

JUAREZ INÁCIO

**MARCADORES MOLECULARES
ASSOCIADOS AO
INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO**

Uberlândia - M.G.
Dezembro - 1998

MON
54.21
I ZEM.
TES/MEU

Universidade Federal de Uberlândia
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

NUM. 17.11.15

**MARCADORES MOLECULARES
ASSOCIADOS AO
INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO**

-L 50711-10
-L 50711-10

Juarez Inácio
Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho

DIRBI/UFU



1000187159

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica, área de concentração Genética

Uberlândia - M.G.
Dezembro - 1998

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA
Campus Umuarama, Bloco 2E, Sala 24
38400-902. UBERLÂNDIA - M.G.

**DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

1. **TÍTULO DA TESE:** Marcadores Moleculares Associados ao Infarto Agudo do Miocárdio

2. **ALUNO:** Juarez Inácio

3. **PROFESSOR ORIENTADOR:** Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

4. **DATA:** 04-01-1999

5. **BANCA EXAMINADORA:**
Titular: Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho
Titular: Dr. Renato Enrique Sologuren Achá
Titular: Dr^a Ana Maria Bonetti

AOS MEUS PAIS, JOÃO JOSÉ INÁCIO E ENEDINA MARIA INÁCIO, QUE SÃO
A LUZ DOS MEUS PASSOS E AOS MEUS IRMÃOS POR SEREM EXEMPLOS DE
VIDA E PELO CONSTANTE INCENTIVO E COMPREENSÃO.

CANTO LIBRE
INTERIORE LA FOIRE

À MINHA ESPOSA CLEIR, POR COMPREENDER QUE MEU TRABALHO ME TORNA
MAIS DIGNO, MAIS FELIZ E CAPAZ DE FAZER OUTRAS PESSOAS FELIZES,
TAMBÉM POR CARREGAR EM SEU VENTRE NOSSA FILHA, MARIA CECÍLIA
INÁCIO, QUE REFORÇA AINDA MAIS MINHA VONTADE DE VENCER TODOS OS
OBSTÁCULOS.

Ivo

DEDICO ESSE TRABALHO A TODOS OS PACIENTES QUE DOARAM AMOSTRAS
E, ACIMA DE TUDO, ACREDITARAM NA FORÇA DE VONTADE DE MUDAR O
MUNDO PARA MELHOR.

Idem

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por ter sido meu ponto de equilíbrio nas horas difíceis.
- A minha querida esposa, por me proporcionar uma vida mais feliz.
- Ao Professor Doutor Luiz Ricardo, pelo incentivo e por sempre estar pronto a intervir nos momentos de indecisões, demonstrando grande amizade.
- Aos meus amigos Kleber e Gismar, por estarem sempre ao meu lado, apoiando-me e acreditando em meu trabalho.
- A todos os colegas do curso de pós-graduação, pelo companheirismo e amizade.
- Ao Warlei, por ter contribuído na execução da etapa final de minha pesquisa.
- À Professora Doutora Ana Bonetti, pela participação especial em minha formação acadêmica, influenciando-me positivamente nas atividades profissionais.
- Ao Professor Doutor Kerr, pela sua amizade e compreensão.
- Aos meus queridos pais, por terem, com exemplos, me mostrado o caminho do dever.

SUMÁRIO

ABREVIACÕES.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE TABELAS.....	XIV
RESUMO.....	XVI
SUMMARY.....	XIX
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	3
REVISÃO DE LITERATURA.....	4
<i>ETIOLOGIA DA ATEROSCLEROSE CORONÁRIA.....</i>	4
<i>FATORES DE RISCO.....</i>	5
<i>TABAGISMO.....</i>	6
<i>HIPERTENSÃO.....</i>	7
<i>ÁLCOOL:.....</i>	8
<i>DISFUNÇÃO ENDOTELIAL NA DOENÇA ARTÉRIO CORONÁRIA.....</i>	8
<i>INFECÇÃO CRÔNICA NA ETIOLOGIA DA ATEROSCLEROSE.....</i>	10
<i>DIAGNÓSTICO ENZIMÁTICO DO INFARTO NO MIOCÁRDIO.....</i>	10
<i>FATORES GENÉTICOS.....</i>	11
<i>REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....</i>	16
<i>ASPECTOS GENÉTICOS DA ENZIMA CONVERSORA DA ANGIOTENSINA.....</i>	17
<i>MECANISMO PARA A ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DA ECA D/D E DOENÇAS.....</i>	20
<i>GENE(AGT1R)RECEPTOR TIPO I DA ANGIOTENSINA II.....</i>	21
<i>PCR-LIS-SSCP (LOW IONIC STRENGTH SINGLE-STRANDED CONFORMATION POLYMORPHISM.....</i>	21
MATERIAL E MÉTODOS.....	23

<i>DETERMINAÇÃO DO GENÓTIPO DA ENZIMA CONVERSORA DA ANGIOTENSINA:</i>	25
<i>EXTRAÇÃO DO DNA, AMPLIFICAÇÃO E DETECÇÃO DO GENE DA ECA:</i>	25
<i>EXTRAÇÃO DO DNA, AMPLIFICAÇÃO E DETECÇÃO DO GENE DO RECEPTOR 1 DA ANGIOTENSINA</i>	
<i>II:</i>	28
<i>RESTRIÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO DO FRAGMENTO DO GENE DO RECEPTOR DA</i>	
<i>ANGIOTENSINA II.</i>	28
<i>PCR-LIS-SSCP</i>	28
<i>GENOTIPAGEM DAS REGIÕES BRASILEIRAS</i>	28
<i>ANÁLISE ESTATÍSTICA:</i>	28
RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
<i>DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA GENOTÍPICA BRASILEIRA DO POLIMORFISMO DA ECA I/D</i>	28
<i>RESULTADO DA INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES NO INTRON 16 DO GENE POLIMÓRFICO DA ECA I/D</i>	
.....	28
CONCLUSÕES	28
BIBLIOGRAFIA	28

ABREVIACÕES

(CK) -MB	Creatinina Quinase Mioglobina.
µg	Micrograma.
µl	Microlitro.
AI	Angiotensina I.
AII	Angiotensina II.
ApoA	Apolipoproteínas A.
ApoB	Apolipoproteínas B.
AT1	Receptor 1 da Angiotensina II.
AT2	Receptor 2 da Angiotensina II.
cAMP	Adenosina Monofosfato Cíclica
cDNA	DNA complementar.
CMV	Citomegalovirus.
DAC	Doença Artério Coronária.
DCV	Doenças Cardiovasculares.
DHL	Desidrogenase Láctica
DMAA	Dimetilarginina Assimétrica.
DNA	Ácido Desoxiribonucleico.
DNase	Desoxiribonuclease.
dNTP	Desoxiribonucleotídeo Trifosfato.
DTT	Ditiotreitol.
ECA	Enzima Conversora da Angiotensina.
ECG	Eletrocardiograma.
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetraacético Sódico.
ET1	Endotelina 1.
cGMP	Guanosina Monofosfato Cíclica.
HAE	Hipertensão Arterial Essencial.
HDL	Colesterol de Alta Densidade.
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IM	Infarto do Miocárdio.
IMCCLAS	Classe do índice de massa corpórea.
NTI	Número Total de Indivíduos.

KCl	Cloreto de Potássio.
LDL	Colesterol de Baixa Densidade.
LIS-SSCP	Polimorfismo da conformação de fita simples do DNA em solução de baixa força iônica.
L-NAME	L-nitroarginina metil-éster.
L-NMMA	Monometil arginina.
mg/dl	miligramas por decilitro.
MgCl₂	Cloreto de Magnésio.
Min	Minutos.
mM	Milimolar.
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro.
ON	Óxido Nítrico.
Pmoles	Picomoles.
RFLP	Polimorfismo de Fragmentos de Restrição por Tamanho.
SRA	Sistema Renina-Angiotensina.
SRAA	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona.
s	Segundos.
ssDNA	DNA fita simples.
Ta	Temperatura de Anelamento.
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
PCR	Reação em cadeia da Polimerase.
TIMI	Trombose no Infarto do Miocárdio.
Trop T	Troponina T.
U	Unidade.
VAS ACOM	Vasos Acometidos.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.A:** **Página 13**
Corte macroscópico da estrutura renal.
(Ross et al., - 1993 - Modificada).
- Figura 1.B:** **Página 13**
Corte histológico que compreende o Córtex e a porção da medula. (Ross et al., - 1993 - Modificada).
- Figura 2:** **Página 14**
Desenho esquemático de um glomero renal e estruturas associadas. (Modificado de: Kriz W, Sakai T: In: Morphological aspects of glomerular function. Proceedings of the Tenth International Congress of Nephrology, Londres, 1987).
- Figura 3:** **Página 15**
Modelo do Sistema Renina-Angiotensina (SRA).
- Figura 4:** **Página 28**
Produtos de amplificação da região polimórfica do intron 16 do gene da ECA.
- Figura 5:** **Página 31**
Sítios de restrição da enzima DdeI no gene receptor da Angiotensina II.

- Figura 6:** **Página 36**
Padrão de DNA utilizado nas reações de amplificação para os genes ECA e AT1.
- Figura 7:** **Página 36**
Produtos amplificados do gene receptor da Angiotensina II (AT1).
- Figura 8:** **Página 37**
Produtos de amplificação do receptor AT1 da Angiotensina II.
- Figura 9:** **Página 51**
Distribuição das frequências genotípicas da cinco regiões do Brasil.
- Figura 10:** **Página 54**
Perfil dos DNAs fita simples do intron 16 do Gene da ECA pela PCR-LIS-SSCP.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** **Página 33**
Regiões brasileiras que contribuíram com as amostras
- Tabela 2:** **Página 33**
Número de indivíduos que foram genotipados em cada região
- Tabela 3:** **Página 41**
Análise de Variância dentro de genótipo do receptor AT1
- Tabela 4:** **Página 42**
Análise de Variância do Estado Arterial, Colesterol e Triglicérides
- Tabela 5:** **Página 42**
Comparação de Médias pelo Teste de Duncan
- Tabela 6:** **Página 44**
Correlação de Pearson entre os genótipos polimórficos ECA e AT1 com a Hipertensão, os antecedentes familiares, o colesterol, o número de vasos acometidos, o fluxo coronariano e tipo de lesão.

Tabela 7:

Correlações Canônicas entre Grupos de Variáveis

Página 46

Tabela 8:

Distribuição dos genótipos do Polimorfismo da ECA I/D, em cada região do Brasil.

Página 49

Tabela 9:

Freqüências Alélicas do Polimorfismo da ECA I/D das regiões brasileiras.

Página 49

Dr. J. Inácio: Laboratório de Genética

Av. Brasil, 1.340 - São Paulo, SP - 05001-900

RESUMO

INÁCIO, Juarez. Marcadores moleculares associados ao Infarto Agudo do Miocárdio.

As doenças cardiovasculares, nos últimos anos, passaram a ser a primeira causa de morte no país. E o sucesso obtido no tratamento de pacientes infartados, através do uso de inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA), intensificou os estudos que objetivam a determinação de associações entre o gene da ECA e o Infarto Agudo do Miocárdio (IAM). Como o sistema renina angiotensina (SRA) é uma importante via metabólica na regulação da ECA, passou-se a estudar suas ramificações mais vulneráveis que podem causar polimorfismos na população. Um exemplo são os receptores AT1 e AT2 que, por serem intermediários das ações vasoconstrictoras do SRA, tornam-se candidatos aos estudos que tentam comprovar a associação dos mesmos com o IAM e com a hipertensão. Vários autores sugerem o envolvimento do receptor AT1 com o IAM e com a hipertensão. Devido a essas ocorrências, no presente estudo, foi investigado se o gene do receptor AT1 se associa com o polimorfismo da ECA, na determinação do aumento do grau de extensão do IAM. Foram também determinadas as frequências

genotípicas e alélicas do gene da ECA, na população proveniente de várias regiões brasileiras. Com o intuito de aumentar a quantidade de marcadores que pudessem explicar a ocorrência do IAM, foi realizado o estudo de mutações através da técnica PCR-LIS-SSCP no intron 16 do gene da ECA. A análise das correlações estatísticas entre os genes da ECA e do AT1 revelou uma alta correlação entre os mesmos, confirmando assim a associação das possíveis mutações desses genes com a possibilidade de um maior dano nas coronárias. A correlação canônica foi altamente significativa ($0,73 P < 0,01$), quando agrupados os dois genótipos e comparados com o grau de acometimento das artérias danificadas, confirmadas pelo cateterismo. Isso demonstrou que os indivíduos não portadores da mutação do receptor da AII, têm uma espécie de proteção, ao sofrerem o infarto do miocárdio. Ao analisar os genótipos separadamente, o resultado não foi o mesmo. A significância diminuiu para $0,58 (p < 0,05)$, indicando que no indivíduo que acumula as duas mutações (ECA e AT1), as chances da ocorrência de um infarto agudo do miocárdio com maior grau de acometimento das artérias, são maiores. Ao comparar as amostras das regiões brasileiras e o grupo de infartados, as frequências alélicas e genotípicas da ECA não apresentaram diferenças. A frequência do alelo I foi de aproximadamente 0,4 e o alelo D de 0,6, demonstrando que, na população brasileira, existe um número excessivo de alelos D em relação ao alelo I. A aplicação da técnica da PCR-LIS-SSCP em 80 indivíduos, agrupados aleatoriamente, não demonstrou mutações. O perfil eletroforético indicou a inexistência de variações, confirmando que a região amplificada entre os "primers", para detecção do polimorfismo da ECA, possui somente a inserção de 287 nucleotídeos da seqüência repetitiva **ALU**. Esses resultados, que demonstram a relação dos genes ECA e AT1 com número de vasos acometidos, fluxo coronário e tipo de lesão, poderão ser aplicados na identificação das pessoas passivas de infarto e proporcionar uma melhoria nos procedimentos médicos.

Para isso é necessário fomentar estudos cada vez mais aprofundados, no sentido de aumentar a precisão dos diagnósticos relacionados à predisposição genética ao infarto. A mutação do receptor AII e o polimorfismo da ECA, de acordo com os resultados, já podem estabelecer uma atuação precoce para prevenir as doenças cardiovasculares, evitando assim os últimos estágios da doença que poderão levar o paciente ao óbito.

SUMMARY

INÁCIO, Juarez. Molecular Marker Associated of Acute Myocardium Infartion.

