. Entretanto, o nível da ECA total nos pacientes com IRC diferiu significativamente do grupo controle. Os dados obtidos nesta pesquisa evidenciam a necessidade de se desenvolver outro marcador molecular que esteja mais associado à insuficiência renal crônica.

Palavras chave: Polimorfismo ECA, Insuficiência Renal Crônica, Atividade da ECA

ÍNDICE

1 – INTRODUÇÃO.....	01
2 – OBJETIVOS.....	03
3 – REVISÃO DE LITERATURA.....	04
3.1 – Insuficiência Renal Crônica (IRC).....	04
3.2 – Etiologia da IRC.....	04
3.3 – Manifestações clínicas e fisiológicas.....	07
3.4 – Diagnóstico da insuficiência renal crônica.....	07
3.5 – O sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA).....	09
3.6 – Importância do SRAA no controle da pressão e na hipertensão.....	12
3.7 – O gene da enzima conversora da angiotensina (ECA).....	13
3.8 – A reação em cadeia da polimerase (PCR).....	14
4 – MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1 – Material biológico.....	15
4.2 – Extração do DNA.....	15
4.3 – PCR para genotipagem do gene da ECA.....	16
4.4 – Medida da atividade da enzima conversora da angiotensina.....	17
4.5 – Análise estatística.....	17
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
6 – CONCLUSÕES.....	24
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1. Causas da Insuficiência Renal Crônica (IRC).....	06
Tabela 2. Comparação de médias entre pacientes renais crônicos e controles entre os genótipos do gene da ECA.....	22

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1. Modelo dos Sistemas Renina Angiotensina e Cinina Calicreína	11
Figura 2. Produtos de amplificação da região polimórfica no intron 16 do gene da ECA detectados por eletroforese em gel de agarose 1,5%	19
Figura 3. Comparação entre os genótipos dos grupos controle e renais crônicos.....	19
Figura 4. Frequência alélica dos grupos controle e renais crônicos	20
Figura 5. Níveis de ECA menores que 90 U/L	21
Figura 6. Níveis de ECA maiores que 90 U/L	21

1 - INTRODUÇÃO

A variabilidade na concentração da enzima conversora da angiotensina (ECA) no plasma tem sido associada com polimorfismos encontrados no seu gene codificante (SCHMIDT et al., 1996). Alguns autores têm demonstrado a associação do genótipo DD com uma significativa elevação da ECA no plasma (TIRET et al., 1992). A interação alélica D deste polimorfismo se associa, de maneira codominante, com os altos níveis da ECA, de modo que as maiores concentrações são observadas no genótipo DD, com valores intermediários em ID e menores em II (AGERHOLM-LARSEN et al., 2000).

O polimorfismo do gene da ECA exerce uma influência genética na progressão das doenças renais, de maneira mais acentuada, nas nefropatias. Pacientes com o genótipo DD possuem uma progressão acelerada no estágio final da insuficiência renal (VLEMING et al., 1999). Este polimorfismo tem sido associado com a progressão das doenças renais e provavelmente na mortalidade dos pacientes com insuficiência renal, causada por problemas cardiovasculares (YOSHIDA et al., 1996).

O sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) exerce um importante papel na regulação da pressão sanguínea, no balanço de fluídos, na homeostase eletrolítica e na patogenia da doença cardiovascular (WANG & STAESSEN, 2000). A enzima inicial, renina, quebra seu substrato, o angiotensinogênio, em angiotensina I, um decapeptídeo. A angiotensina I passa por uma segunda modificação, catalisada pelas enzimas serina proteinase e a enzima conversora da angiotensina (ECA), uma glicoproteína encontrada nos pulmões, células endoteliais e plasma (GRANNER, 1990), gerando assim a angiotensina II, um octapeptídeo.

A via receptor I da angiotensina II age como um potente vasoconstrictor e peptídeo estimulador da aldosterona e a ECA inativa o nonapeptídeo bradicinina, bloqueando o sistema caliceína nos tecidos (WANG & STAESSEN, 2000).

Vários nonapeptídeos análogos à angiotensina I inibem a ECA e, portanto são utilizados no tratamento da hipertensão renina-dependente. A ECA também degrada a bradicinina, um potente vasodilatador, e deste modo, aumenta a pressão sanguínea (GRANNER, 1990).

A angiotensina II aumenta a pressão sangüínea por sua ação de vasoconstrição em arteríolas, sendo a substância vasoativa mais potente que se conhece. Ela inibe a liberação de renina pelas células justaglomerulares, além de ser uma potente estimuladora de aldosterona (GRANNER, 1990).

Em algumas espécies a angiotensina II é convertida em angiotensina III, igualmente um potente estimulante da produção de aldosterona. No homem, os níveis plasmáticos de angiotensina II é quatro vezes maior que os de angiotensina III. Tanto a angiotensina II, como a angiotensina III, são rapidamente inativadas pelas angiotensinases (GRANNER, 1990).

A atividade das enzimas de conversão foi inicialmente mostrada no plasma, mas sabe-se hoje que o local principal de conversão de angiotensina I em angiotensina II é o pulmão (YATES et al., 1982). A enzima pulmonar cliva angiotensina I dez vezes mais avidamente do que o faz a enzima plasmática, e parece ser responsável por mais da metade da conversão *in vivo* (YATES et al., 1982).

Mais recentemente, verificou-se que a atividade da enzima conversora da angiotensina (ECA) estava associada ao aparelho justaglomerular. Esta observação foi de considerável significado para as teorias correntes sobre o controle da liberação de renina, uma vez que a angiotensina II pode ser formada localmente em um sítio de liberação de renina e exerce efeitos diretos sobre o rim (YATES et al., 1982).

2 – OBJETIVOS

- Determinar as frequências alélicas e genóticas do polimorfismo da enzima conversora da angiotensina (ECA), em pacientes com insuficiência renal crônica (IRC);
- Comparar essas frequências com um grupo de indivíduos que não apresentam insuficiência renal (grupo controle);
- Detectar o efeito do polimorfismo gênico da ECA, na sua concentração em níveis séricos, nos pacientes com IRC e no grupo controle.

3 – REVISÃO DE LITERATURA

3.1 – Insuficiência Renal Crônica (IRC)

A insuficiência renal crônica é um estado no qual o metabolismo corporal está acometido como consequência da disfunção dos rins. Existem várias manifestações clínicas provocadas pelo distúrbio metabólico. Muitas delas são atribuídas à falha na excreção ou na conservação de várias substâncias químicas pelos rins (WALTER & ISRAEL, 1979).

O rim é o regulador mais importante do fluido extracelular; ele controla a concentração de vários eletrólitos, sendo essencial para o balanço ácido-base; é também responsável pela excreção de produtos residuais nitrogenados. Além disso, o rim pode fazer parte da manutenção da pressão sanguínea, estando envolvido na eritropoiese e no metabolismo da vitamina D (WALTER & ISRAEL, 1979).

A insuficiência renal crônica provoca a perda irreversível de grande número de néfrons funcionantes. Sintomas clínicos sérios em geral não ocorrem até que o número de néfrons funcionais caia, pelo menos 70% abaixo do normal. De fato, concentrações sanguíneas relativamente normais da maioria dos eletrólitos e volumes normais do líquido corporal podem ainda ser mantidos até que o número de néfrons funcionantes diminua abaixo de 20 a 30% do normal (GUYTON & HALL, 1997).

3.2 – Etiologia da IRC

A agressão dos rins de natureza mais persistente, freqüentemente não é reversível e ocasiona destruição progressiva da massa dos néfrons. As causas mais comuns de insuficiência renal crônica (IRC) são a glomerulonefrite, doenças tubulointersticiais, nefropatia diabética e nefrosclerose. Qualquer que seja sua causa, o impacto posterior da

intensa redução da massa dos néfrons é uma alteração na função de praticamente todos os sistemas orgânicos do corpo (BRENNER & LAZARUS, 1983).

Uremia é o nome geralmente dado à síndrome clínica observada em pacientes que sofrem grande perda da função renal. Essa denominação é devida às anormalidades evidentes em pacientes com IRC, resultantes da retenção no sangue da uréia e de outros produtos finais do metabolismo normalmente excretados na urina. Como a IRC abrange mais que uma simples retenção no sangue de componentes urinários normais, a denominação de uremia não tem qualquer conotação fisiopatológica, mas é empregada para designar, em sentido geral, os sinais e sintomas da IRC, qualquer que seja sua etiologia (BRENNER & LAZARUS, 1983).