In recent years, cardiovascular diseases have become the most important cause of death in Brazil. The success in treatments of infarcted patients through inhibitors of the Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) stimulated studies toward the investigation of existing polymorphisms on the ACE gene and its association to myocardium infarction (MI). However, the renin-angiotensin system (RAS) is an important regulatory pathway of the ACE. Therefore, other important genes involved in this system may also present polymorphisms that could affect MI occurrence. An example could be the AT1 and AT2 receptors, which intermediate vasoconstriction actions of the RAS, becoming candidate genes associated to MI and hypertension. This research aimed to investigate the possible association of the ACE and the AT1 receptor gene polymorphism with the acute myocardium infarction (AMI). Genotypic and allelic frequencies of the brazilian population were also determined for the ACE gene. The investigation of possible mutation in the intron 16 of the ACE gene was also done through the PCR-LIS-SSCP (low

ionic strength-single stranded conformational polymorphism) technique. Correlation between ACE and AT1 receptor was highly significant. However, the high and significant canonical correlation (0.73; $p < 0,01$) between non-favorable alleles for both genes (D and C) and a more intense acute myocardium infarction demonstrated that there is a synergistic effect of both polymorphisms. When non-favorable alleles were considered individually, they had a correlation coefficient of 0.58 ($p < 0,05$). This result suggests that patients with both mutations have a 50% higher chance of an AMI. Comparison of the allelic and genotypic frequencies of the ACE gene polymorphism between a group of infarcted patients and the brazilian population did not reveal differences, with a frequency of 0.61 for the D allele. The higher frequency of the non-favorable allele and the similar genotypic frequencies for infarcted patients and the brazilian population, may suggest that this risk factor associated to other factors may predispose the majority of the regulation to a more intense AMI. Mutational analysis through LIS-SSCP in the intron 16 of the ACE gene in 80 individuals did not detect any different conformation. The association among ACE, AT1 receptor and AMI can be used as a powerful diagnostic tool for AMI prevention. Other markers must be investigated to increase the power of the test in order to prevent or even to change life habits, consequently avoiding death or extending life span.

INTRODUÇÃO

O Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) é considerado ainda fatal. Mas, com o desenvolvimento da Ciência, comprovou-se que o IAM é provocado pela trombose coronária. Com essa descoberta, tornou-se possível uma intervenção mais eficaz evitando, em muitos casos, a morte do paciente. Com o advento da industrialização, as condições ambientais do homem sofreram fortes mudanças, o que alterou principalmente seus hábitos no ambiente de trabalho e na própria alimentação. Associou-se a essas mudanças a grande incidência de IAM, que atingiu cifras alarmantes. Como consequência, na metade do século XX, foi reconhecido como a causa mais comum de morte hospitalar no mundo industrializado.

De acordo com dados do Ministério da Saúde, em meados da década de 60, as doenças do aparelho circulatório já tinham substituído as doenças infecciosas e parasitárias no Brasil. Nos meses de maio e junho de 1993, aproximadamente 250.000 brasileiros foram internados nos hospitais da rede pública com algum tipo de DAC; destes, 16.750 vieram a falecer (Ungar & Pinho 1996). O Informe Epidemiológico do SUS, ano II (1993) relatou que, desde 1983, o infarto agudo do miocárdio (IAM) tem sido a terceira principal causa de mortes no Brasil.

Entretanto, o problema central do IAM não foi resolvido até o presente momento, pois alterações importantes do ventrículo esquerdo, devido à presença da necrose, ainda causam muitos óbitos. Existem esforços no sentido de melhorar a demanda de oxigenação no miocárdio, contudo são apenas medidas paliativas.

A aplicação das novas técnicas da Biologia Molecular, que surgiram a partir da década de 80, tem demonstrado um novo caminho na solução da doença artério coronária, no sentido de prevenir com diagnósticos rápidos, precisos e com a possibilidade de inibir os fatores de risco desta doença. O uso destas técnicas poderá proporcionar à Medicina, possibilidades de intervenção até mesmo antes do paciente apresentar qualquer sintoma coronariano.

Bonnardeaux *et al.*, (1994) relataram a existência de um receptor (AT1) da AII, associando-o com a Hipertensão e Tired *et al.*, (1994) também associaram este mesmo marcador com IAM.

Depois de 1992, ano em que Cambien publicou seu artigo sobre o polimorfismo do gene da ECA, houve um aumento nas pesquisas, relacionando este gene com o IAM. Vários estudos comprovaram as afirmações contidas na publicação de Cambien (Tired, 1993; Evans, 1994; Ruiz, 1994; Ludwig, 1995; Mattu, 1995; Beohar, 1995). Mas outros pesquisadores contestaram suas afirmações (Kreutz, 1993; Bohn, 1993; Lindpaintner, 1995; Katsuya, 1995).

OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo determinar a frequência alélica e genotípica do gene da ECA de 210 indivíduos representantes de todas as regiões brasileiras, cujas amostras foram obtidas no Hemocentro da Universidade Federal de Uberlândia; determinar correlações da associação do polimorfismo ECA I/D e receptor AT1 da AII com o número de vasos acometidos, fluxo coronário, tipo de lesão e outros fatores de risco convencionais (lipídeos, IMC e outros) em 22 pacientes infartados; investigar se existem mutações situadas entre a região amplificada do intron 16 do gene da ECA I/D, utilizando a técnica LIS-SSCP (polimorfismo da conformação de fita simples por meio de soluções de baixa força iônica).

REVISÃO DE LITERATURA

ETIOLOGIA DA ATEROSCLEROSE CORONÁRIA

Arteriosclerose foi a denominação utilizada pelo patologista francês Jean Lobstein, em 1829, para definir de forma genérica o espessamento e a redução da elasticidade da parede arterial. A partir do melhor conhecimento de sua etiopatogenia e das características anatomopatológicas foram diferenciadas as seguintes enfermidades: mediasclerose de monckeberg, arteriosclerose, aterosclerose, esclerose senil dos grandes vasos e microangiopatia diabética (Porto, 1988).

A aterosclerose é um tipo de arteriosclerose de etiologia multifatorial, decorrente de um processo inflamatório crônico da parede arterial, com depósitos de substâncias gordurosas, colesterol, restos celulares, plaquetas, fibrina e cálcio, que levam à formação de placas enrijecidas e redução da elasticidade e da luz do vaso. Pode ser observada desde a infância, mas o início das manifestações clínicas ocorrem geralmente na idade adulta (Porto, 1988).

FATORES DE RISCO

Consideram-se dois tipos de fatores de risco: os modificáveis e os não modificáveis. O grupo dos modificáveis são os fatores tradicionais e os não modificáveis são considerados os fatores genéticos, os quais não podem, até o momento, ser modificados pelo homem.

Estudos vêm fornecendo evidências convincentes da correlação entre o colesterol e o desenvolvimento de cardiopatia coronária aterosclerótica. Um alto nível de colesterol plasmático poderá associar-se com outros fatores de risco e esta associação aumenta a incidência de cardiopatias. Quando populações Japonesas com baixos níveis de colesterol plasmático se mudam para o Hawái e depois para o Continente Americano, esta mudança progressiva da dieta rica em lipídios se associa a um aumento gradativo das doenças no coração (Keys *et al.*, 1957).

O risco determinado por altas concentrações de colesterol está relacionado com o alto nível de colesterol LDL. Com o colesterol HDL ocorre o inverso, ou seja, quanto menor a concentração de HDL na corrente sanguínea maior será o risco de infarto. Os estudos têm demonstrado que a subfração de HDL₂ pode ser mais eficaz do que o HDL total e a análise quantitativa da apolipoproteína A (ApoA) e da apolipoproteína B (ApoB) fornece uma previsão mais precisa do risco coronário (Brunzell *et al.*, 1981).

As organizações Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S), o West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSOCOPS) e a Cholesterol and Recurrent Events (CARE), juntas envolveram mais de 15.000 pessoas, em aproximadamente cinco anos, nos estudos da lipoproteína de baixa densidade (LDL). Seus estudos demonstraram que a diminuição do colesterol LDL reduziu de 26 a 35% a morbidade e mortalidade.

A associação entre o elevado nível de colesterol e aterosclerose explica a necessidade da monitoração em pacientes com risco de doença vascular aterosclerótica. O objetivo desta monitoração deverá ser no sentido de baixar o LDL a níveis menores que 100 mg/dl. Nieto et al., (1995) relataram que grande porcentagem de pacientes com DAC não receberam monitoração no sentido de baixar o nível de colesterol LDL e quando eram monitorados, este tratamento, frequentemente, era inadequado. Em um estudo de 15.739 homens e mulheres com idade entre 45 e 64 anos, somente 42% sabiam da sua hipercolesterolemia e 84% sabiam de sua alta pressão sanguínea. O controle da pressão foi administrado adequadamente em 50% dos pacientes e apenas 4% receberam controle adequado do nível elevado de lipídios.

TABAGISMO

O cigarro tem sido reconhecido como o maior fator de risco para o desenvolvimento da doença aterosclerótica coronária (DAC) (Kannel et al., 1981). O mecanismo de ação para o efeito cardiovascular é a disfunção endotelial (Celermajer et al., 1996). Uma recente pesquisa demonstrou que um potente inibidor da ECA, o quinapril, diminuiu significativamente o efeito da disfunção endotelial em pacientes com DAC, mas não teve efeito em portadores de: disfunção do ventrículo esquerdo, severa hipercolesterolemia e diabete (Mancini et al., 1996).

O risco de coronariopatias é dose-dependente, ou seja, o perigo aumenta com o número progressivo de cigarros fumados, sendo este parâmetro mais importante que a própria duração do vício (Kannel, 1981).

A presença de filtro nos cigarros não afasta o risco, e existe a possibilidade dos níveis de carboxihemoglobina poderem ser mais elevados nos que o usam, em relação aos encontrados em fumantes de cigarros comuns (Wald et al., 1977).

O vício do fumo e o consumo moderado de álcool podem afetar o diâmetro das artérias coronárias. Assim, os não fumantes apresentam maior diâmetro do tronco da coronária esquerda e da descendente anterior do que fumantes ou ex-fumantes. Com isso pode-se defender a hipótese de que o cigarro tem um efeito direto e demorado sobre o calibre arterial, com eventuais implicações sobre o desenvolvimento de coronariopatias (Fried et al., 1986).

HIPERTENSÃO

Existe uma predisposição racial para a hipertensão, a sociedade brasileira de cardiologia em 1974, com amostras não probabilísticas, indicaram que voluntários adultos, dos dois sexos, examinados em logradouros públicos da cidade do Rio de Janeiro, apresentaram cifras tensionais diastólicas iguais ou superiores a 100 mm Hg em 21,8% dos brancos e 31,3% dos negros (Curb & Reed, 1985).

Uma pesquisa envolvendo critérios estatísticos corretos utilizando como característica a cor da pele, verificou que a prevalência da hipertensão em adultos era maior nos pretos do que nos pardos, e maior nestes do que nos brancos (Batlouni, 1983).

Explicações para tal diversidade são proporcionadas por vários pesquisadores, mas os achados não são sempre concordantes. Kaplan, há mais de um decênio, identificou nos negros baixa atividade da renina plasmática (Cassel et al., 1971).

ÁLCOOL:

A disfunção sistólica e a dilatação do ventrículo esquerdo atingem cerca de 14-16% dos pacientes com cardiopatia hipertrófica (Seiler et al., 1995 ; Hina et al., 1993).

O excesso de ingestão de bebidas alcoólicas pode deprimir a função cardíaca (Urbano et al., 1989). Um consumo de 80 g/dia de álcool pode causar perturbação no metabolismo das proteínas pela toxicidade do acetaldeído e pela geração de radicais livres (Preedy & Richardson, 1996). A abstinência de álcool pode inibir sintomas cardíacos e reverter a depressão das funções cardíacas (Demakis et al., 1974 ; Juillièrre et al., 1990).

DISFUNÇÃO ENDOTELIAL NA DOENÇA ARTÉRIO CORONARIA

A partir da publicação de Furchgott & Zawadzki, (1980) o endotélio tem sido reconhecido como um dos maiores reguladores da hemostase vascular. A integridade do endotélio é importante porque o mesmo tem a função de manter o fluxo sanguíneo, as ações anti-trombolíticas, a inibição e a ativação das plaquetas. Assim o endotélio contribui para o controle da pressão sanguínea e sua disfunção está relacionada com a aterosclerose e com a hipertensão, levando à hipoperfusão e à oclusão vascular.

Existe um fator que causa relaxamento na camada muscular dos vasos derivados do endotélio. É uma substância que dura poucos segundos (Furchgott & Zawadzki, 1980). Esta substância tem sido indentificada como um radical livre, o óxido nítrico (ON). O ON é formado a partir da L-arginina por oxidação de seu nitrogênio aminoterminal (Palmer et al., 1994), podendo existir várias isoformas desta substância nas células endoteliais, nas plaquetas, nos macrófagos, nas fibras musculares, nos nervos e no cérebro (Nathan & Xie, 1994). A atividade da sintetase do ON pode ser inibida pela dimetilarginina assimétrica (DMAA), a

qual acumula-se em pessoas portadoras de doenças renais (Vallance *et al.*, 1992).

O relaxamento do endotélio, devido ao ON, envolve a formação de 3', 5'- guanosina monofosfato cíclica (cGMP) pela ação da enzima guanilil ciclase (Repoport *et al.*, 1983). Este relaxamento endotelial pode ser farmacologicamente inibido pelo análogo da L Arginina, a L-N-monometil arginina (L-NMMA) ou a L-nitroarginina metil-éster (L-NAME), os quais competem com o precursor natural L-arginina, no sítio catalítico da enzima (Nathan & Xie, 1994). Em resposta ao estresse, hipoxia e várias substâncias, o epitélio libera também a prostaciclina que aumenta a concentração da 3,5 - adenosina monofosfato cíclica (cAMP) nas fibras musculares lisas e nas plaquetas. O ON e a prostaciclina são sinérgicos na inibição do agregamento de plaquetas, sugerindo que a presença de ambos sejam requeridas para a inibição máxima da ativação das plaquetas (Tschudi *et al.*, 1991). Outros fatores também podem mediar a contração (Lürcher & Vanhoutte, 1990), como a endotelina (ET1), a tromboxane A₂, a prostaglandina H₂, os componentes do sistema renina-angiotensina. Existem três isoformas da endotelina 1, 2 e 3 e a tradução do mRNA, gerado por uma preproendotelina, é convertido na "big" endotelina (bET-1). A ação da enzima conversora da endotelina (ECE) libera os 21 aminoácidos que formam a ET-1. A expressão do mRNA e a liberação da ET-1 são estimulados por vários fatores: pela trombina, angiotensina II, interleucina-1, fator de crescimento beta, epinefrina, arginina vasopressina e cálcio (Boulanger & Lürcher, 1990). Evidências experimentais e clínicas sugerem que a disfunção endotelial seja o maior determinante para o desenvolvimento e progressão de doenças cardiovasculares e nefropatias.

INFECÇÃO CRÔNICA NA ETIOLOGIA DA ATEROSCLEROSE.