Dados epidemiológicos têm sugerido que somente a minoria de pacientes com doenças renais, causadas por diabetes mellitus, hipertensão e doenças glomerulares crônicas são susceptíveis a complicação da insuficiência renal progressiva e a doença renal em estágio final (GUMPRECHT et al., 2000).

Diferenças raciais, status sócio-econômicos e fatores ambientais, embora estejam presentes, não implicam o marcante aumento do risco de doenças renais nos pacientes. Grupos familiares, os quais foram investigados em uma variedade de doenças renais, bem como de IRC, auxiliam no argumento de que fatores genéticos têm um importante papel no desenvolvimento de doenças renais. Assim, as interações entre múltiplos fatores genéticos e ambientais estão diretamente envolvidos no processo da insuficiência renal progressiva e no desenvolvimento de várias doenças renais (GUMPRECHT et al., 2000).

Em geral, a insuficiência renal crônica pode ocorrer por causa de distúrbios dos vasos sangüíneos, glomérulos, túbulos, interstício renal e do trato urinário inferior. A tabela 1 na página posterior mostra algumas causas de insuficiência renal crônica (GUYTON & HALL, 1997).

Tabela 1 – Causas de insuficiência renal crônica (IRC)

Distúrbios Imunológicos Glomerulonefrite Poliarterite nodosa Lúpus eritematoso
Distúrbios metabólicos Diabetes mellitus Amiloidose
Distúrbios vasculares renais Aterosclerose Nefrosclerose
Infecções Pielonefrite Tuberculose
Distúrbios tubulares primários Nefrotoxinas (analgésicos, metais pesados)
Obstruções do trato urinário Cálculos renais Hipertrofia da próstata Constrição uretral
Distúrbios congênitos Doença policística Ausência congênita de tecido renal (hipoplasia renal)

3.3 – Manifestações clínicas e fisiológicas

A apresentação, intensidade de sinais e sintomas da uremia, freqüentemente variam muito de um paciente para outro, dependendo, pelo menos em parte, do grau de redução da massa renal funcionante, bem como da rapidez com que é perdida a função renal (BRENNER & LAZARUS, 1983).

Em fase relativamente inicial da IRC, quando a taxa de filtração glomerular total (TGF) é reduzida para valores entre 35% e 50% do normal, a função renal global é suficiente para manter o paciente assintomático, embora a reserva renal já esteja diminuída. Nessa fase de disfunção renal, a função secretora basal, a de biossíntese e outras funções reguladoras dos rins estão geralmente bem preservadas. Em fase um pouco mais tardia, no curso da IRC (TGF próxima a 20% - 30% do normal), ocorre a hiperazotemia e aparecem geralmente as manifestações iniciais de insuficiência renal, sendo a hipertensão e a anemia as mais comuns das primeiras anormalidades. Outras perturbações são a intolerância a carboidratos, hiperuricemia, hipertrigliceridemia e redução da capacidade de concentrar a urina que leva à poliúria e à noctúria (BRENNER & LAZARUS, 1983).

Com maior perda da massa de néfrons (TGF abaixo de 20% a 25% do normal), o paciente apresenta insuficiência renal manifesta que, além do maior grau de anemia e hipertensão, caracteriza-se por acidose metabólica, sobrecarga de líquidos e vários distúrbios dos sistemas nervoso, cardiovascular e gastrointestinal. A uremia pode ser considerada como fase final deste processo, quando muitas ou todas as manifestações indesejáveis da IRC tornaram-se clinicamente evidentes (BRENNER & LAZARUS, 1983).

3.4 – Diagnóstico da Insuficiência Renal Crônica

Os diagnósticos devem incluir os testes qualitativos para a glicosúria e hematúria e um teste quantitativo para proteinúria; o pH da primeira urina matinal; a microscopia urinária e a cultura de urina; a uréia do plasma ou do soro, a creatinina, o sódio, o potássio, o cloreto, o bicarbonato, o urato, o cálcio, o fósforo, a fosfatase alcalina, a proteína total e a eletroforese; e a radiografia simples do trato urinário. A radiografia torácica, o eletrocardiograma, o magnésio do soro e a depuração da creatinina devem também ser incluídos no estudo inicial, mas não para o diagnóstico diferencial. Se não se observam as dimensões renais pela radiografia simples, muitas vezes elas são reveladas pela tomografia (KERR, 1977).

Os rins pequenos e simétricos que conservam a imagem dos cálices são encontrados em muitas doenças renais crônicas, notavelmente na maioria das formas de glomerulonefrite (KERR, 1977).

A pielonefrite crônica é confirmada pela cicatrização assimétrica e regular; com os cálices em forma de baqueta; na insuficiência renal tardia, quando os detalhes dos cálices são difíceis de serem visualizados, um grande aumento na gordura peripelvica nas tomografias é um sinal útil (KERR, 1977).

De acordo com trabalhos descritos na literatura, a nefropatia diabética tem sido a maior determinante de morbidade e mortalidade de pacientes diabéticos insulino-dependentes (DORIA et al., 1994).

Estudos anteriores de grupos familiares com nefropatia diabética auxiliam na confirmação da hipótese de que fatores genéticos também contribuem para a susceptibilidade de nefropatia diabética (SEAQUIST et al., 1989; QUINN et al., 1992).

Segundo DORIA et al. (1994), polimorfismos no gene da ECA podem contribuir para a susceptibilidade genética a complicações renais em pacientes diabéticos insulino-dependentes.

Vários estudos têm demonstrado que o polimorfismo I/D do gene da ECA está fortemente associado com os níveis da enzima circulante e com o aumento do risco de doença coronária, em pacientes não diabéticos (CAMBIEN et al., 1992).

Segundo TARNOW et al. (1995), o polimorfismo I/D do gene da ECA não contribui para a susceptibilidade genética à nefropatia diabética e retinopatia proliferativa, enquanto o aumento na concentração da ECA no plasma pode ter importância no início e na progressão da nefropatia diabética em pacientes caucasianos.

Em um estudo recente, dados evidenciaram que o alelo D do gene da ECA está associado com a nefropatia diabética, IgA glomerulonefrite e com a progressão da doença renal. A associação deste alelo com a nefroangiosclerose tem sido também muito investigada. A hipótese de que este alelo possa agir pelo menos como marcador, no diagnóstico da nefroangiosclerose, foi confirmada (MALLAMACI et al., 2000).

De acordo com YOSHIDA et al. (1996), o polimorfismo do gene da ECA está associado com a perda da função renal, em pacientes com nefropatia diabética, mas o polimorfismo de outros genes que fazem parte do SRAA, especificamente o polimorfismo M235T do gene do angiotensinogênio e o polimorfismo A1166C do gene AT1, não estão associados com a perda progressiva da função renal, em pacientes diabéticos insulino-independentes.

3.5 – O Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA)

O sistema renina angiotensina aldosterona é composto pela renina, angiotensinogênio (AGT), enzima conversora da angiotensina (ECA) e pelos genes dos receptores tipos 1 e 2 da angiotensina II (AGTR1 e AGTR2) (CRISAN & CARR, 2000).

O gene da renina está localizado no cromossomo 1q32, medindo aproximadamente 12 Kb, sendo composto por 10 éxons e 9 íntrons (COHEN-HAGUENAUER et al., 1989; HADMAN et al., 1984).

O gene do angiotensinogênio localiza-se no cromossomo 1q42-43, mede aproximadamente 13 Kb e é composto por cinco éxons e quatro íntrons (MALIK et al., 1997; PHILIPP et al., 1998).

O gene da enzima conversora da angiotensina (ECA) está no cromossomo 17q23, mede 21 Kb, e é composto por 26 éxons e 25 íntrons (HUBERT et al., 1991; MATTEI et al., 1989).

A renina é uma glicoproteína ácida, com cerca de 42.000 daltons de peso molecular, sintetizada pelas células justaglomerulares dos rins, a partir de um precursor, a pro-renina ou grande renina, que é a forma inativa circulante da mesma (SILVA, 2001).

Os estímulos para a secreção da renina são a diminuição do volume intravascular e da pressão sanguínea, com menor estiramento da arteríola aferente; depleção de sal, com menor oferta de cloreto de sódio ao nível do túbulo distal e mácula densa; alterações de decúbito, hemorragia e situações de estresse, onde haveria uma ativação por meio de receptores beta-adrenérgicos renais (SILVA, 2001).