Existem mecanismos pelos quais uma infecção pode iniciar ou perpetuar a aterosclerose. Como exemplo, existe a endotoxina secretada pela *Clamydia pneumoniae* que danifica a parede de vasos sanguíneos de coelhos e porcos (Reidy & Bowyer, 1978 ; Pesonen *et al.*, 1981). A infecção pode afetar diretamente o metabolismo de colesterol por oxidação lipídica, podendo também levar a um estado de hipercoagulação, seguida pela ativação dos monócitos (Leatham *et al.*, 1995). A infecção das células endoteliais podem também alterar a geração de trombina na superfície celular, aumentando o acúmulo de plaquetas e reduzindo a secreção de prostaciclina.

Outras infecções responsáveis pela aterogênese estão sendo relacionadas. Fabricant *et al.*, (1983) demonstraram que, quando os animais são vacinados contra Citomegalovírus (CMV), a ocorrência de lesões cardiovasculares reduzem.

A incidência de IAM pode ser maior (20-40%) durante o inverno devido a ocorrência de infecções respiratórias. Estudos têm demonstrado que, pacientes com IAM, têm as imunoglobulinas G e imunoglobulina A contra a *C. pneumoniae* em alta concentração (Saikki *et al.*, 1988).

DIAGNÓSTICO ENZIMÁTICO DO INFARTO NO MIOCÁRDIO

A isquemia miocárdica é basicamente composta de duas fases dinâmicas: reversível e irreversível, sendo que na fase irreversível a lesão celular é permanente. Em casos de isquemia reversível, as enzimas solúveis como a creatinina quinase (CK), a desidrogenase láctica (DHL), a aldalase e outras em geral não são detectáveis. Por outro lado, o miocárdio com lesão irreversível perde enzimas solúveis como CK e DHL, permitindo o diagnóstico enzimático do IAM.

Entretanto, comparações entre dois novos ensaios para o diagnóstico do IAM, realizadas por Panteghini *et al.*, (1998) demonstraram que o procedimento envolvendo o Cardiac Status é melhor do que mioglobina/creatinina kinase (CK)-MB e a troponina T (TropT), porque podem proporcionar uma maior rapidez e precisão na intervenção médica.

FATORES GENÉTICOS

Os níveis celulares e plasmáticos da Enzima Conversora da Angiotensina (ECA) são influenciados por um polimorfismo de inserção (I)/deleção (D) de uma sequência gênica repetitiva. (Cambien *et al.*, 1994). A repetição **Alu** é a mais comum das regiões repetitivas no genoma humano (Cambien, 1994). A inserção que dá origem ao alelo **ECA I** é uma repetição **Alu** do intron 16 (Singer *et al.*, 1996) e o alelo D resulta da falta da inserção de 287 nucleotídeos no gene ECA (Rigat *et al.*, 1990).

O alelo D tem uma frequência de aproximadamente 0,53 nas populações brancas, estando associado de maneira codominante a níveis elevados de ECA. O polimorfismo I/D da ECA é um marcador para um polimorfismo funcional, desconhecido e que parece ser um novo fator independente de risco para o infarto do miocárdio (Cambien, 1994).

Na verdade, a ECA é só parte de uma cadeia metabólica. O início desta cadeia está próximo ao corpúsculo de Malphighi, na arteríola aferente que apresenta modificações em suas fibras musculares lisas. O núcleo destas células, que são ovóides, passa a ter a forma mais esférica e o citoplasma se torna carregado de grânulos de secreção que se coram por técnicas especiais. Estas células musculares modificadas recebem o nome de células justaglomerulares (Figuras 1A, 1B e 2).

Biblioteca
Universidade Federal do Rio de Janeiro

O conteúdo destes grânulos é a aspartil peptidase que também denomina-se renina. Assim a quantidade de renina presente no rim é proporcional à quantidade de grânulos de secreção presentes nessas células.

A renina aumenta a pressão arterial e a secreção de aldosterona por intermédio do angiotensinogênio que está no plasma sanguíneo. O angiotensinogênio, pela ação da renina, libera um decapeptídeo, a angiotensina I (AI) (Figura 3) (Junqueira & Carneiro, 1995) .

Entretanto, apenas a AI não é suficiente para causar os efeitos ocorridos no organismo pela sua presença. A ECA catalisa a hidrólise de dois aminoácidos da AI, formando então a AII (octopeptídeo) (Junqueira & Carneiro, 1995).

O aumento da pressão sangüínea e a secreção de aldosterona pelo córtex da adrenal são efeitos da presença da AII. A aldosterona inibe a excreção de sódio pelos rins. A deficiência em sódio age como um sinal para a liberação da renina. À medida em que o sódio fica em excesso, haverá a inibição da liberação da renina que deprime a produção de aldosterona, desta maneira haverá um aumento da excreção de sódio na urina (Junqueira & Carneiro, 1995).

Existem vários autores que ligam o polimorfismo I/D com o aumento de incidência do IAM, embora alguns estudos tenham falhado na confirmação da correlação do polimorfismo I/D e IAM (Singer et al., 1996).

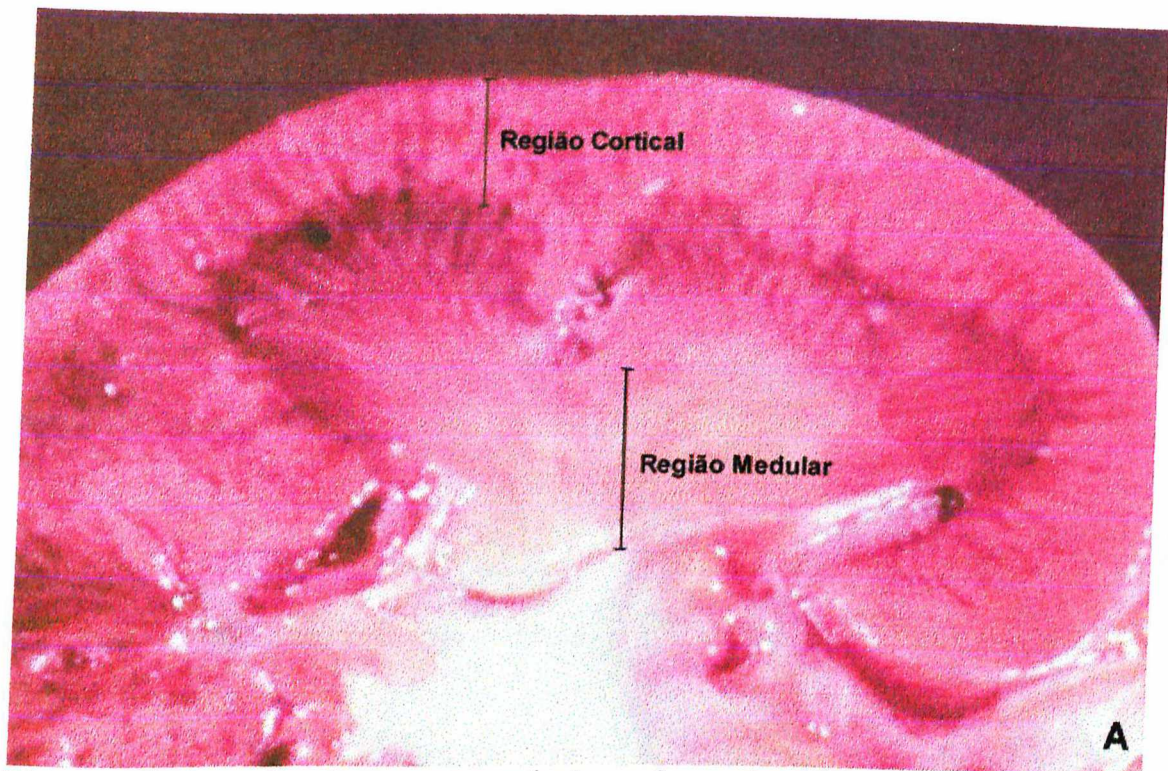


Figura 1.A - Corte macroscópico da estrutura renal. (Ross et al., 1993 ; Modificada).

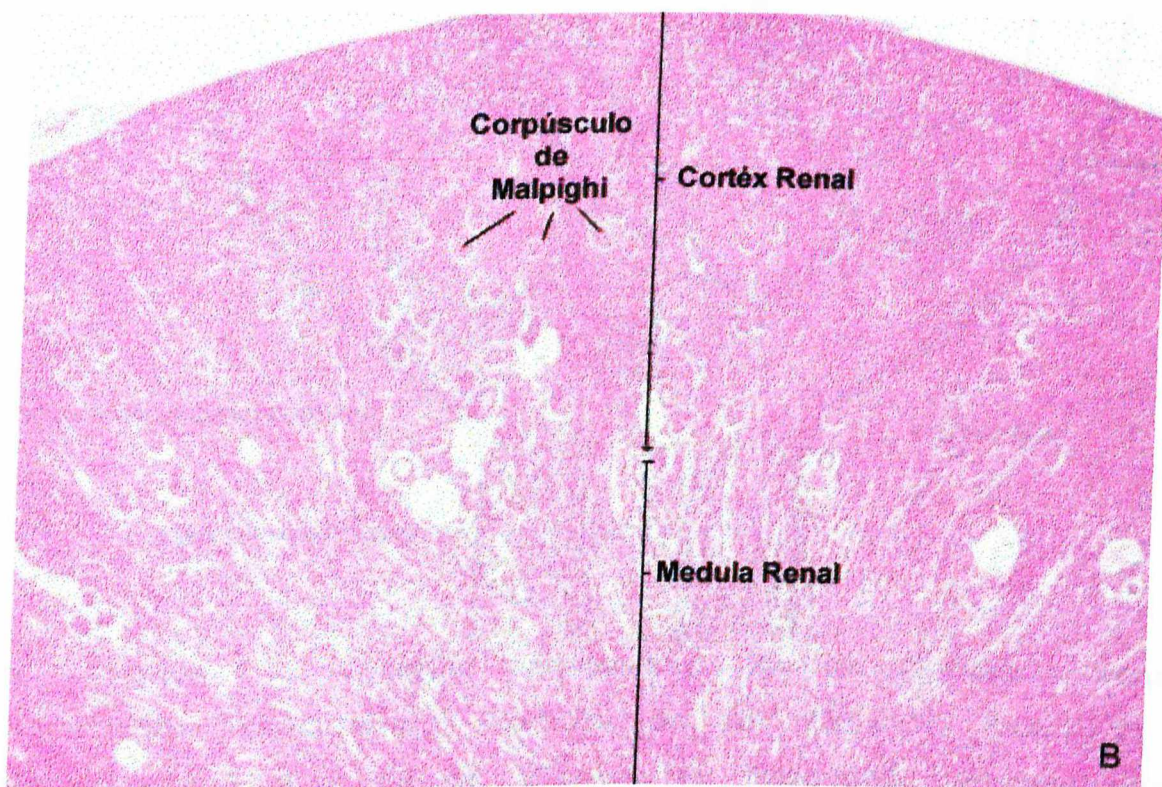


Figura 1.B - Corte histológico que compreende o Córtex e a porção da medula. (Ross et al., 1993 - Modificada).

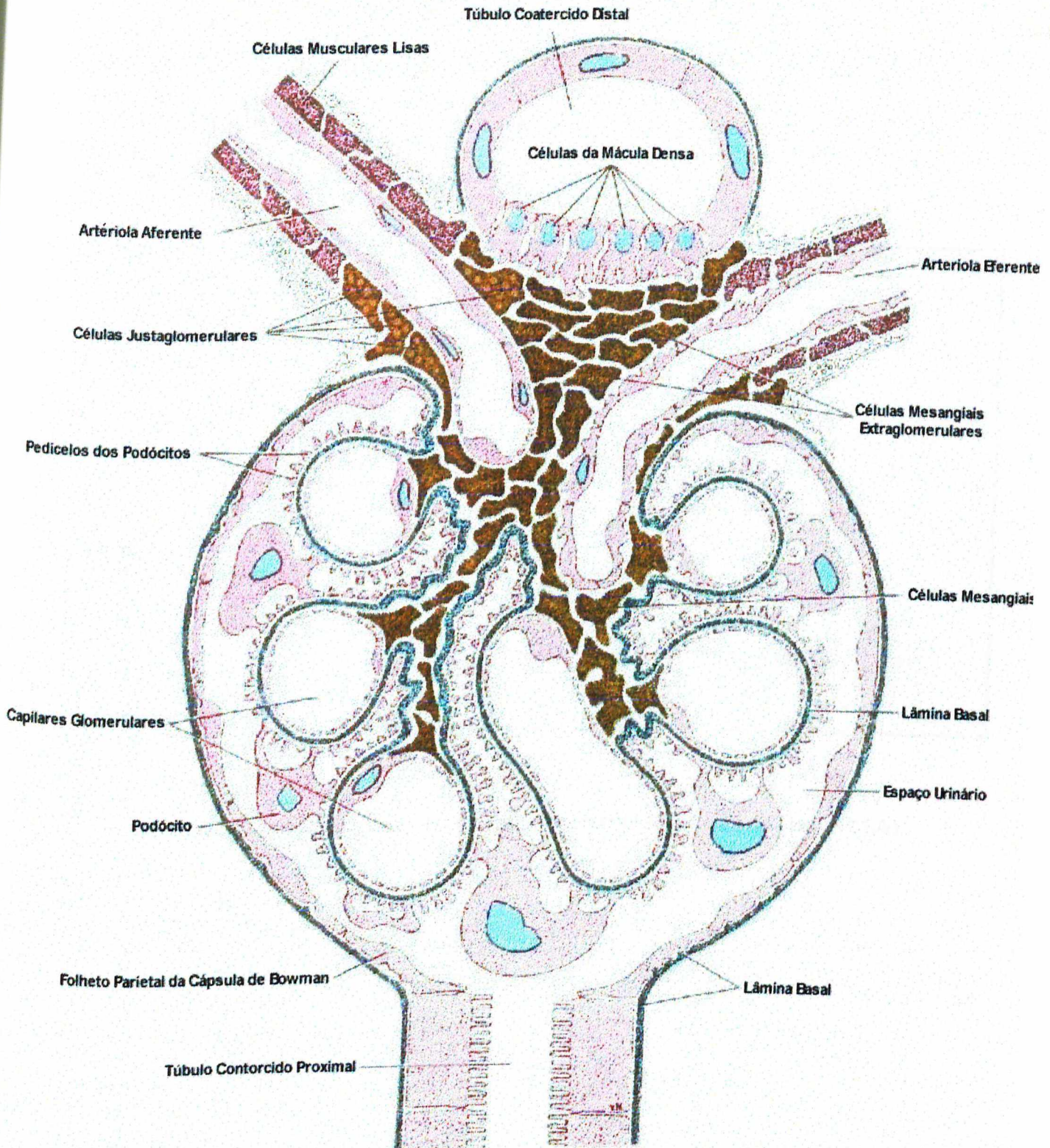


Figura 2 - Desenho esquemático de um glomérulo renal e estruturas associadas. (Modificado de: Kriz W, Sakai T: In: Morphological aspects of glomerular function. Proceedings of the Tenth International Congress of Nephrology, Londres, 1987).