De modo geral, a renina não atua diretamente. Ela aumenta a pressão arterial e a secreção de aldosterona, por intermédio do angiotensinogênio (globulina do plasma). Atuando sobre o angiotensinogênio, a renina libera um decapeptídeo, a angiotensina I. Uma enzima do plasma remove dois aminoácidos da angiotensina I, formando a angiotensina II, um octapeptídeo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995).

Os principais efeitos fisiológicos da angiotensina II são os de aumentar a pressão sanguínea e a secreção de aldosterona pelo córtex da adrenal. A aldosterona é um hormônio que inibe a secreção de sódio pelos rins. A deficiência em sódio é um estímulo para a liberação da renina, que acelera a secreção de aldosterona, indo essa substância inibir a secreção de sódio. Inversamente, o excesso de sódio no sangue deprime a secreção de renina, que inibe a produção de aldosterona, e isto aumenta a excreção de sódio na urina (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995).

O sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) funciona como um sistema endócrino. O gene da renina é expresso primariamente em células justaglomerulares do rim, onde a renina é sintetizada, depositada e liberada na circulação. A pro-renina é clivada para formar a renina, a qual é depositada em grânulos nos tecidos até que ela seja liberada em resposta a estímulos específicos (CRISAN & CARR, 2000).

A secreção da renina é controlada por vários fatores. A mácula densa é um grupo especializado de células tubulares contorcidas distais que agem como quimiorreceptores para controlar os níveis de sódio e cloreto no túbulo distal (CRISAN & CARR, 2000).

A retenção de sódio aumenta o volume de sangue, provocando o aumento da pressão sanguínea. A alta pressão sanguínea ativa um "feedback" negativo na regulação das células justaglomerulares do rim, o qual sofre perfusão da pressão renal e a produção da renina é inibida. A secreção da renina é então automaticamente modulada via inervação simpática dos túbulos renais e arteríolas (CRISAN & CARR, 2000).

A renina circulante catalisa a conversão do angiotensinogênio (AGT) para angiotensina I. O gene do angiotensinogênio é expresso no fígado, pelo sítio de síntese e liberação do AGT na circulação. A angiotensina I (ANGI) gerada pela atividade da renina é um decapeptídeo vasoativo. A conversão da angiotensina I para angiotensina II (ANGII) é a reação principal no SRAA (figura 1), gerando o efetor do sistema – a ANGII – que é um potente vasoconstritor. A reação é catalisada pela ECA, uma zinco metalopeptidase, membro da família Alu que funciona como uma dipeptidil carboxipeptidase (DCPI) (CRISAN & CARR, 2000).

A ECA circulante é encontrada em fluídos biológicos como plasma, fluídos amnióticos e seminais, sendo originada de células endoteliais (CRISAN & CARR, 2000). A ECA também age como uma protease na bradicinina, clivando o dipeptídeo Phe-Arg na extremidade C-terminal, com a função de inativar este vasodilatador. Além disso, a atividade enzimática da ECA regula dois efeitos: a ativação de um agente vasoconstritor (ANGII) e a inativação de um agente vasodilatador (bradicinina). A ANGII é também um peptídeo estimulador da aldosterona. A aldosterona promove depleção de potássio enquanto provoca retenção de sódio e água. Assim, a ANGII exerce um "feedback" negativo na produção de renina (CRISAN & CARR, 2000).

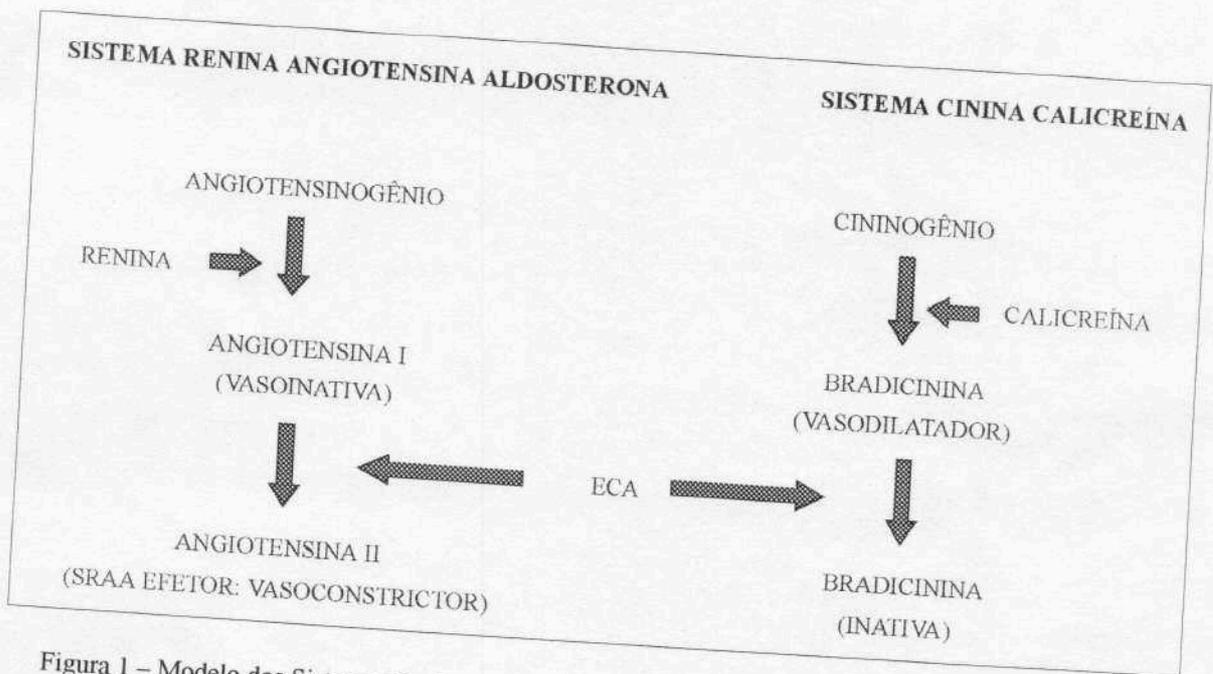


Figura 1 – Modelo dos Sistemas Renina Angiotensina e Cinina Calicreína

3.6 – Importância do Sistema Renina-Angiotensina no controle da pressão e na hipertensão

Além da capacidade de controlar a pressão arterial por meio de alterações do volume do líquido extracelular, os rins também têm outro potente mecanismo para o controle da pressão – o sistema renina-angiotensina (GUYTON, 1993).

A angiotensina II, durante sua persistência no sangue, exerce dois efeitos principais que podem elevar a pressão arterial. O primeiro deles, vasoconstrição, ocorre muito rapidamente, em segundos. A vasoconstrição é muito intensa nas arteríolas e consideravelmente menor nas veias. A constrição das arteríolas aumenta a resistência periférica, regulando a pressão arterial. Também, a constrição leve das veias promove aumento do retorno venoso do sangue para o coração, ajudando o coração a bombear contra a pressão crescente (GUYTON, 1993).

O segundo meio principal de aumento da pressão arterial pela angiotensina é o de agir sobre os rins, diminuindo a excreção de sal e água. Isso aumenta o volume de líquido extracelular, o que, então, aumenta lentamente a pressão arterial, durante um período de horas ou dias. Esse efeito a longo prazo, atuando por meio do mecanismo de volume de líquido extracelular, é ainda mais potente que o mecanismo vasoconstritor agudo para restabelecer a pressão arterial ao normal (GUYTON, 1993).

A angiotensina leva os rins a reterem tanto sal quanto água por duas maneiras distintas. Na primeira, a angiotensina atua diretamente sobre os rins, causando retenção de água e sal. E na segunda, a angiotensina leva as glândulas supra-renais a secretarem aldosterona, e esta, por sua vez, aumenta a reabsorção de sal e água pelos túbulos renais (GUYTON, 1993).

Para atingir o equilíbrio entre a ingestão e a excreção de líquido, a pressão arterial deve elevar-se até um nível consideravelmente maior, para superar esses dois efeitos de retenção de líquido da angiotensina. Por esta razão, sempre que houver quantidades excessivas de angiotensina no sangue circulante, todo o mecanismo rim-líquidos corporais para controle da pressão arterial é automaticamente ajustado em um nível de pressão mais elevado que o normal (GUYTON, 1993).