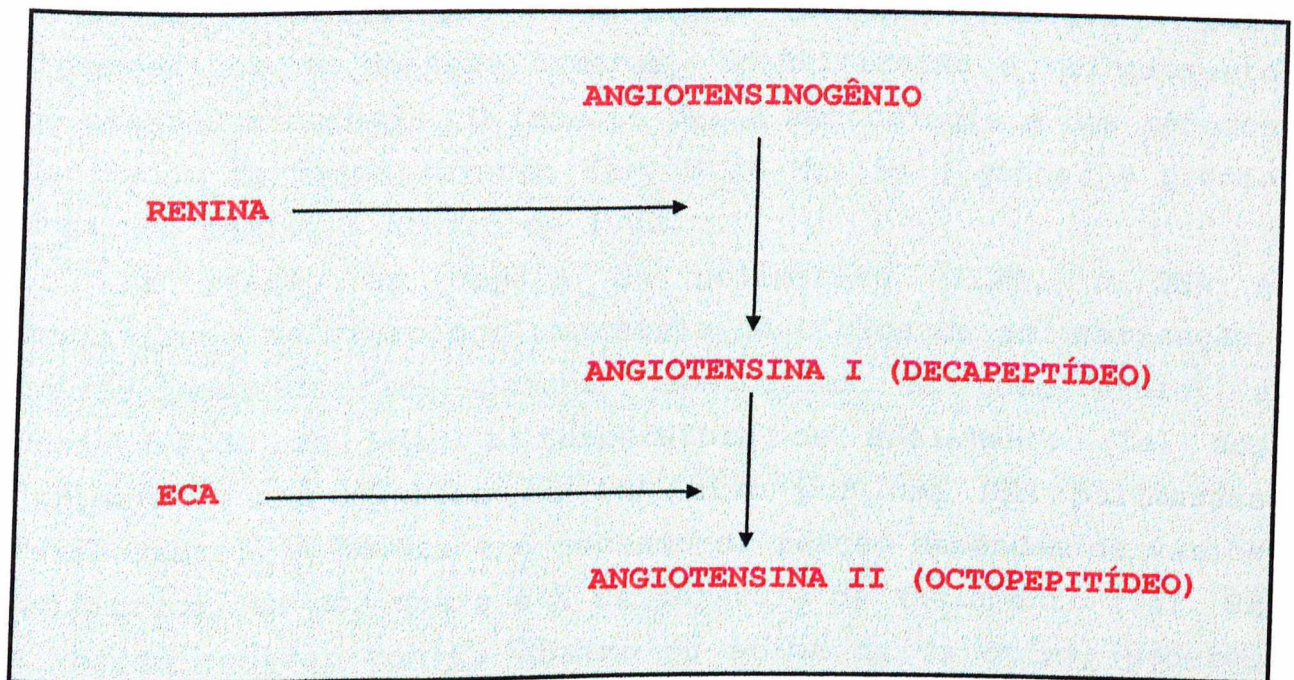


Figura 3. Modelo do Sistema Renina-Angiotensina (SRA).

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Uma das mais poderosas técnicas usadas na rotina da Biologia Molecular é a amplificação do DNA pela reação em cadeia da Polimerase (PCR). A aplicação da PCR causou uma revolução na Biologia Molecular, trazendo avanços para diagnósticos de doenças humanas, identificação e melhoramento de plantas e animais. O impacto desta metodologia e dos métodos derivados da mesma levaram Kary B. & Mullis a ganhar o prêmio Nobel de medicina no ano de 1993.

Na reação em cadeia da polimerase (PCR), o DNA é amplificado *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 ou acima da T_a ótima, poderão ser formados produtos não específicos e o nível de produção dos produtos amplificados, obviamente diminuir (Mullis, 1990). A quantidade de cloreto de magnésio, Taq polimerase, DNA "template" e "primer" também devem ser otimizadas, caso contrário não é possível obter produtos amplificados a partir dos termocicladores (Mullis, 1990).

A especificidade, rapidez e sensibilidade da PCR, tornam esta técnica importante para os estudos moleculares de qualquer espécie de organismo vivo. Muitos métodos tradicionais de clonagem, sequenciamento e análise de polimorfismo de DNA foram acelerados ou substituídos por inúmeras derivações da técnica de PCR (Mullis, 1990).

A praticidade do uso da PCR fez com que esta técnica se tornasse indispensável em qualquer laboratório de pesquisa genética. O desempenho e a importância da metodologia podem ser avaliados pelo fato de que, em apenas sete anos após sua

invenção, mais de 1.000 trabalhos foram publicados em todo mundo com seu uso direto (Mullis, 1990).

Existem vários fatores que dificultam a alta fidelidade da Taq Polimerase. Os trabalhos iniciais com esta enzima em PCR mostraram uma taxa de erro de uma base por 8.000 nucleotídeos incorporados (Saiki *et al.*, 1988).

Grodzicker *et al.*, (1974) desenvolveram, há 24 anos atrás, o primeiro marcador RFLP que destinava à detecção de mutações em DNA de vírus. Outros pesquisadores também adotaram a idéia, alguns anos depois (Wyman & White, 1980).

ASPECTOS GENÉTICOS DA ENZIMA CONVERSORA DA ANGIOTENSINA

Fatores envolvidos na patogenêse da aterosclerose, trombose e vasoconstricção contribuem para o desenvolvimento de doenças nas artérias coronárias do coração. Os pacientes acometidos pelo IAM têm uma forte associação com o polimorfismo ECA/ ID (Cambien *et al.*, 1992). O efeito desta associação explica as altas concentrações da ECA, em indivíduos com genótipo DD (Rigat *et al.*, 1990). Esta enzima exerce um papel chave na produção da Angiotensina II (AII) e no catabolismo da Bradicinina.

Existe uma hierarquia para o nível de ECA circulante, sendo que o genótipo DD tem maior concentração da enzima, o ID apresenta níveis intermediários e o genótipo II apresenta o nível mais baixo. O genótipo DD é mais freqüente em pacientes infartados, especialmente entre indivíduos com baixo Índice de Massa Corporal (IMC) e baixo nível de ApoB (Cambien *et al.*, 1992).

Os achados de Cambien *et al.*, (1992) não foram confirmados por Mattu *et al.*, (1995) e Ludwig *et al.*, (1995). A associação do alelo D com a aterosclerose (DAC) foi reportada por Mattu *et al.*, (1995), mas foi perdida quando os dados foram cruzados com

IMC. Ludwig et al., (1995) não apresentaram esta correlação, mas relataram que o alelo D prediz o IAM.

Contrastando com os achados anteriores, Katsuya et al., (1995) reportaram o aumento de risco para DAC com o polimorfismo do gene do angiotensinogênio (T235). O gene T235 apresentou uma correlação duas vezes maior em relação ao polimorfismo da ECA.

Por outro lado, na Alemanha, Gardemann et al., (1995), confirmaram o trabalho de Cambien et al., (1992) apresentando uma alta correlação entre o genótipo DD da ECA com IAM, em pacientes de baixo risco. Destes foram considerados somente aqueles que tinham baixos índices de massa corporal, que não consumiam cigarros e que apresentavam baixos níveis de colesterol e triglicerídeos. Lindpaintner et al., (1995) também falharam na associação entre o polimorfismo do alelo da ECA I/D e o IAM.

As explicações para estas divergências entre Cambien et al., (1992), Katsuya et al., (1995), Gardemann et al., (1995) e Lindpaintner et al., (1995) foram publicadas em um artigo de Singer et al., (1996). Esse artigo considerou que a explicação para o "background" genético da população norte americana, comparada com a euroléia, resultou da ligação entre o marcador ECA e outra doença e por isto levou a um resultado negativo. Entretanto, vários estudos têm demonstrado a hipótese de que Cambien et al., (1992) desenvolveram seus trabalhos com indivíduos mais jovens e os estudos de Lindpaintner et al., (1995) podem ter sido confundidos pela influência da seleção de pacientes que faziam uso de inibidores da ECA ou Aspirina e pela idade mais avançada, em relação aos estudos positivos. Conseqüentemente, o fator ambiental pode ter "mascarado" o marcador genético.

Existem ainda discordâncias em relação à correlação entre o alelo D e o aumento do risco de infarto, para pacientes com baixo risco de infarto (baixo índice de massa corporal e baixo nível de ApoB). Ludwig et al., (1995) ; Mattu et al., (1995) não confirmaram o relato de Cambien et al., (1992), no qual

afirmava que indivíduos de baixo risco são mais passíveis de desenvolver o IAM. Talvez essa discordância ocorra, em parte, devido à diferença da sensibilidade de métodos usados para classificar as doenças coronarianas.

Mattu *et al.*, (1.995) usaram o eletrocardiograma (ECGs) para diagnóstico do IAM, enquanto que (Ludwig *et al.*, 1995) utilizaram a angiografia coronária (Singer *et al.*, 1996).

Existe uma probabilidade de erro de genotipagem, onde o alelo I/D pode ser confundido com o alelo D/D (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 baseou em estudos que utilizaram métodos antigos. Assim não parece provável 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. Entretanto, vários trabalhos positivos têm divulgado o uso de "primers" específicos de inserção para evitar o erro de genotipagem, que troca o genótipo I/D pelo D/D (Missouris *et al.* 1996 ; Evans *et al.*, 1994, citado por Singer *et al.*, 1996).

Existe uma importante variação genética na atividade da Enzima Conversora da Angiotensina entre negros e brancos que, provavelmente, poderá gerar uma variação nas doenças cardiovasculares (Bloem *et al.*, 1993).

MECANISMO PARA A ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DA ECA D/D E DOENÇAS.

De acordo com a literatura, ainda não está bem definido o mecanismo da associação positiva entre o polimorfismo da ECA I/D com doenças cardiovasculares. Qualquer estudo, deve descartar a associação entre este polimorfismo e hipertensão, pois nenhum trabalho ainda provou correlação entre a hipertensão e as doenças cardiovasculares (Haber, 1995). Contudo, existe um aumento da evidência de que o Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) esteja envolvido no processo de crescimento vascular e cardíaco e, conseqüentemente, com a hipertrofia cardíaca e ateroma (Singer *et al.*, 1996).

A ECA circulante no plasma está presente também na superfície das células endoteliais, onde estimula a conversão da AI (decapeptídeo inativo), em AII (octopeptídeo) o qual é um potente vasoconstrictor que pode estimular o crescimento do músculo liso vascular, normalmente depois de lesões endoteliais (Wiemer *et al.*, 1991 e Daeman *et al.*, 1991). Powell *et al.*, (1989) relataram que inibidores da ECA podem inibir a proliferação miointimal, depois de lesões vasculares e a ECA também inativa a bradicinina. Pode-se então chegar ao raciocínio de que os inibidores podem diminuir o nível de AII e aumentar a bradicinina. A bradicinina é um vasodilatador que inibe a proliferação vascular e estimula a liberação de óxido nítrico e prostaciclina (Farhy *et al.*, 1992 ; Pelc *et al.*, 1991). O tratamento da hipertensão com inibidores da ECA leva a uma regressão da hipertrofia do ventrículo esquerdo, diminuindo também a pressão sanguínea (Dahlof & Hansson, 1992).

02601/99

GENE (AGT1R) RECEPTOR TIPO I DA ANGIOTENSINA II

O efeito da Angiotensina II (AII) é mediado por subtipos de receptores estruturalmente distintos: o AT1 e AT2 (CHIU *et al.*, 1989). Muitas das ações da AII são possíveis devido a presença do receptor AT1, o qual está presente nas fibras musculares do miocárdio (Paxton *et al.*, 1993). Com a clonagem do cDNA do receptor AT1 (Takanayanagi, *et al.*, 1992) foi possível identificar um polimorfismo na região 3', não traduzível e correspondente a uma transversão A-C, na posição do nucleotídeo 1166 da sequência do mRNA (Bonnardeaux *et al.*, 1991). O papel fisiológico do receptor AT1 sugere que o gene AGT1R possa interagir com o polimorfismo ECA I/D, provocando o Infarto Agudo do Miocárdio (IAM).

PCR-LIS-SSCP (LOW IONIC STRENGTH SINGLE-STRANDED CONFORMATION POLYMORPHISM)

A técnica PCR-LIS-SSCP foi desenvolvida por Orita *et al.* (1989) como um meio de detectar sequências com mutação. Este método é baseado no fato de que a mobilidade eletroforética de uma fita simples do ácido nucleico não depende somente do seu tamanho. A sequência nucleotídica é determinante para o enovelamento da fita simples do ácido nucleico. A desnaturação por aquecimento na presença de formamida é a técnica usual para geração de DNA de fita simples (ssDNA). Este procedimento tem sido utilizado por Bannai *et al.* (1994) na tipagem dos alelos HLA-DRB1 e na tipagem do HLA DPA1 e DPB1. Etsuko *et al.* (1996) desenvolveram um simples e rápido modo de desnaturar o DNA por aquecimento, formando ssDNA estável através de condições de baixa força iônica (LIS), que não requer reagentes desnaturantes e nem resfriamento da amostra.

O LIS-SSCP é mais eficiente do que o uso de formamida, pois apresenta o perfil das amostras com maior resolução. A formação da ssDNA é muito mais estável, até mesmo em temperatura ambiente. A ausência de formamida na solução desnaturante provoca uma maior estabilidade da ssDNA, devido ao aumento da temperatura de anelamento deste DNA, pela baixa ionicidade e a pela grande diluição, que resulta na diminuição da chance de hibridização entre a fita sense e antisense. Isso acontece com a solução de LIS, que é preparada utilizando uma proporção de uma parte de produtos amplificados para 20 da solução de LIS-SSCP.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de sangue total e de soro de 22 pacientes infartados foram colhidas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia e no Laboratório BioGenetics Tecnologia Molecular.

O grupo dos 22 Infartados foi selecionado de acordo com a definição da Organização Mundial da Saúde para o diagnóstico do infarto do miocárdio. Cada indivíduo apresentou pelo menos dois dos três critérios: história clínica de dor torácica típica de isquemia, alterações em eletrocardiogramas seriados e elevação dos níveis séricos da enzima creatinofosfoquinase (CK-MB). O teste laboratorial utilizado foi procedido segundo Ryan *et al.*, (1996). Foram excluídos os pacientes que realizaram a revascularização miocárdica, angioplastia percutânea transluminal coronária, os com infarto miocárdico prévio e com idade acima de 65 anos.