A angiotensina exerce vários efeitos intra-renais que levam os rins a reterem sal e água. Provavelmente, o mais importante é contrair os vasos sanguíneos renais, reduzindo, assim, o fluxo sanguíneo pelos rins. Conseqüentemente, há menor volume de filtrado plasmático nos glomérulos. Também, o lento fluxo sanguíneo pelos capilares peritubulares

reduz sua pressão, o que permite a rápida reabsorção osmótica de líquido dos túbulos. Por essas duas razões, é excretada menor quantidade de urina. Além disso, a angiotensina exerce fraco efeito sobre as próprias células tubulares para aumentar a reabsorção tubular de sódio e água. O resultado total desses efeitos é muito significativo, algumas vezes o débito urinário é reduzido em até quatro a seis vezes (GUYTON, 1993).

3.7 – O Gene da Enzima Conversora da Angiotensina (ECA)

Como já foi mencionado anteriormente, o gene da ECA está no cromossomo 7q23, possui 21 Kb, e é constituído por 26 éxons e 25 íntrons (HUBERT et al., 1991; MATTEI et al., 1989). Ele é caracterizado pela inserção (I) ou deleção (D) no íntron 16, de 287 pares de base. O polimorfismo I/D do gene da ECA resulta em três genótipos distintos: II, ID e DD (RIGAT et al., 1992). O genótipo DD está associado com o dobro do nível da atividade sérica da ECA, em relação ao genótipo II e níveis intermediários nos heterozigotos (CAMBIEN et al., 1994).

O polimorfismo do gene da ECA foi inicialmente detectado por RFLP (Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos de Restrição) e Southern Blot, utilizando-se sondas de cDNA em humanos (RIGAT et al., 1990).

Em estudos subseqüentes do polimorfismo da ECA e associações a doenças, usou-se a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para amplificação de DNA genômico. A primeira PCR baseada na detecção do polimorfismo I/D do gene da ECA foi relatada por RIGAT et al. (1992) que utilizaram “primers” flanqueando a seqüência de inserção. O produto amplificado correspondia aos alelos I e D, diferindo em tamanho pelo comprimento da seqüência de inserção de 287 pb, o que permitiu a discriminação entre os três genótipos: II, ID e DD.

Existe uma probabilidade de erro de genotipagem, em que o alelo I/D pode ser confundido com o alelo DD (SHANMUGAN et al., 1993). Entretanto, SINGER et al. (1996) relataram que essa probabilidade tem sido estimada em aproximadamente 5% de troca do alelo I/D pelos alelos D/D, porém esta estimativa se baseia em estudos que utilizaram métodos mais antigos. Desse modo, não parece possível que a afirmação de CAMBIEN et al. (1992) esteja errada, pelo simples fato de que um grande número de estudos divulgaram o mesmo resultado demonstrado por ele. Assim, vários trabalhos apresentam o uso de “primers” específicos de inserção para evitar o erro de genotipagem, onde há troca do alelo I/D pelo DD (MISSOURIS et al., 1996; EVANS et al.; SINGER et al., 1996).

3.8 – A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O desenvolvimento da técnica da reação em cadeia da polimerase aumentou muito a eficiência de detecção de polimorfismos ao nível do DNA ou RNA, traduzida em redução do tempo de execução dos experimentos, do seu custo e da sua complexidade (MATIOLI & PASSOS-BUENO, 2001).

Desde sua concepção por Kary Mullis em 1985, a PCR tem tornado seqüências gênicas até então inacessíveis ou difíceis de serem obtidas, possíveis para isolamento, análise, clonagem e manipulação *in vitro*. A PCR consiste em uma técnica *in vitro* fundamentalmente simples, rápida e sensível, capaz de produzir, em poucas horas especificamente, milhões de cópias de uma determinada seqüência (WALKER & RAPLEY, 1999).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é caracterizada pela amplificação do DNA *in vitro* por uma série de ciclos de polimerização, consistindo em três passos, dependentes da temperatura: a desnaturação do DNA; a temperatura de anelamento (T_a) dos “primers” e a síntese do DNA alvo por uma DNA polimerase termoestável. A pureza e o sucesso da reação dependem de vários parâmetros, um dos quais é a temperatura de anelamento (T_a). Se a reação ocorrer com T_a abaixo da T_a ótima, poderão ser formados produtos inespecíficos e o nível de produção dos produtos amplificados, obviamente diminui (MULLIS, 1990).

A quantidade de cloreto de magnésio, Taq DNA polimerase, DNA “molde” e “primer” também devem ser otimizadas para que seja possível obter o produto amplificado a partir dos termocicladores (MULLIS, 1990).

A aplicação da PCR causou uma revolução na Biologia Molecular, trazendo avanços para diagnósticos de doenças humanas, identificação e melhoramento de plantas e animais (INÁCIO, 1998).

4 - MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi realizada no Laboratório BioGenetics Tecnologia Molecular Ltda e no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia em Uberlândia, MG.

4.1 - Material biológico

As amostras de sangue periférico e de soro de pacientes com insuficiência renal crônica e controles, devidamente codificadas sem qualquer identificação, foram doadas pelo Laboratório BioGenetics, para fins de realizar estudo populacional de variações gênicas, sem comprometimento ético.

As amostras foram classificadas em dois grupos, sendo o primeiro formado por 138 amostras de pacientes com insuficiência renal crônica e o segundo por 138 amostras de indivíduos com função renal normal (grupo controle), totalizando 276 amostras, que foram posteriormente processadas para a extração do DNA e genotipagem.

A segunda parte do estudo foi baseada na medida da atividade da enzima conversora da angiotensina (ECA), no soro de 37 amostras de pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) e 48 amostras de indivíduos com função renal normal (grupo controle), utilizando-se o kit da Sigma Diagnostics.

4.2 - Extração do DNA

A extração do DNA foi feita segundo o método de isolamento de DNA adaptado por SAMBROOK et al. (1989). O sangue, armazenado a 4°C, foi centrifugado para separação da camada de leucócitos. Uma alíquota de 500 µl dessa camada foi transferida para um eppendorf de 1,5 ml e acrescentou-se 1,0 ml de Tampão de Lise de Hemácias (TLH) cuja composição é: (NH₄Cl 155 mM; KHCO₃ 10 mM e EDTA 1 mM), em cada amostra, misturando por inversão durante 30 segundos.

A mistura foi centrifugada a 2.500 rpm durante 5 minutos para peletar os núcleos. Descartou-se o sobrenadante, repetindo-se o passo por 2 a 3 vezes, até que o pelete adquirisse uma coloração creme claro. Foram adicionados 150 µl do Tampão de Lise Nuclear (TLN) composto por [Tris-HCl 10 mM (pH 8,0); EDTA 2 mM; NaCl 400 mM] e ressuspendeu-se o pelete. Adicionou-se, então, 5 µl de SDS gelado (Dodecil Sulfato de Sódio) a 10% e 25,0 µl de proteinase K (20 mg/ml) à solução e as amostras foram incubadas por 6 horas à 60°C ou over-night. Posteriormente, 100 µl de NaCl saturado foram adicionados às amostras e estas foram colocadas em gelo por 10 minutos.

As mesmas foram centrifugadas a 2.500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido e adicionou-se 800 µl de etanol absoluto a temperatura ambiente, misturando-se por inversão até que ocorresse a precipitação. Girou-se o tubo em seu eixo no seu sentido horizontal, para prender o DNA à parede do tubo, descartando-se o sobrenadante. Em seguida, o pelete foi lavado em 1,0 ml de etanol 70%. Finalmente, o álcool foi descartado e o pelete foi ressuscitado em um volume variável de água deionizada, de acordo com o tamanho do mesmo.

4.3 – PCR para genotipagem do gene da ECA

O fragmento correspondente ao íntron 16 do gene da ECA foi amplificado conforme os primers descritos abaixo:

5' CTGCAGACCACTCCCATCCTTTCT 3'

5' GATGTGGCCATCACATTGGTCAGAT 3'

Cada reação foi constituída por 3µl de DNA, 10 pmol de primer, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 mmol/l de cada dNTP, 1 U de Taq DNA polimerase e 1X tampão da Taq DNA polimerase em um volume final de 25 µl.

Procederam-se 35 ciclos nas seguintes temperaturas e tempos: 94°C/1min; 60°C/30 segundos e 72°C/1 minuto. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e visualizados em luz ultravioleta, na presença de brometo de etídio. Os produtos analisados esperados tiveram três conformações: homozigoto normal (I/I: molécula de DNA com 490 pares de bases), heterozigoto (I/D: molécula de DNA com 490 e 203 pares de bases) e homozigoto sem inserção (D/D: molécula de DNA com 203 pares de bases).