Foram considerados como fatores de risco a história familiar de doença arterial coronária (DAC), a Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), os níveis elevados de colesterol total (maior que 239 mg/dl) e de colesterol LDL (maior que 159 mg/dl), os níveis baixos de colesterol HDL (menor que 35 mg/dl), e os níveis elevados de triglicérides (maior que 200 mg/dl). O índice de massa corpórea (IMC) foi determinado

segundo Bray (1992), com a obesidade classificada como IMC maior ou igual a 25 Kg/m².

Os pacientes foram submetidos a cineangiocoronariografia dentro de duas semanas pós-infarto, possibilitando avaliar o grau de lesão coronária. A gravidade da doença aterosclerótica coronária foi determinada através do número de vasos lesados (lesão obstrutiva maior que 50%), sendo divididos em uni, bi e tri-arterial.

A avaliação do fluxo coronário da artéria relacionada ao infarto foi realizada através dos critérios do TIMI Study Group (1985), em grau 0 (sem perfusão); grau I (penetração sem perfusão); grau II (perfusão parcial); grau III (perfusão completa).

O grau de lesão do músculo cardíaco foi avaliado pelo cálculo da fração de ejeção do ventrículo esquerdo através da ventriculografia angiográfica.

O tipo de lesão foi analisado segundo os critérios de Ellis et al., (1990), sendo que as lesões foram subdivididas em tipo A: lesão curta, com menos de 10mm de comprimento, concêntrica, facilmente acessível, segmento não-angulado, contorno liso, com pouca ou nenhuma calcificação, sem oclusão total, sem envolvimento de ramos maiores, sem trombos; Tipo B: Lesão tubular com 10-20mm de comprimento, excêntrica, em segmento proximal com moderada tortuosidade, segmento moderadamente angulado entre 45 e 90 graus, contorno irregular, com moderada a grande calcificação, oclusão total com menos de 3 meses, localização ostial, lesão em bifurcação, algum trombo presente, sendo subdividida em tipos B1 com uma característica adversa e B2 com duas ou mais características adversas e tipo C: Lesão difusa com mais de 20mm de comprimento, segmento proximal com tortuosidade excessiva, segmento extremamente angulado com mais de 90 graus, oclusão total a mais de 3 meses, incapacidade de proteção de ramos maiores. Os parâmetros da cineangiocardiografia foram avaliados por três hemodinamicistas independentes.

DETERMINAÇÃO DO GENÓTIPO DA ENZIMA CONVERSORA DA ANGIOTENSINA:

O DNA foi preparado a partir de uma amostra de sangue (5 ml) colhida em tubo vacuntainer com EDTA. Os genótipos foram determinados pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) por meio da amplificação da região polimórfica I/D do gene da ECA.

Foram realizadas três repetições em todos os casos. Testes para excluir contaminação consistiram da casualização das amostras em cada repetição, da manipulação individual de cada amostra e dos procedimentos em ambientes separados (extração, preparo da reação e amplificação). O controle das soluções utilizadas foi feito em cada reação, através da utilização do tubo contendo todos reagentes necessários à amplificação, porém sem o DNA. Esse controle negativo determinava a não contaminação dos reagentes por DNA exógeno.

EXTRAÇÃO DO DNA, AMPLIFICAÇÃO E DETECÇÃO DO GENE DA ECA:

As amostras de sangue colhidas dos 22 pacientes infartados e dos 210 não-infartados foram conservadas a 4° C até o momento da extração do DNA. A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com os procedimentos para microextração de Sambrook *et al.*, (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 ressuspendido em solução tampão.

A reação em cadeia da polimerase foi realizada no equipamento MJ Research (PTC-100-60). O par de "primers" (iniciadores da reação) foi o mesmo descrito por Rigat *et al.*

(1992). A reação consistiu de 1,0 ug de DNA, 2,5 U de Taq DNA polimerase, 10 pmoles de cada primer, 2,5 mM MgCl₂ e 200 uM 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 1,5% e visualizados em luz ultravioleta, na presença de brometo de etídeo. Os produtos analisados esperados tiveram 03 (três) conformações: homozigoto normal (I/I: molécula de DNA com 490 pares de bases), heterozigoto (I/D: moléculas de DNA com 490 e 203 pares de bases) e homozigoto sem inserção (D/D: molécula de DNA com 203 pares de bases) (Figura 4).

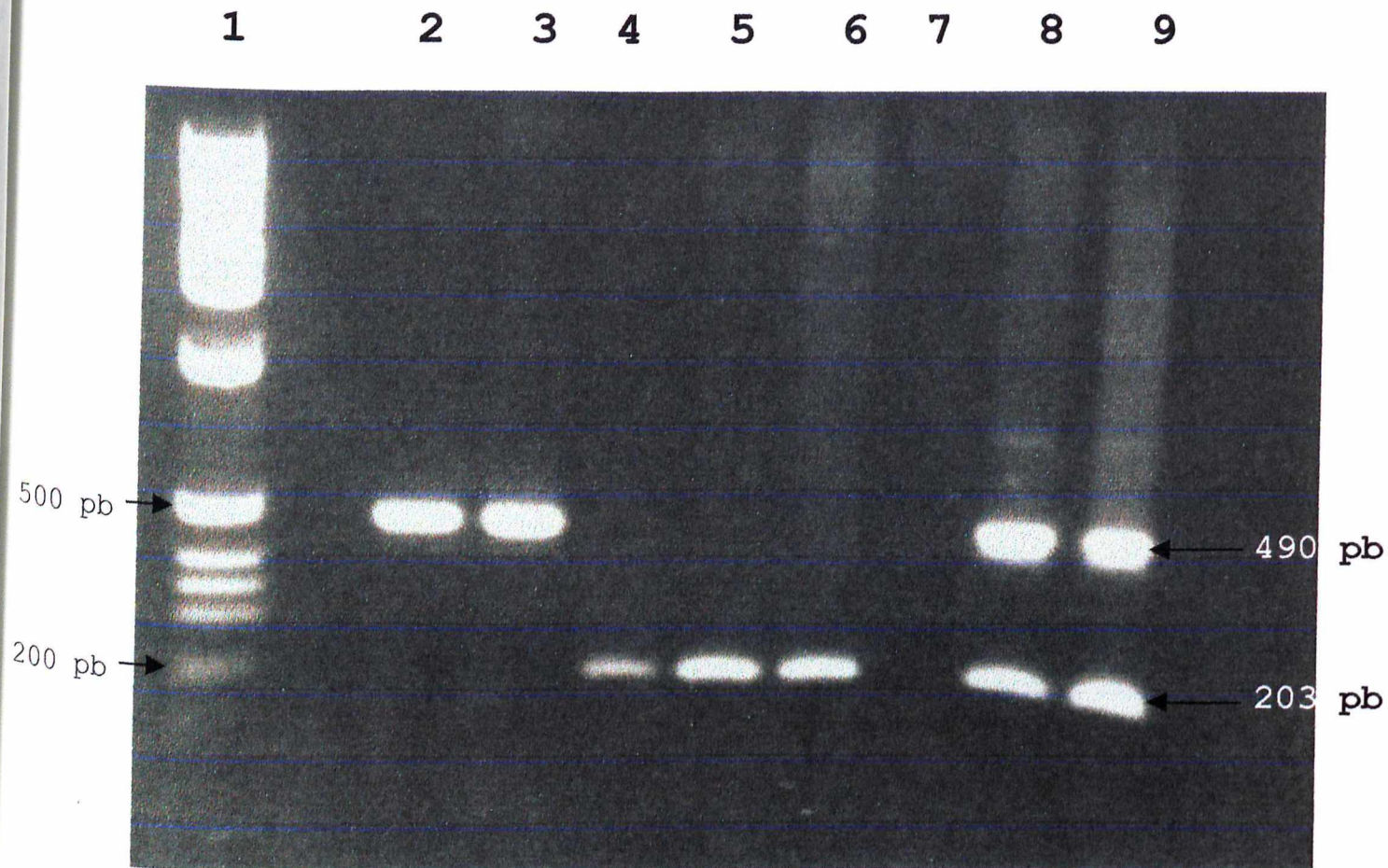


Figura 4: Produtos de amplificação da região polimórfica no intro 16 do gene ECA.

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).

EXTRAÇÃO DO DNA, AMPLIFICAÇÃO E DETECÇÃO DO GENE DO RECEPTOR 1 DA ANGIOTENSINA II:

O DNA extraído para a genotipagem da ECA também foi utilizado para a genotipagem do receptor da AII (AT1). O par de "primers" (iniciadores da reação) foi o mesmo descrito por Cambien *et al.*, (1992). A reação consistiu de 1,0 ug de DNA, 2,5 U de Taq DNA polimerase, 10 pmoles de cada primer, 2,5 mM MgCl₂ e 200 uM de dNTPs. Procederam-se 35 ciclos nas seguintes temperaturas e tempos: 94°C/1 min.; 59°C/30 seg. e 72°C/ 1 min. Os produtos amplificados também foram separados em eletroforese de agarose a 1,5% e visualizados em luz ultravioleta na presença de brometo de etídeo. O produto amplificado esperado foi um fragmento de 856 pares de base (Figura 5).

RESTRIÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO DO FRAGMENTO DO GENE DO RECEPTOR DA ANGIOTENSINA II.

Cada amostra do produto amplificado pelos primers do receptor AT1 foi incubado com a endonuclease *DdeI*, a qual reconhece o sítio de restrição ,5'...C[↓]TNAG...3'. A incubação de 15 ul de produto amplificado foi feita na presença de 1 ul da enzima de restrição *DdeI*, o que equivale a 8 U da mesma. A incubação foi feita a 37° C durante 1 hora e a inativação da enzima durou 20 minutos a uma temperatura de 65° C. O tampão utilizado para o procedimento de corte foi constituído de 100 mM Cloreto de Sódio (NaCl); 50 mM de Tris-HCl; 10 mM de MgCl₂; 1 mM Ditiotreitól (DTT) com o pH 7.9 a 25° C. A mutação no fragmento do gene AT1 está na posição 1166, onde existiu uma mutação por transversão da Adenina para Citosina. Por coincidência a mutação de ponto mudou a sequência constituindo um sítio da endonuclease *DdeI* (Figura 5).

A seqüência nucleotídica normal foi 5'- CTNAG - 3', não apresentando o sítio de restrição da *DdeI*. Com a ocorrência da troca da Adenina pela Citosina a seqüência muda para 5'- C^TTNAG - 3', coincidindo então com o sítio para *DdeI*. Na visualização em gel de agarose 2%, os fragmentos esperados para um indivíduo normal seria de 600 pb e de 256 pb (genótipo AA). Para um indivíduo portador dos alelos mutantes, a previsão seria de 3 fragmentos: sendo um de 600 pb, um de 110 pb e outro de 146 pb (genótipo CC). Finalmente, para um heterozigoto seriam 4 fragmentos: um de 600 pb; um de 256 pb; um de 110 pb e outro de 146 pb (Figura 5).

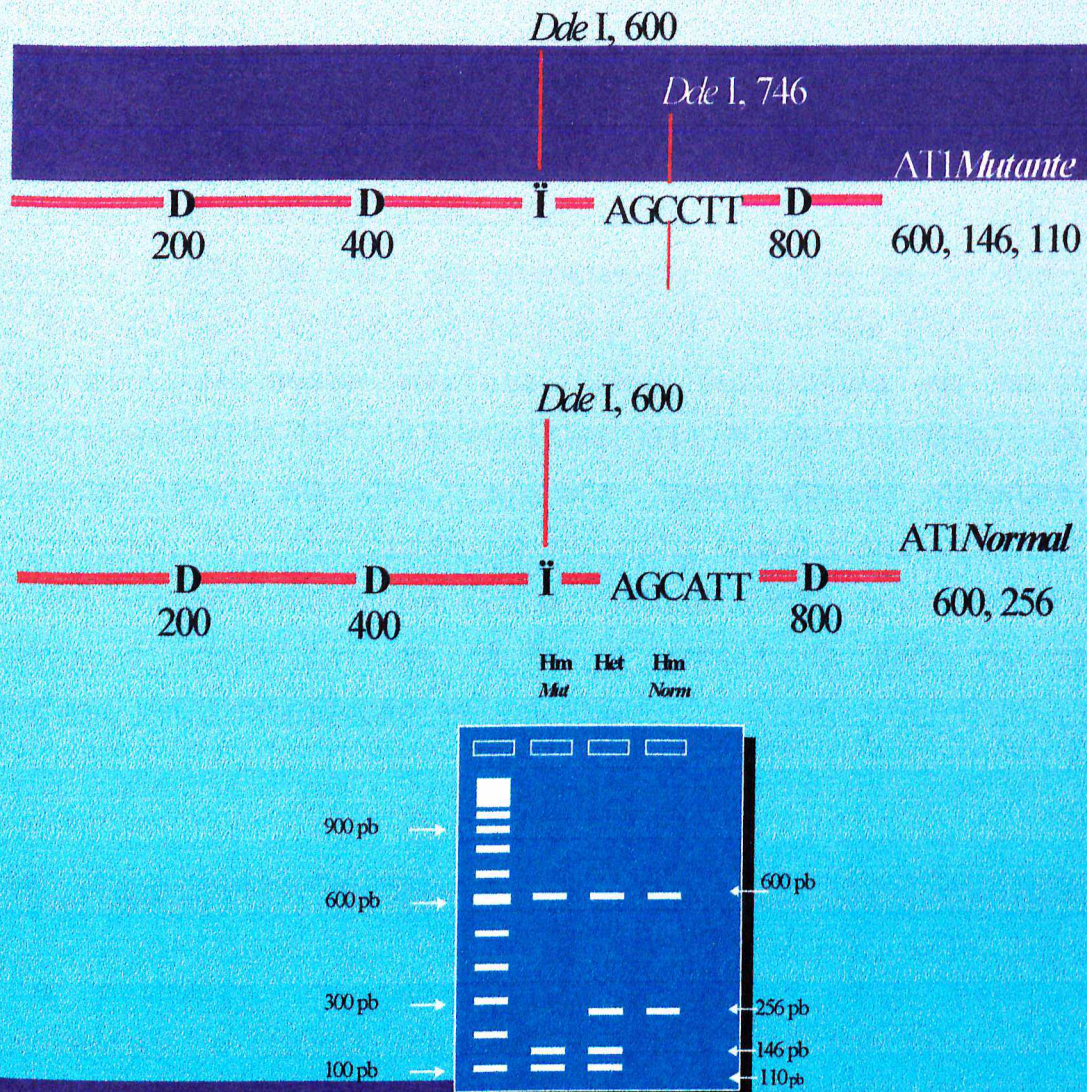


Figura 5: Sítios de restrição da enzima DdeI no gene receptor da Angiotensina II.