4.4 – Medida da atividade da enzima conversora da angiotensina (ECA)

A medida da ECA foi procedida utilizando-se o kit da Sigma Diagnostics. As amostras de plasma foram processadas no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

Foram feitas duas medidas da absorbância no espectrofotômetro a 340 nm; uma medida inicial e outra final. Inicialmente, foi preparado o reagente ACE adicionando-se na mistura do kit 10 ml de água deionizada. Em seguida, preparou-se o calibrador ACE adicionando-se à mistura 1,0 ml de água deionizada. Posteriormente, adicionou-se 1,0 ml do reagente ACE nas cubetas teste e calibrador. Em seguida, foram adicionados 100 µl do calibrador na cubeta, misturou-se por inversão, e mediu-se a absorbância no espectrofotômetro a 340 nm. Depois, colocou-se 100 µl da amostra na cubeta teste, misturou-se por inversão, e mediu-se a absorbância também. Logo após, as amostras medidas foram mantidas a 37°C por 5 minutos.

Em seguida, foi feita uma nova medida após 5 minutos de incubação. Os cálculos foram feitos de acordo com a seguinte fórmula presente no kit:

$$\text{ACE (U/L)} = \Delta A/5 \text{ min Teste} / \Delta A/5 \text{ min Calibrador} \times \text{Atividade do calibrador}$$

Onde $\Delta A/5 \text{ min teste} = A \text{ teste inicial} - A \text{ teste final}$ e $\Delta A/5 \text{ min calibrador} = A \text{ inicial do calibrador} - A \text{ final do calibrador}$.

4.5 – Análise Estatística

Os valores obtidos pela ECA sérica foram transformados devido à grande variabilidade para $\sqrt{x+1}$. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

A equação de Hardy-Weinberg foi usada para calcular e comparar as frequências alélicas e genotípicas dos grupos analisados.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) não está relacionado somente com doenças cardiovasculares, relaciona-se também com as fisiopatologias renais, bem como com a progressão das mesmas. Já foram identificados vários polimorfismos de genes que codificam os componentes do SRAA, entre estes se destaca o polimorfismo I/D do gene da enzima conversora da angiotensina (ECA). Diversos estudos sugerem a importância deste polimorfismo na progressão das doenças renais e provavelmente na mortalidade cardiovascular dos pacientes com insuficiência renal crônica (VEA, 2002).

Nos últimos anos, estudos evidenciaram que muitos genes e diversos fatores ambientais e demográficos poderiam ter um papel determinante no desenvolvimento e progressão de várias doenças renais que causam a insuficiência renal crônica (SCHELLING et al., 1999; FREEDMAN et al., 2000).

Nesta pesquisa, foi feita a genotipagem de 276 indivíduos, sendo 138 pacientes apresentando insuficiência renal crônica (IRC) e 138 indivíduos com função renal normal (grupo controle). Os produtos amplificados encontrados neste estudo apresentaram três conformações de acordo com o polimorfismo I/D do gene da ECA. O homocigoto normal I/I gerou um fragmento no gel de agarose de 490 pb; o heterocigoto gerou fragmentos de 490 e 203 pb; e o homocigoto sem inserção D/D gerou um fragmento de 203 pb (Figura 2).

As frequências genotípicas do grupo controle apresentaram pouca variação quando comparadas com o grupo de pacientes com IRC (Figura 3).

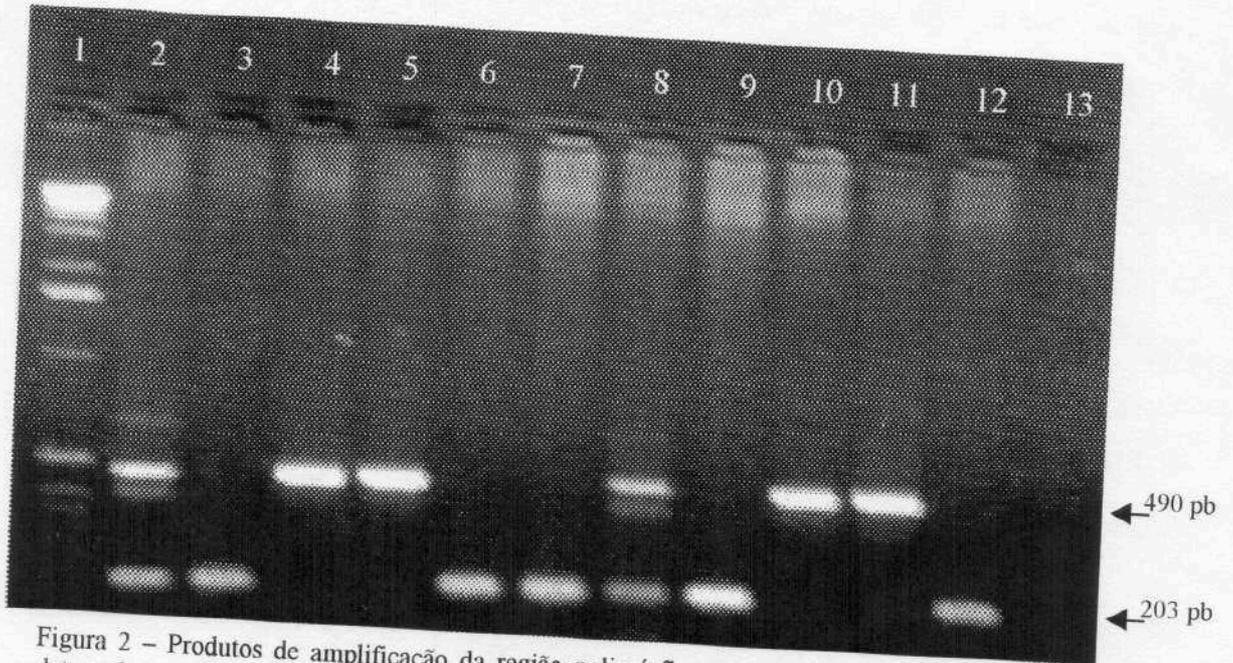


Figura 2 – Produtos de amplificação da região polimórfica no íntron 16 do gene da ECA detectados por eletroforese em gel de agarose 1,5%. As colunas consistem de: 1-Marcador de 1 KB; 2 e 8-Genótipo I/D; 3, 6, 7, 9 e 12-Genótipo DD; 4, 5, 10 e 11-Genótipo II; 13-Controle negativo da reação (água).

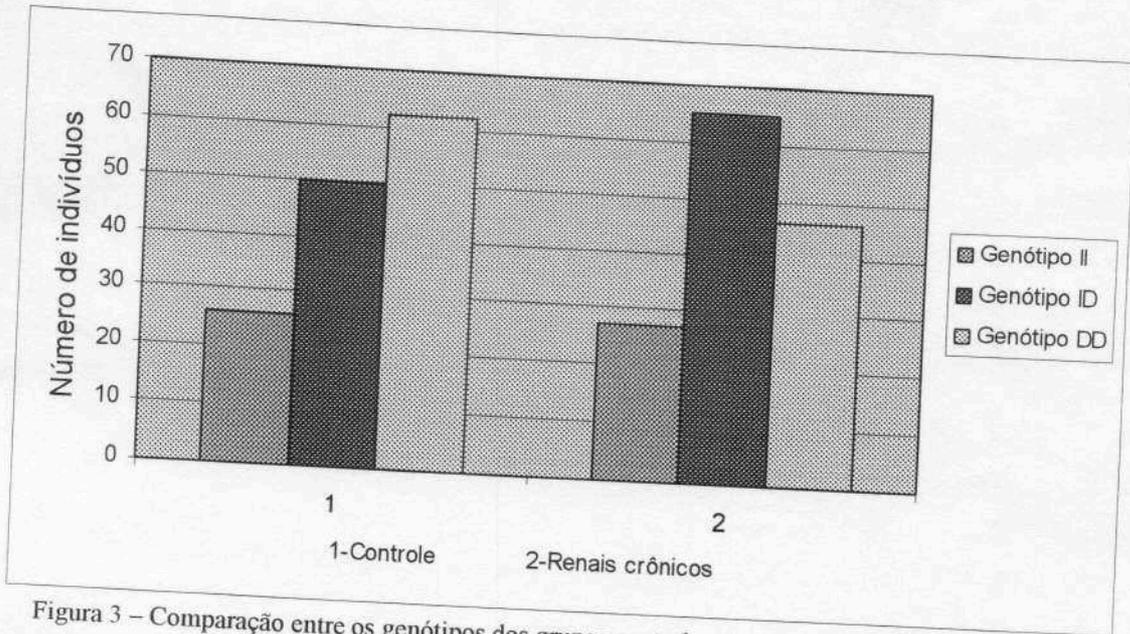


Figura 3 – Comparação entre os genótipos dos grupos controle e renais crônicos.

O mesmo foi observado com a frequência dos alelos I e D que não apresentou diferenças significativas para a população controle e para o grupo de pacientes com IRC (Figura 4).

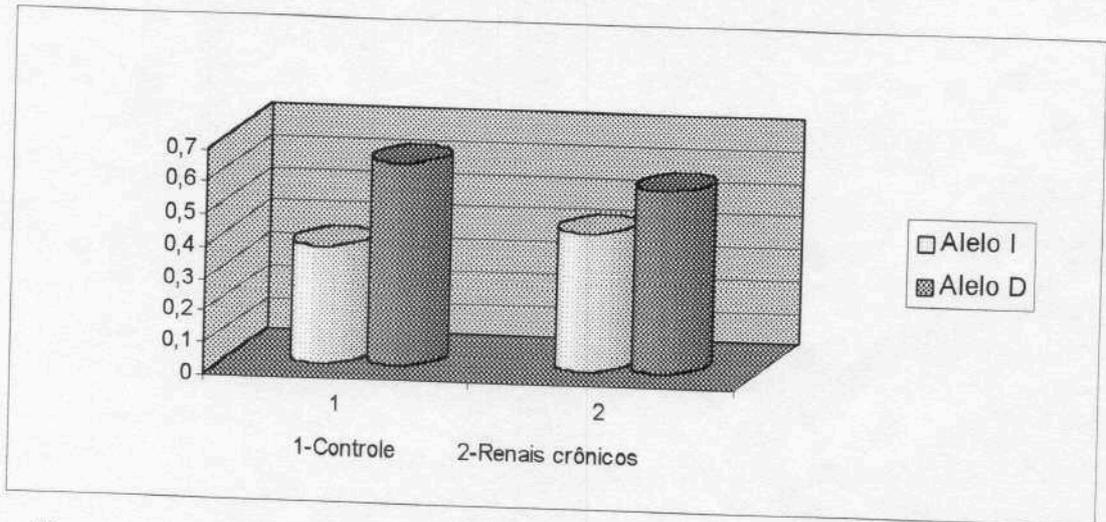


Figura 4 – Frequência alélica dos grupos controle e renais crônicos.

Vários estudos têm demonstrado que o alelo D do polimorfismo I/D do gene da ECA não está associado diretamente com a IRC, mas com a progressão das doenças renais, assim como da insuficiência renal crônica (HUNLEY et al., 1996; HARDEN et al., 1995; SCHMIDT et al., 1995).

São considerados normais os níveis séricos da enzima conversora da angiotensina (ECA) que apresentarem suas concentrações entre 35 e 90 U/l. Utilizando o teste de Tukey, foi feita a análise da média dos níveis séricos x genótipos de ambos os grupos estudados. O resultado deste teste apresentou uma correlação significativa do genótipo DD com o maior nível da ECA, no plasma dos pacientes com insuficiência renal crônica (Figuras 5 e 6).

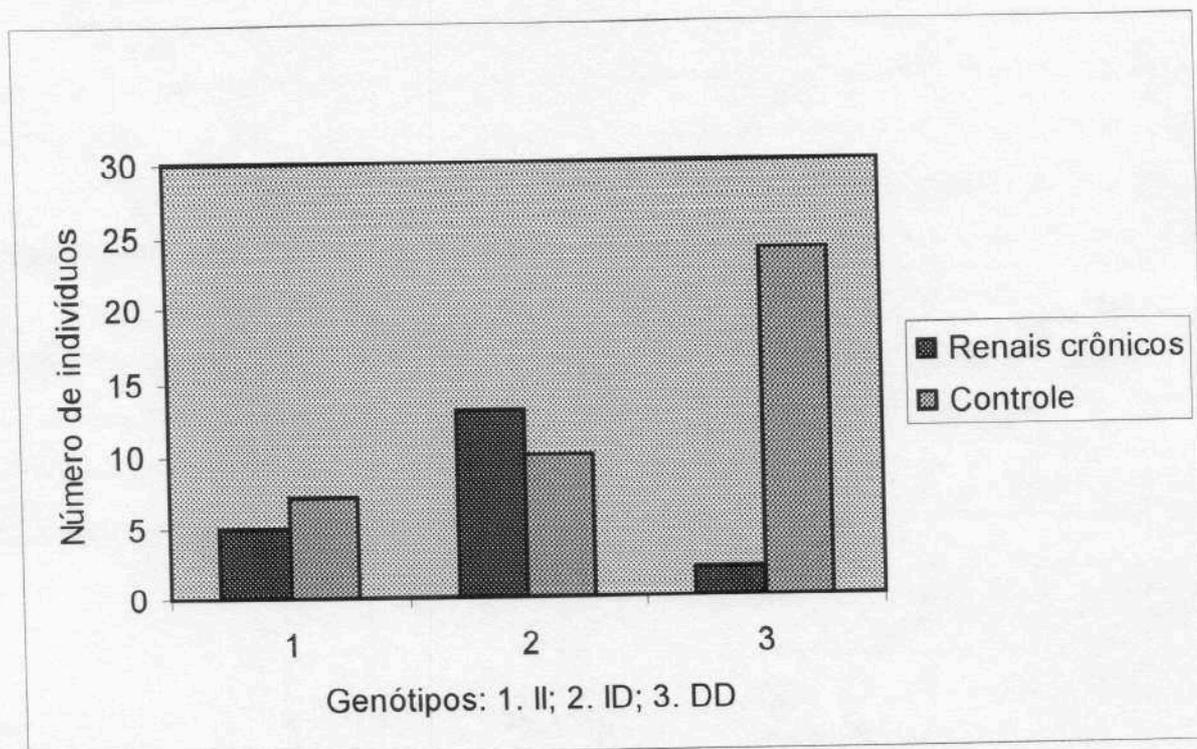


Figura 5 – Níveis de ECA menores que 90 U/L.

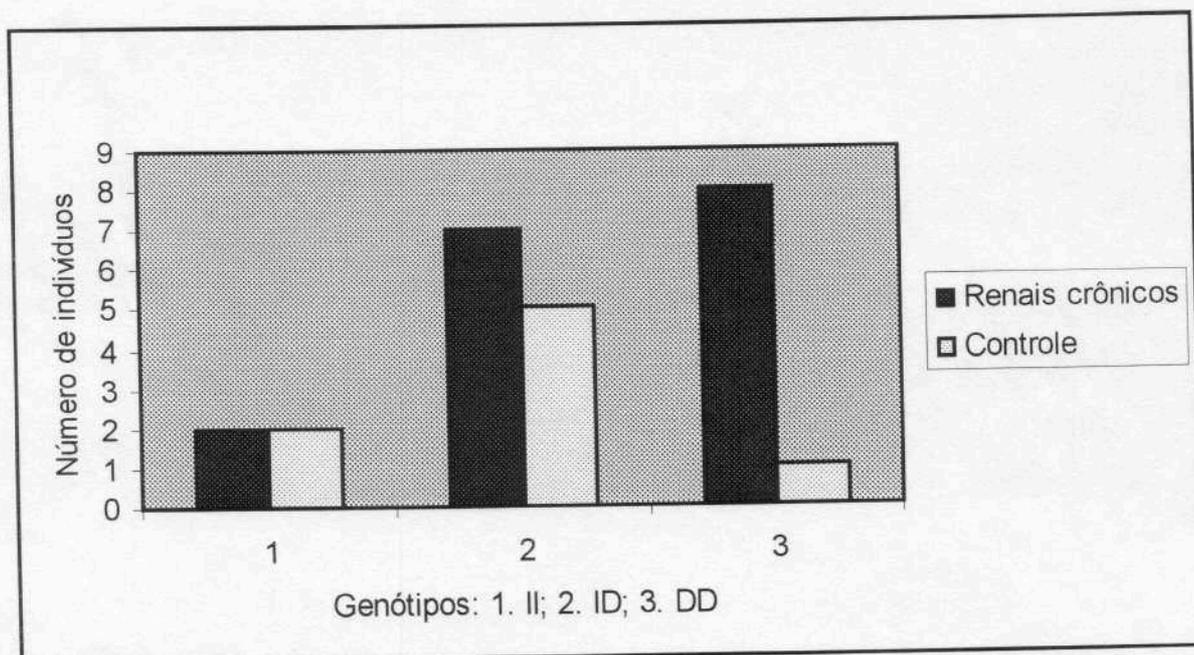


Figura 6 – Níveis de ECA maiores que 90 U/L.