PCR-LIS-SSCP

Para a análise de mutação nos fragmentos amplificados pela PCR-LIS-SSCP, utilizou-se os processamentos relatados por Etsuko *et al.* (1996), com algumas modificações. Um microlitro do produto da PCR foi adicionado a 20 μ l da solução LIS (10% de sacarose, 0,01% de azul de bromofenol e 0,01% de xylene cyanol FF), sob forte agitação. A mistura foi incubada por 2 minutos a 97° C e 8 μ l dessa mistura foram aplicados em um gel de poliacrilamida a 10% (49 acrilamida:1 bisacrilamida). A fonte utilizada foi AE 250 a uma temperatura constante. A eletroforese foi realizada em solução tampão contendo 45 mM de TBE (tris-borato-EDTA) pH 8,0 e 1 mM de EDTA. A corrente foi de 15 mA e o tempo foi de 16 h. O perfil do SSCP no gel foi detectado pela coloração em prata.

GENOTIPAGEM DAS REGIÕES BRASILEIRAS

A colheita de amostras de sangue das 210 pessoas pertencentes a todos os estados brasileiros foi feita no Hemocentro da Universidade Federal de Uberlândia. A seleção das amostras foi aleatória, obedecendo a seqüência de entrada das mesmas e as proporções determinadas de acordo com a população de cada região, (Tabela 1-IBGE). As amostras foram coletadas no período de março de 1997 a junho de 1998. De acordo com a tabela 2, a população total do Brasil, até o período pesquisado, era igual a 146.917.459 de pessoas. A tabela abaixo relaciona as quantidades de 210 amostras que foram retiradas, obedecendo a proporção estimada para cada estado.

Tabela 1: Regiões brasileiras que contribuíram com as amostras coletadas no Hemocentro de Uberlândia.

REGIÕES	UNIDADE	SIGLA	CAPITAL	POPULAÇÃO
NORTE	ACRE	AC	RIO BRANCO	417.165
	AMAPÁ	AP	MACAPÁ	288.690
	AMAZONAS	AM	MANAUS	2.102.901
	PARÁ	PA	BELÉM	5.181.570
	RONDÔNIA	RO	PORTO VELHO	1.130.874
	RORÁIMA	RR	BOA VISTA	215.950
	TOCANTINS	TO	PALMAS	920.116
NORDESTE	ALAGOAS	AL	MACEIÓ	2.512.991
	BAHIA	BA	SALVADOR	11.855.157
	CEARÁ	CE	FORTALEZA	6.362.620
	MARANHÃO	MA	SÃO LUÍS	4.929.029
	PARAÍBA	PB	JOÃO PESSOA	3.200.677
	PERNAMBUCO	PE	RECIFE	7.122.548
	PIAUÍ	PI	TERESINA	2.581.215
	RIO GRANDE DO NORTE	RN	NATAL	2114121
	SERGIPE	SE	ARACAJÚ	1491867
SUDESTE	ESPÍRITO SANTO	ES	VITÓRIA	2598505
	MINAS GERAIS	MG	BELO HORIZONTE	15731961
	RIO DE JANEIRO	RJ	RIO DE JANEIRO	12783761
	SÃO PAULO	SP	SÃO PAULO	31546473
SUL	PARANÁ	PR	CURITIBA	8443299
	RIO GRANDE DO SUL	RS	PORTO ALEGRE	9135479
	SANTA CATARINA	SC	FLORIANÓPOLIS	4538248
CENTRO OESTE	DISTRITO FEDERAL	DF	BRASÍLIA	1598415
	GOIÁS	GO	GOIÂNIA	4012562
	MATO GROSSO	MT	CUIABÁ	2022524
	MATO GROSSO DO SUL	MS	CAMPO GRANDE	1778741

FONTE: IBGE, Anuário Estatístico do Brasil, 1992. Censo demográfico 91

Tabela 2: Número de indivíduos que foram genotipados em cada região

SUL	SUDESTE	CENTRO OESTE	NORTE	NORDESTE
30	92	15	15	58

ANÁLISE ESTATÍSTICA:

A avaliação da influência do polimorfismo do gene AT1 no grau de aterosclerose coronária, foi realizada em 22 indivíduos infartados, pela análise de variância com cruzamento dos três genótipos do AT1 e dos parâmetros de avaliação cinecoronariográfica, bem como o cruzamento com os outros fatores de risco cardiovasculares. A comparação de médias entre os grupos foi feita pelo Duncan's Multiple Range Test. Em todos os testes fixou-se em 0,05 ou 5% ($\alpha < 0,05$) o nível para rejeição da hipótese de nulidade, assinalando-se em vermelho os valores significantes. Foram também realizadas correlações de Pearson e correlações canônicas, utilizando o programa Statística versão 4.5^A (1993) para determinar possíveis associações de variáveis clínicas do IAM com os genótipos de ambos os genes ECA e AT1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a obtenção de resultados precisos, sensíveis e com repetibilidade, foi fundamental a padronização das técnicas de extração de DNA (Figura 6), da amplificação para obtenção das duas genotipagens (Figura 7) e da desnaturação dos produtos amplificados. Essas técnicas tiveram a finalidade de obter o padrão de fitas simples no LIS-SSCP e a restrição enzimática. A detecção dos produtos amplificados também foi de grande importância, pois o perfil eletroforético na genotipagem do receptor AT1 da AII apresentou fragmentos com até 36 pares de bases de diferença (Figura 8). Para obter a resolução desejada, usou-se agarose na concentração de 2%.

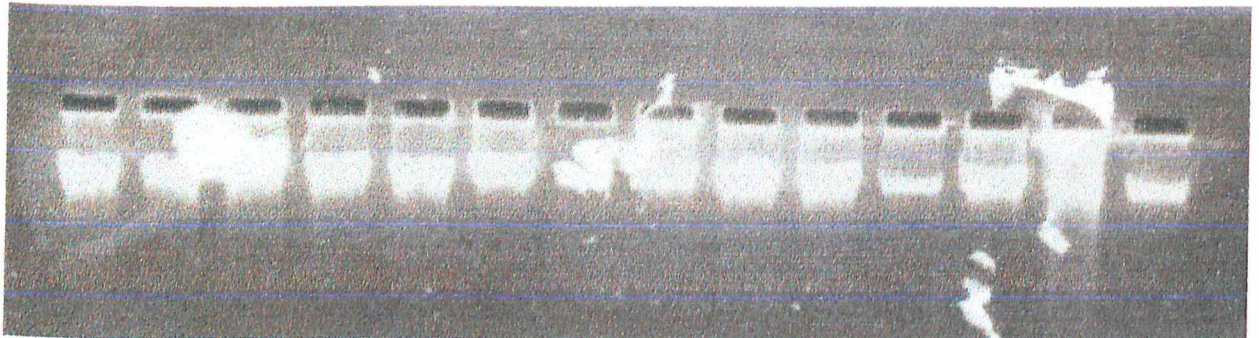


Figura 6: Padrão de DNA utilizado nas reações de amplificação para os genes ECA e AT1.

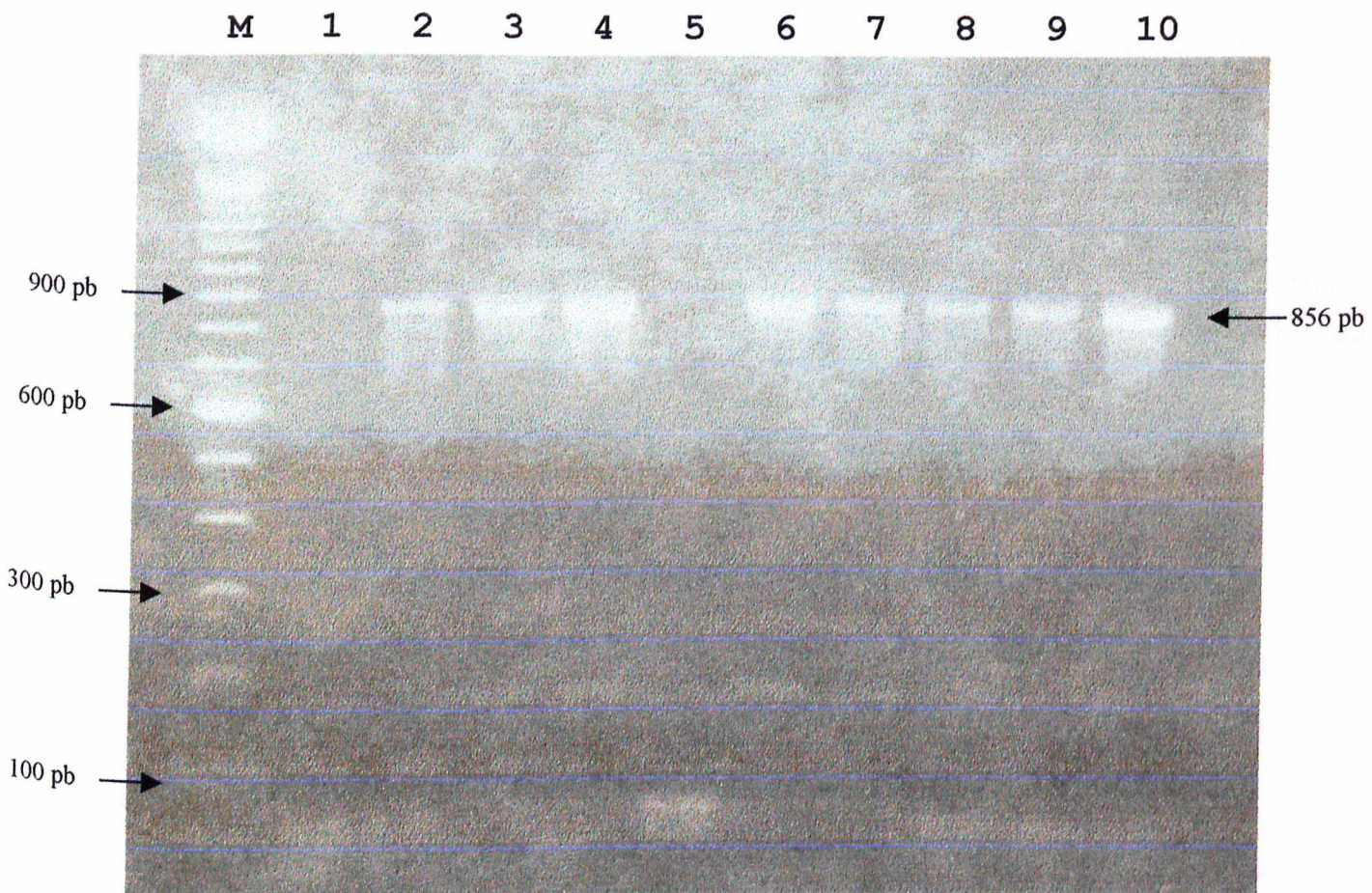


Figura 7: Produtos amplificados do gene receptor da Angiotensina II (AT1).

Linha 1 - Controle negativo da reação.

Linha 5 - Controle negativo da reação

Linhas 2, 3, 4 , 6 ,7 ,8 ,9 e 10 - Produto amplificado do gene AT1.

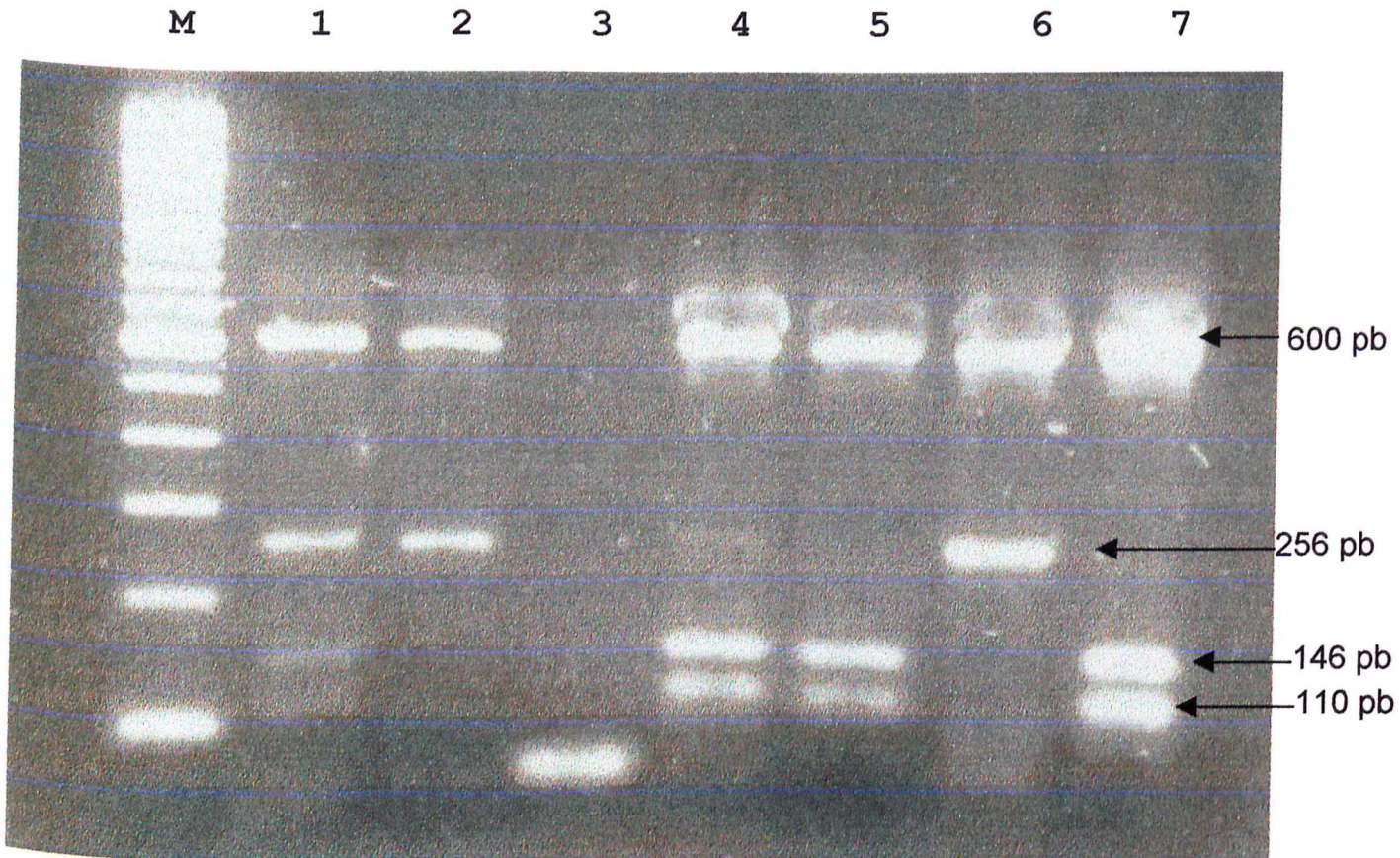


Figura 8: Produtos de amplificação do receptor AT1 da Angiotensina II.

Linha M- Marcador de peso molecular de 100 pb.

Linha 3- controle negativo da reação

Linhas 1 e 4- Genótipo AC (Heterozigoto).

Linhas 5 e 7 - Genótipo CC (Homozigoto).

Linha 2 e 6 - Genótipo AA (Homozigoto).

Para os procedimentos da PCR, foram necessárias muitas tentativas no sentido de eliminar todos os produtos inespecíficos que inviabilizam tanto a técnica de RFLP por endonuclease, quanto a técnica de PCR-LIS-SSCP, aplicadas na obtenção dos resultados apresentados.

A quantidade de DNA para a reação de amplificação foi fundamental, exigindo grande precisão na obtenção do perfil específico de bandas no gel de poliacrilamida e no gel de agarose. Porém foi mais flexível a quantidade de Taq DNA polimerase, dNTPs e tampão da Taq polimerase, pois não apresentaram variações, facilitando assim a determinação das concentrações ótimas. Para a otimização da concentração do cloreto de magnésio ($MgCl_2$), concluindo-se como ideal a concentração de 2,5 mM.

O genótipo do receptor AT1 da AII apresentou significância estatística na análise de variância com as características que promovem o aumento da gravidade das doenças cardiovasculares (DCV). Os fatores tradicionais de DCV, não foram significantes, quando relacionados à mutação do receptor. Isto demonstrou a independência entre a ocorrência dos genótipos favoráveis ao risco de infarto e fatores tradicionais. Os fatores estudados foram o colesterol HDL, O colesterol LDL e os níveis de triglicérides totais. A presença de mutação do receptor não implica na ocorrência de altos níveis de colesterol LDL, de baixos níveis de HDL combinados com altos níveis de triglicérides totais, devendo existir outros marcadores para estas características. Por outro lado, com resultados da Tabela 3, podemos com certeza, associar a presença da mutação no gene AT1 com os pacientes que tiveram uma maior obstrução e com o número de artérias coronárias comprometidas. Os dados mais importantes relacionados foram: os vasos acometidos com mais de 50% de oclusão, o agrupamento de bi + tri-arterial vs uni-arterial e fluxo coronariano (TIMI). Foram exatamente estes danos que ocorreram com maior intensidade no grupo de pacientes infartados, portadores da mutação no receptor AT1. A quantidade

de vasos acometidos e o fluxo coronário apresentaram uma significância com $P < 10\%$ (Tabela 3). Observa-se na Tabela 4 que os vasos acometidos, lesão bi e tri-arterial e fluxo coronariano apresentaram maior associação, quando foi considerada a presença da mutação (AC+CC) versus a ausência de mutação (AA).

A não inclusão de um grupo controle, de não infartados, se deve pelos seguintes motivos :

- a) ocorrência do infarto agudo em idades e sexos distintos, apresentando mais de um fator de risco convencional;
- b) indivíduos aparentemente normais podem apresentar obstruções coronariana sem sintomas físicos evidentes;
- c) a cineangiocoronariografia só é realizada em pacientes com suspeitas de infarto, podendo ainda estar sujeita à não ocorrência de trombose coronária;
- d) a ocorrência do infarto do miocárdio é multifatorial, sendo quase impossível a separação de grupos semelhantes quanto ao risco.

A falta de definição para um grupo controle não impede que os diferentes grupos sejam analisados; contudo, requer-se grande número de pacientes que, juntamente com análises estatísticas apropriadas, possam inferir, sobre a influência dos marcadores moleculares na doença. Uma alternativa para o estudo de eventos multifatoriais tem sido o emprego da correlação canônica, que procura associar grupos de variáveis independentes, como os genótipos, com grupos de variáveis dependentes, ou seja, o estudo de causa e efeito. Portanto, nesta investigação foi possível analisar o efeito do polimorfismo dos genes da ECA e AT1 na extensão do infarto, pois associou-se os dois polimorfismos gênicos com os diversos parâmetros que medem a gravidade do infarto do miocárdio, considerando-os como parte de um único evento.

Apesar das divergências existentes entre vários autores, as pesquisas relacionadas com os aspectos genéticos das doenças cardiovasculares apresentaram, constantemente, novos dados e novos marcadores. Recentemente, foi relatada a associação do gene Receptor AT1 da AII com hipertensão e IAM (Cambien et al., 1992).

Análise de variância dentro do genótipo AT1 para todas as variáveis estudadas (Tabela 3) e suas significâncias demonstram a importância deste polimorfismo no número de vasos acometidos e fluxo coronário, com ligeira influência em outros parâmetros, porém não significativas, quando analisadas individualmente. Considerando-se a presença do alelo não favorável C do gene AT1, tanto em homozigose, quanto em heterozigose, a significância para as características número de vasos lesados e fluxo coronariano é ainda maior (Tabela 4 e 5).

O poder do teste estatístico marginal para algumas variáveis pode ser devido ao baixo número de pacientes analisados, pois são características quantitativas em sua maioria.

Houve predominância do sexo masculino no grupo de infartados (73%) em relação ao feminino (27%), estando de acordo com Lerner et al., (1986), apesar de não haver justificativas que expliquem essa diferença.

Na comparação das médias pelo teste de Duncan (Tabela 5), pôde-se observar que o genótipo comporta-se diferentemente em duas características distintas. Uma delas foi o fluxo coronário, onde a mutação demonstrou ter uma relação de dominância sobre o genótipo não mutante, pois os indivíduos heterozigotos apresentaram a mesma média que os homozigotos, portadores de mutação. A outra característica foi o número de vasos acometidos que apresentou uma codominância, com médias diferentes entre os indivíduos heterozigotos e homozigotos. Outra observação importante foi a não associação dos genótipos com os fatores tradicionais.

Resultados semelhantes foram obtidos por Araújo (1998), como o gene da ECA, contudo as variáveis mais significativas

associadas ao genótipo foram: o tabagismo e baixos níveis de HDL. Isto implica que uma associação entre os dois polimorfismos podem Ter um efeito sinérgico na ocorrência do IAM.

Tabela 3: Análise de Variância dentro de genótipo do receptor AT1

VARIÁVEIS DEPENDENTES	QUADRADOS MÉDIOS DO ERRO	PROBABILIDADE
COLESTEROL (mg/dl)		
Total > 200	2.830,43	0,80
HDL < 35	109,74	0,42
LDL > 159	2.047,82	0,73
Triglicérides > 200 mg/dl	11.793,54	0,54
IMC CLAS	0,23	0,25
VASOS ACOMETIDOS	0,28	0,05
BI/TRI UNI	0,14	0,07
ARTÉRIA COMPROMETIDA	0,84	0,47
GRAU DE LESÃO	0,61	0,23
FLUXO CORONÁRIO	0,99	0,09
TIPO DE LESÃO	0,43	0,23

Tabela 4: Análise de Variância do Estado Arterial, Colesterol e Triglicérides para os genótipos AC+CC vs AA

VARIÁVEIS DEPENDENTES	QUADRADOS MÉDIOS DO ERRO	
COLESTEROL (mg/dl)		
Total > 200	2830,43	0,51
HDL < 35	109,74	0,31
LDL > 159	2047,82	0,49
Triglicérides > 200 mg/dl	11793,54	0,71
IMC CLAS	0,23	0,19
VAS ACOM	0,28	0,04
BI/TRI UNI	0,14	0,03
ARTÉRIA CULPADA	0,84	0,59
GRAU DE LESÃO	0,61	0,18
FLUXO CORONÁRIO	0,99	0,03
TIPO DE LESÃO	0,43	0,13

Tabela 5: Comparação de Médias pelo Teste de Duncan.

	BI/TRI Vs UNI	TIMI	VASOS ACOMETIDOS
AC+CC	1,55 a	1,63 b	1,75 a
AA	1,18 b	2,72 a	1,27 b
AC	1,50 b	1,66 b	1,50 b
CC	1,80 a	1,60 b	2,20 a

* Médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes ao nível de 5 % de probabilidade.

Os dados obtidos demonstraram que a mutação do receptor da AII é altamente associada com o número de vasos acometidos, classificados como: uniarterial, biarterial e triarterial, com o fluxo coronário (TIMI) e com o grau de lesão (Tabela 7).

Quando analisados pela correlação de Pearson (Tabela 6), os genótipos com o acometimento arterial e o receptor da AII, demonstraram uma correlação com a classe de número de vasos acometidos (bi+tri vs uni) (51%), com o fluxo coronário (TIMI) (51%) e com os vasos acometidos (bi, tri e uni) (49%). Agrupando o genótipo em classes de mutantes e não mutantes, ocorreu a associação com as seguintes variáveis: classe de números de vasos acometidos (bi+tri vs uni) (46%) e fluxo coronário (55%). Esses dados demonstraram que ao comparar o número de vasos acometidos e fluxo coronariano individualmente (AA, AC, CC) ou em classes de genótipo mutante (AC, CC) e não mutante (AA), o resultado não sofreu alteração.

O polimorfismo da ECA I/D correlacionou-se significativamente somente com a variável "tipo de lesão" e a mutação no receptor da AII teve correlação com o número de vasos acometidos e fluxo coronariano. Isso demonstrou que existe uma relação sinérgica entre o polimorfismo da ECA e a mutação do receptor AT1 na ocorrência do infarto do miocárdio.

Tabela 6: Correlação de Pearson entre os genótipos polimórficos ECA e AT1 com a Hipertensão, os antecedentes familiares, o colesterol, o número de vasos acometidos, o fluxo coronariano e tipo de lesão.

	HIPERTENSÃO	Antecedentes Familiares	Colesterol Total	Bi/Tri Uni	Vasos Acometidos	Fluxo Coronário (TIMI)	Tipo de Lesão
ECA (II, ID , DD)	- 0,11	- 0,24	0,150	0,28	0,29	- 0,28	0,42
ID+DD X II AT1	- 0,21	0,10	- 0,030	-0,33	- 0,30	0,20	-0,54
	- 0,35	0,26	- 0,027	0,51	0,49	- 0,51	0,22
AC+CC X AA	- 0,29	0,18	- 0,240	0,46	0,38	- 0,55	0,26

* Os números em vermelho são estatisticamente significantes ao nível de 5% de probabilidade

Devido a ocorrência do IAM ser multifatorial, a correlação canônica é o método estatístico mais apropriado para avaliar grupo de variáveis contra genótipos. Esta associação entre grupo além de permitir determinar efeitos sinérgicos ou antagônicos entre genótipos e variáveis, define também o efeito individual na ocorrência de IAM como um todo.

O teste de correlação canônica, foi realizado reunindo os efeitos que agravam o estado do paciente infartado, contra os genótipos do receptor AT1 da AII e o gene do polimorfismo da ECA I/D. Os dados demonstraram que o indivíduo possuidor do genótipo de risco de infarto DD ou ID, juntamente com a mutação no receptor AT1 da AII, tem uma alta correlação (0,73; $P < 0,01$) com: o grau de lesão, o tipo de lesão e o número de vasos acometidos (bi,tri,uni) e os vasos acometidos (bi + tri vs uni). Os genótipos da ECA e do AT1, quando analisados separadamente, conseguem explicar a maior extensão do infarto, porém com uma menor correlação (58%) e uma menor precisão ($P < 0,04$) (Tabela 7).

Tabela 7: Correlações Canônicas entre Grupos de Variáveis

Grupo 1	Grupo 2	Correlação	Nível de P
ID + DD vs II	bitri vs uni	0,73	0,01
	grau de lesão		
AC +CC vs AA	tipo de lesão		
	vasos		
ID + DD vs II	acometidos	0,70	0,02
	grau de lesão		
AC +CC vs AA	tipo de lesão		
	bi+tri vs uni		
ID + DD vs II	grau de lesão	0,58	0,05
	tipo de lesão		
	bi+tri vs uni		
AC + CC vs AA	grau de lesão	0,58	0,04
	tipo de lesão		

DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA GENOTÍPICA BRASILEIRA DO POLIMORFISMO DA ECA I/D

As propriedades genéticas das populações são determinadas a partir do conhecimento de suas frequências alélicas e genotípicas (Tabela 8). As frequências alélicas (Tabela 9) correspondem às proporções dos diferentes alelos de um determinado gene na população. As frequências genotípicas são as proporções dos diferentes genótipos na população de indivíduos (Ramalho et al., 1989).

Os dados obtidos pela genotipagem demonstraram que a frequência do alelo I é aproximadamente igual para as cinco regiões estudadas, igualmente ocorrendo com o alelo D. As 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 (0,53), relatada por Cambien et al., (1.992). Para as demais regiões a frequência foi acima de 0,53.

Os valores literais que compõem a somatória dos genótipos de cada região foram X_1 = número de genótipos II; X_2 = número de genótipos ID e X_3 = número de genótipos DD, conforme a relação seguinte.

$X_1 = 42$ = número de genótipos II na população

$X_2 = 90$ = número de genótipos ID na população

$X_3 = 78$ = número de genótipos DD na população

$$X_1 + X_2 + X_3 = \text{NTI} \text{ e } \text{NTI} = 42 + 90 + 78 = 210, \text{ portanto } \text{NTI} = 210$$

NTI = número total de indivíduos

Cálculo da frequência dos genótipos:

$$\text{Frequência do genótipo } \mathbf{II} = X_1/\text{NTI} = 42/210 = \mathbf{0,20}$$

$$\text{Frequência do genótipo } \mathbf{ID} = X_2/\text{NTI} = 90/210 = \mathbf{0,43}$$

$$\text{Frequência do genótipo } \mathbf{DD} = X_3/\text{NTI} = 78/210 = \mathbf{0,37}$$

Para o cálculo da frequência dos alelos I e D, que será representada por p e q, utilizou-se as fórmulas descritas abaixo:

- frequência do alelo I = p = $2X_1 + X_2/2\text{NTI} = 2.42 + 90/2.210 = 0,42$
- frequência do alelo D = q = $2X_3 + X_2/2\text{NTI} = 2.78 + 90/2.210 = 0,58$

As frequências alélicas da ECA nas regiões brasileiras não apresentaram diferenças das publicadas por Cambien et al., (1992), apresentando uma média de 0,4 para o alelo I e 0,6 para o alelo D. (Tabela 9)

Tabela 8: Distribuição dos genótipos do Polimorfismo da ECA I/D, em cada região do Brasil.

REGIÕES	I/I	I/D	D/D	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

Tabela 9: Frequências Alélicas do Polimorfismo da ECA I/D das regiões brasileiras.