Este dado está de acordo com RIGAT et al. (1990), onde o genótipo DD está associado com o aumento do nível da ECA circulante no plasma, o qual está geralmente duas vezes mais elevado do que nos outros genótipos. Esta relação entre o alelo D e a concentração enzimática da ECA também foi confirmada por outros pesquisadores (TIRET et al., 1992; RIBICHINI et al., 1998; MALIK et al., 1997; PHILIPP et al., 1998; COSTEROUSSE et al., 1993; MARRE et al., 1994; MIZUIRI et al., 1997; SASAKI et al., 1996; OHMACHI et al., 1997; DANSER et al., 1995). Contudo, devido ao polimorfismo I/D do gene da ECA ser intrônico, o mecanismo de expressão do gene da ECA com o genótipo DD não está bem claro. Há possibilidades de que essa relação entre o genótipo DD com maiores níveis da ECA no plasma seja resultado de uma forte ligação com outro locus envolvido na regulação da expressão gênica da enzima conversora da angiotensina (DAVIS et al., 1997). Neste trabalho não foi detectada correlação entre os níveis séricos da ECA e os genótipos II e ID, entretanto, existe diferença numérica nos dados obtidos (Tabela 2), talvez por outras alterações fisiológicas que levaram a um aumento significativo da ECA, independente do polimorfismo analisado.

Tabela 2 – Comparação de médias entre pacientes renais crônicos e controles entre os genótipos do gene da ECA.

Tratamentos	Genótipos			Total
	II	ID	DD	
Renal Crônico	129,78 a A*	84,67 a A	166,05 a A	124,57 a
Controle	77,49 a A	56,88 a A	51,53 b B	61,49 b
Total	101,98 a A	70,09 a A	100,73 a A	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não são significativamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Dois resultados foram importantes ao término desta pesquisa: O genótipo DD apresentou correlação significativa com os maiores níveis séricos de ECA nos pacientes com IRC e as elevadas concentrações de ECA total no plasma dos pacientes com IRC, de modo geral, diferiram significativamente daquelas observadas no grupo controle, que foram bem menores. Deste modo a ECA se apresenta como a enzima chave do sistema renina-angiotensina aldosterona (SRAA) e sistema cinina-caliceína. O efeito de um nível elevado na concentração da ECA no plasma poderia provocar aumento da pressão arterial, uma vez que a angiotensina II é vasoconstrictora. Isso causaria uma diminuição da taxa de filtração glomerular, o que talvez pudesse influenciar na progressão da doença renal nos pacientes com IRC.

6 – CONCLUSÕES:

As frequências alélicas e genóticas analisadas neste estudo não apresentaram diferenças significativas nos pacientes com insuficiência renal crônica e no grupo controle. Este dado evidencia que há outro marcador mais intimamente relacionado à doença renal, tornando necessário desenvolver outro marcador molecular que esteja mais fortemente ligado à insuficiência renal crônica. Este marcador poderá possibilitar averiguar, em termos de diagnóstico, o possível efeito dos polimorfismos do gene da enzima conversora da angiotensina, nos pacientes com IRC.

A correlação existente entre o genótipo DD do gene da ECA e seus maiores níveis encontrados no plasma dos pacientes com IRC, reforça a necessidade de se desenvolver outro marcador para relacioná-lo com os dados obtidos, pois o sistema renina angiotensina aldosterona é uma cascata enzimática que possui vários componentes atuando de diversas maneiras.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- AGERHOLM-LARSEN B., NORDESTGAARD BG., TYBJAERG-HANSEN A. Ace gene polymorphism in cardiovascular disease. Meta-analyses of small and large studies in white. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 484-492, 2000.
- BRENNER BM., LAZARUS JM. Insuficiência renal crônica. In: HARRISON TR. *Medicina Interna*, 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1446-1454, 1983.
- CAMBIEN F., COSTEROUSSE O., TIRET L., POIRIER O., LECERF L., GONZALES F., EVANS A., ARVEILER D., CAMBOU JP., LUC G., RAKOTAVAO R., DUCIMETIERE P., SOUBRIER F., ALHENC-GELAS F. Plasma level and gene polymorfism of angiotensin-converting enzyme in relation to myocardial infarction. *Circulation* 90: 669-676, 1994.
- CAMBIEN F., POIRIER O., LECERF L., EVANS A., CAMBOU JP, ARVEILER D., LUC G., BARD JM, BARA L., RICARD S, TIRET L, AMOUYEL P., ALHENC-GELAS F., SOUBRIER F. Deletion polymorphism in the gene for angiotenin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 359: 641-644, 1992.
- COHEN-HAGUENAUER O., SOUBRIER F., VAN CONG N., SERERO S., TURLEAU C., JEGOU C., GROSS MS., CORVOL P., FREZAL J. Regional mapping of the human renin gene to 1q32 by in situ hybridization. *Ann Genet* 32: 16-20, 1989.

- COSTEROUSSE O., ALLEGRINI J., LOPEZ M., ALHENC-GELAS F. Angiotensin I converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. **Biochem J** 290: 33-40, 1993.
- CRISAN D., CARR J. Angiotensin I-Converting Enzyme. Genotype and disease associations. **Journal of Molecular Diagnostics** 2: 105-115, 2000.
- DANSER AH., SCHALEKAMP MA., BAX WA., van den BRINK AM, SAXENA PR. Effect of the deletion/insertion polymorphism. **Circulation** 92: 1387-1388, 1995.
- DAVIS GK., ROBERTS DH. Molecular genetics of the renin-angiotensin system: implications for angiotensin II receptor blockade. **Pharmacol Ther** 75: 43-50, 1997.
- DORIA A., WARRAM JH., KROLEWSKI AS. Genetic predisposition to diabetic nephropathy. Evidence for a role of the Angiotensin I-Converting Enzyme Gene. **Diabetes** 43: 690-695, 1994.
- EVANS AE., POIRIER O., KEE F., LECERF L., McCRUM E., FALCONER T., CRANE J., O'ROURKE DF., CAMBIEN F. Polymorphisms of the angiotensin-converting-enzyme gene in subjects who die from coronary heart disease. **Q J Med** 87: 211-214, 1994.
- FREEDMAN BI., SATKO SG. Genes and renal disease. **Curr Opin Nephrol Hypertens** 9: 273-277, 2000.
- GRANNER DK. Hormônios do córtex adrenal. In: HARPER. **Bioquímica**, 6 ed. São Paulo: Atheneu, p. 519-532, 1990.
- GUMPRECHT J., ZYCHMA MJ., GRZESZCZAK W., ZUKOWSKA-SZCZUCHOWSKA E., TRAUTSOLT W., GOREZYNSKA S., SZYDLOWSKA I., GAWLIK B., RUTKOWSKI B., RUTKOWSKI P., KLINGER M., ZWOLINSKA D., SMOLENSKI O., BACZYNSKY R., DRABCZYK R., SZPRYNGER K. Angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion and angiotensinogen M235T polymorphisms: Risk of chronic renal failure. **Kidney International** 58: 513-519, 2000.

- GUYTON AC. Controle local do fluxo sanguíneo pelos tecidos e regulação hormonal. In: _____ **Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças**, 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 121-139, 1993.
- GUYTON AC., HALL JE. Os rins e os líquidos corporais. In: _____ **Tratado de Fisiologia Médica**, 9ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 378-385, 1997.
- HADMAN JA., MORT YJ., CATANZARO DF., TALLAM JT., BAXTER JD., MORRIS BJ., SHINE J. Primary structure of human renin gene. **DNA** 3: 457-468, 1984.
- HARDEN PN., GEDDES C., ROWE PA., McILROY JH., BOULTON-JONES M., RODGER RS., JUNOR BJ., BRIGGS JD., CONNELL JM., JARDINE AG. Polymorphisms in angiotensin-converting-enzyme gene and progression of IgA nephropathy. **Lancet** 345: 1540-1542, 1995.
- HUBERT C., HOUOT AM., CORVOL P., SOUBRIER F. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. **J Biol Chem** 266: 15377-15383, 1991.
- HUNLEY TE., JULIAN BA., PHILLIPS JA III, SUMMAR ML., YOSHIDA H., HORN RG., BROWN NJ., FOGO A., ICHIKAWA I., KON V. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism: Potential silencer motif and impact on progression in IgA nephropathy. **Kidney Int** 49: 571-577, 1996.
- INÁCIO J. **Marcadores moleculares associados ao infarto agudo do miocárdio**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, p. 16-22, 1998.
- JUNQUEIRA LC., CARNEIRO J. Aparelho Urinário. In: _____ **Histologia Básica**, 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 313-330, 1995.
- KERR DNS. Insuficiência Renal Crônica. In: BEENSON PB., McDERMOTT W. **Tratado de Medicina Interna**, 14 ed. Rio de Janeiro: Interamericana, p. 1386-1405, 1977.

- MALIK FS., LAVIE CJ., MEHRA MR., MILANI RV., RE RN. Renin-angiotensin system: genes to bedside. **Am Heart J** 134: 514-527, 1997.
- MALLAMACI F., ZUCCALÀ A., ZOCCALI A., TESTA R., GAGS B., SPOTO C., MARTORANO C., CURATOLA A., MISEFARI V., CUZZOLA F., ROMEO G., ZUCHELLI P. The deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme is associated with nephroangiosclerosis. **Am J Hypertens** 13: 433-437, 2000.
- MARRE M., BERNADET P., GALLOIS Y., SAVAGNER F., GUYENE T., HALLAB M., CAMBIEN F., PASSA P., ALHENC-GELAS F. Relationship between angiotensin I converting enzyme gene polymorphism, plasma levels, and diabetic retinal and renal complications. **Diabetes** 43: 384-388, 1994.
- MATIOLI SR., PASSOS-BUENO MRS. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. In: MATIOLI SR. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, p. 153-155, 2001.
- MATTEI MG., HUBERT C., ALHENC-GELAS F., ROECKEL N., CORVOL P., SOUBRIER F. Angiotensin I converting enzyme gene is on chromosome 17. **Cytogenet Cell Genet** 51: 1041-1045, 1989.
- MISSOURIS CG., BARLEY J., JEFFERY S., CARTER ND., SINGER DRJ., MCGREGOR GA. Genetic risk for renal stenosis: association with deletion polymorphism in angiotensin I-converting enzyme gene. **Kidney Int** 49: 534-537, 1996.
- MIZUIRI S., HEMMI H., INOUE A., TAKANO M., KADOMATSU S., TANIMOTO H., TANEGASHIMA M., HAYASHI I., FUSHIMI T., HASEGAWA A. Renal hemodynamic changes induced by captopril and angiotensin-converting enzyme gene polymorphism. **Nephron** 75: 310-314, 1997.
- MULLIS KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American** 260: 36-43, 1990.

- OHMICHI N., IWAI N., UCHIDA Y., SHICHIRI G., NAKAMURA Y., KINOSHITA M. Relationship between the response to the angiotensin converting enzyme inhibitor imidapril and the angiotensin converting enzyme genotype. *Am J Hypertens* 10: 951-955, 1997.
- PHILIPP CS., DILLEY A., SAIDI P., EVATT B., AUSTIN H., ZAWADSKY J., HARWOOD D., ELLINGSEN D., BARNHART E., PHILLIPS DJ, HOOPER WC. Deletion polymorphism in the angiotensin converting enzyme gene as a thrombophilic risk factor after hip arthroplasty. *Thromb Haemost* 80: 869-873, 1998.
- QUINN M., ANGELICO MC., CROSS A., GEARIN G., WARRAM JH. Concordance for kidney complications in siblings with IDDM. *Diabetes* 41 (Suppl.1): 121 A., 1992.
- RIBICHINI F., STEFFENINO G., DELLAVALLE A., MATULLO G., COLAJANNI E., CAMILLA T., VADO A., BENETTON G., USLENGHI E., PIAZZA A. Plasma activity and insertion/deletion polymorphism of angiotensin I-converting enzyme. A major risk factor and a marker of risk for coronary stent restenosis. *Circulation* 97: 147-154, 1998.
- RIGAT B., HUBERT C., ALHENC-GELAS F., CAMBIEN F., CORVOL P., SOUBRIER F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 86: 1343-1346, 1990.
- RIGAT B., HUBERT C., CORVOL P., SOUBRIER F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin I converting enzyme gene (DCPI). *Nucleic Acids Res* 20: 1433, 1992.
- SAMBROOK J., FRITSCH EF., MANITIS T. *Molecular cloning*. 2nd ed. Cold Spring New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, E.U.A., 1989.
- SASAKI M., OKI T., LUCHI A., TABATA T., YAMADA H., MANABE K., FUKUDA K., ABE M., ITO S. Relationship between angiotensin converting enzyme gene polymorphism and the effects of enalapril on left ventricular hypertrophy and impaired diastolic filling in essential hypertension: M-mode and pulsed Doppler echocardiographic studies. *J Hypertens* 14: 1403-1408, 1996.

- SCHELLING JR., ZARIF L., SEHGAL A., IYENGAR S., SEDOR JR. Genetic susceptibility to end-stage renal disease. **Curr Opin Nephrol Hyperten** 8: 465-472, 1999.
- SCHMIDT A., KIENER HP., BARNAS U., ARIAS I., ILLIEVICH A., AVINGER M., GRANINGER W., KAIDER A., MAYER G. Angiotensin-converting enzyme polymorphism in patients with terminal renal failure. **J Am Soc Nephrol** 7: 314-317, 1996.
- SCHMIDT S., STIER E., HARTUNG BAHNISCH J., WOODROFFE AJ., CLARKSON AR., PONTICELLI C., CAMPISE M., MAYER G., GANTEND., RITZ E. No association of converting enzyme insertion/deletion polymorphism with immunoglobulin A glomerulonephritis. **Am J Kidney Dis** 26: 727-731, 1995.
- SEAQUIST ER., GOETZ FC., RICH S., BARBOSA J. Familial clustering of diabetic kidney disease: evidence for genetic susceptibility to diabetic nephropathy. **N Engl J Med** 320: 1161-1165, 1989.
- SHANMUGAN V., SELL KW, SAHA BK. Mistyping ACE heterozygotes. **PCR Methods Appl** 3: 120-121, 1993.
- SILVA ER. **Marcadores moleculares associados à pré-eclâmpsia**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, p. 8-31, 2001.
- SINGER D., MISSOURIS C., JEFFERY S. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism. What to do about all the confusion. **Circulation** 94: 360-369, 1996.
- TARNOW L., CAMBIEN F., ROSSING P., NIELSEN FS., HANSEN BV., LECERF L., POIRIER O., DANILOV S., PARVING H-H. Lack of relationship between an insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene and diabetic nephropathy and proliferative retinopathy in IDDM patients. **Diabetes** 44: 489-494, 1995.
- TIRET L., RIGAT B., VISVIKIS S. Evidence from combined segregation and linkage analysis that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. **Am J Hum Genet** 51: 197-205, 1992.

- VEA AM. Polimorfismos del sistema renina-angiotensina e insuficiencia renal. **Nefrología** 22: 89-94, 2002.
- VLEMING LJ., van der PIJL JW., LEMKES HHPJ., WESTENDORP RGJ., MAASSEN JA., DAHOR MR., van Es LA., van KOOTEN C. The DD genotype of the ACE gene polymorphism is associated with progression of diabetic nephropathy to end stage renal failure in IDDM. **Clin Nephrol** 51: 133-140, 1999.
- WALKER MR., RAPLEY R. A reação em cadeia da polimerase. In: _____. **Guia de Rotas na Tecnologia do Gene**. São Paulo: Atheneu, p. 144-151, 1999.
- WANG JG., STAESSEN JA. Genetic polymorphisms in the renin-angiotensin system: relevance for susceptibility to cardiovascular disease. **European Journal of Pharmacology** 410: 289-302, 2000.
- WALTER JB., ISRAEL MS. Renal Failure. In: _____. **General Pathology**, 5ed. London: Churchill Livingstone, p. 549-560, 1979.
- YATES FE., MARSH DJ., MARAN JW. O córtex adrenal. In: MOUNTCLASTLE VB. **Fisiologia Médica** 2, 13 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1707-1752, 1982.
- YOSHIDA H., KURIYAMA S., ATSUMI Y., TOMONARI H., MITARAI T., HAMAGUCHI A., KUBO H., KAWAGUCHI Y., KON V., MATSUOKA K., ICHIKAWA I., SAKAI O. Angiotensin I converting enzyme gene polymorphism in non-insulin dependent diabetes mellitus. **Kidney International** 50: 657-664, 1996.