REGIÕES	f do alelo I = p	f do alelo D f = 1 - p
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

Não houve uma uniformidade na distribuição genotípica nas diversas regiões do Brasil. Entretanto houve um número baixo de indivíduos portadores do genótipo II. Esses resultados demonstraram que o genótipo mutante da ECA estará presente em aproximadamente 70% dos indivíduos da população brasileira. Em comparação com os dados da tese do Araújo, (1998), podemos observar que as frequências foram praticamente idênticas, onde foi determinada a frequência dos genótipos II (0,2), ID (0,4) e DD (0,4) nos indivíduos infartados. Esses dados sugerem que a mutação do gene da ECA não está associada à ocorrência do Infarto do Miocárdio (Figura 9).

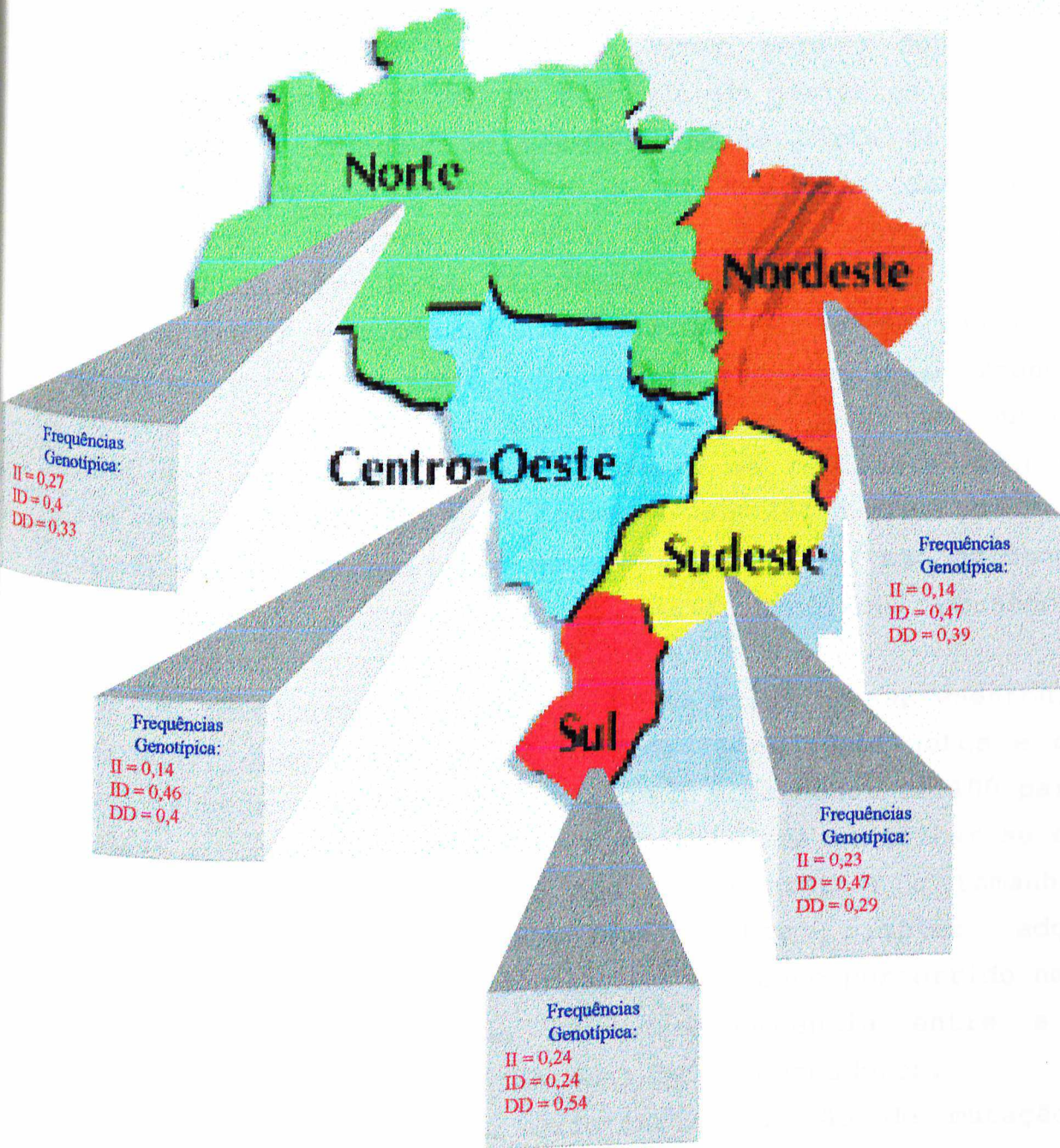


Figura 9. - Distribuição das Frequências Genotípicas das Cinco Regiões do Brasil.

RESULTADO DA INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES NO INTRON 16 DO GENE POLIMÓRFICO DA ECA I/D

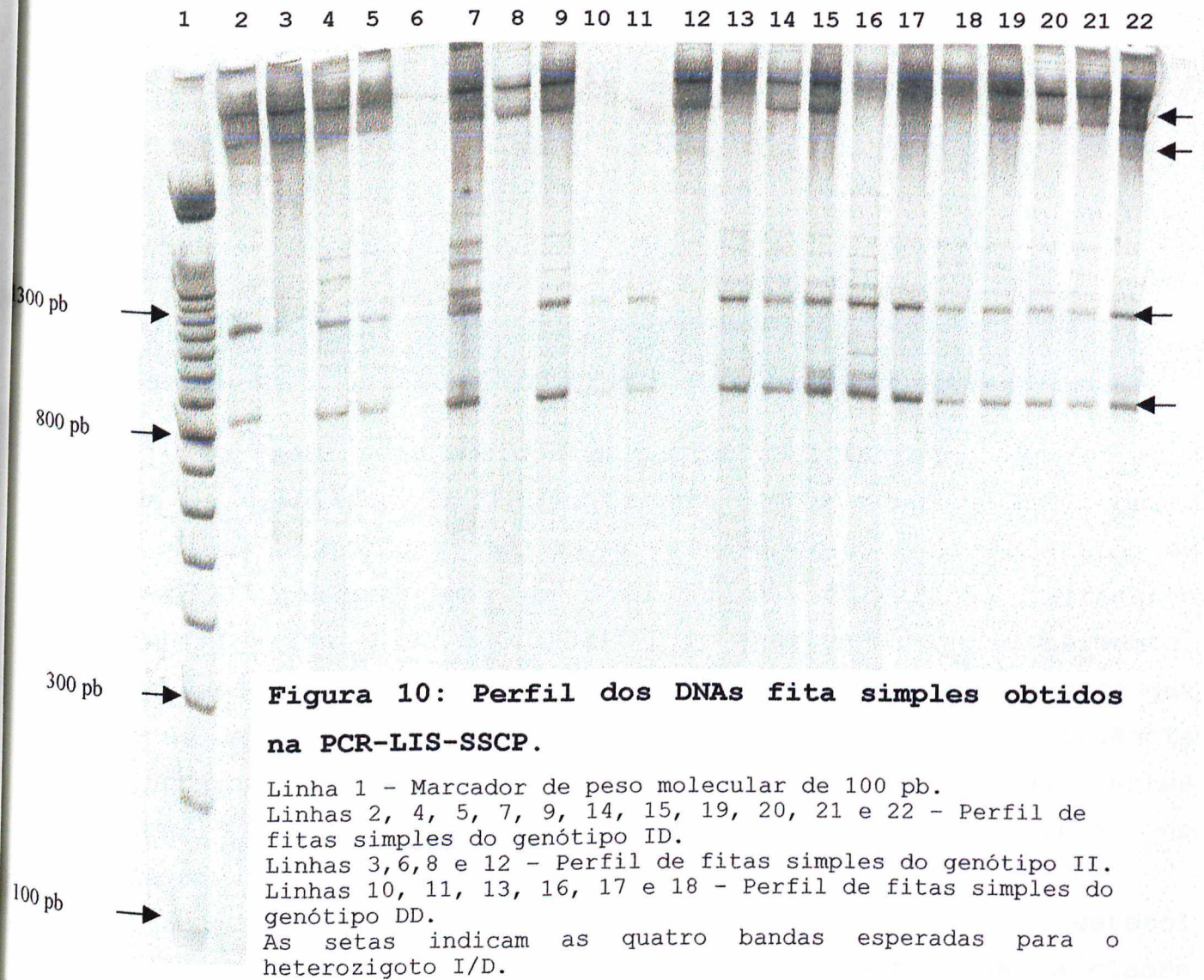
O procedimento para obtenção dos produtos amplificados para a investigação de mutações no intron 16 do gene polimórfico da ECA I/D, foi o mesmo para a determinação do genótipo do polimorfismo da ECA I/D. Os pacientes utilizados na aplicação da técnica do LIS-SSCP fazem parte do conjunto de amostras que serviram para a determinação das proporções genotípicas do gene da ECA, no Brasil. As amostras dos infartados também foram incluídas no experimento.

A maior incidência de mutações entre os introns em relação aos exons (WOLFE *et al.*, 1989) e a ocorrência da inserção de 287 nucleotídeos da ECA provocaram uma dúvida que deve ser esclarecida. Esta dúvida é se realmente esta região foi acometida somente pela inserção dos 287 nucleotídeos da ECA, ou se existe ainda alguma mutação importante, não evidenciada, que funcionaria como mais um fator genético, causador das doenças cardiovasculares.

A revelação do gel de poliacrilamida apresentou, sem variação, duas bandas para os indivíduos homozigotos e quatro para os heterozigotos. Foi utilizado o marcador de 100 pares de bases, ao correr os géis, com o objetivo de verificar se existe repetibilidade da reação e não de determinar o tamanho dos fragmentos, pois sabe-se que fitas simples adquirem conformações espaciais que diminuem o espaço percorrido no gel, e, conseqüentemente, não há correspondência entre a fita simples e os valores apresentados pelos marcadores. Além da determinação da existência ou não de mutação, no fragmento amplificado pelos "primers" do gene da ECA, estas técnicas atingiram um alto grau de especificidade e de precisão. Ao se calcular quantos nucleotídeos foram inseridos na construção de todas as fitas amplificadas, pôde-se chegar à classe dos bilhões de nucleotídeos inseridos especificamente, dos 80 indivíduos avaliados. Os resultados demonstraram que não houve erro da Taq polimerase ao inserir esses nucleotídios. As

bandas do alelo D sempre estacionaram em 820 pares de base (pb) e 1220 pb. (Figura 9).

De acordo com os resultados obtidos concluiu-se que o efeito do genótipo (ECA I/D) se restringe somente à inserção dos 287 pb, eliminando a hipótese da existência de alguma mutação, a qual poderia associar-se ao genótipo da ECA I/D.



CONCLUSÕES

Os resultados obtidos em pacientes infartados demonstraram que os genótipos da ECA juntamente com o receptor AT1, contra os vasos acometidos (uni+bi e tri), o grau de lesão e tipo de lesão, apresentaram um valor de correlação altamente significativa (0,73; $P < 0,01$). E se analisados individualmente, uma menor correlação é obtida (0,58; $p < 0,05$). Isso indica que ambas mutações dos genes da ECA e AT1 têm uma influência sinérgica na ação da AII, provando também que estes genótipos são altamente associados com o grau de comprometimento do infarto.

Os fatores de risco modificáveis, tais como: o colesterol (HDL e LDL), os níveis de triglicérides plasmáticos, a classe de índice massa corporal maior que 25 Kg/m² e a hipertensão não se associaram significativamente com os genótipos da ECA e AT1.

A hipótese da existência de mutações associadas à inserção de 287 pb no polimorfismo da ECA não foi confirmada, demonstrando que o polimorfismo da ECA I/D não possui variação causada por mutação entre os alelos I e D. Foi possível concluir que a técnica PCR-LIS-SSCP tem uma boa repetibilidade, pois em todas as repetições realizadas não ocorreu variação, tanto na amplificação quanto no perfil eletroforético, para a mesma amostra.

As frequências dos genótipos [II (0,2), ID (0,43) e DD (0,37)] da população brasileira, são aproximadamente idênticas ao grupo dos indivíduos infartados [II (0,2), I/D (0,4) e DD (0,4)]. O mesmo ocorreu com a frequência dos alelos I e D que, para a população brasileira, foi estimada em 0,404 e 0,596 respectivamente e para o grupo dos infartados foi 0,392 para o alelo I e 0,608 para o alelo D. Os valores das frequências genotípicas e alélicas dos grupos de infartados e da população brasileira se apresentaram muito próximas.

A associação destes dois marcadores moleculares (ECA e AT1) com a maior gravidade do infarto do miocárdio se deve a aplicação da análise por correlação canônica, que juntamente a outros marcadores num futuro próximo, poderão prevenir o infarto ou mesmo mudar padrões e hábitos de vida, conseqüentemente reduzindo o número de óbitos e aumento a expectativa de vida do ser humano.

BIBLIOGRAFIA

- ARAÚJO MA. 1998. O gene da convertase na aterosclerose coronária e infarto agudo do miocárdio. Tese, **Universidade Federal de Uberlândia**.
- BANNAI M, TOKUNAGA K, LIN L, KUWATA S, MAZDA T, AMAKI I, FUJIKAWA , JUJI T. 1994. Discrimination of human HLA-DRB1 alleles by PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism) method. **Eur J Immunogenet.** 21:1-9.
- BATLOUNI M. 1983. Uso dos antiagregantes plaquetários na insuficiência coronária. **Rev. Port. Cardiol.**, 2:165.
- BEOHAR N, DAMARAJU S, PRATHER A, et al. 1995. Angiotensin-I converting enzyme genotype DD is a risk factor for coronary artery disease. **J Investig Med.** 43: 275-80 .
- BLOEM LJ, MANATUNGA AK, BOATRIGTH E, PRAT JH. 1993. Relation of race and a polymorphism on the angiotensin- I converting enzyme gene to enzyme levels. Hypertension. **Abstract** 22: 407.

- BOHN M, BERGE KE, BAKKEN A, ERIKSEN J, BERG K. 1993. Insertion/deletion (I/D) polymorphism at the locus for angiotensin I-converting enzyme and parental history of myocardial infarction. **Clin Genet.** 44: 298-301.
- BONNARDEAUX A, DAVIES E, JEUNEMAITRE X, FÉRY I, CHARRU A, CLAUSER E, TIRET LAURENCE, CAMBIEN F, CORVOT P, SOUBRIER F. 1994. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. **Hypertension** 24:63-69.
- BOULANGER C & LURCHER TF. 1990. Release of endothelin from the porcine aorta; Inhibition of endothelium-derived nitric oxide. **J Clin Invest.** 85:587-590.
- BRAY GA. 1992. Pathophysiology of obesity. **Am J Clin Nutr.** 55: 2540-5.
- BRUNZELL JD, SNIDERMAN AD, ALBERS JJ, KWITEROVICH PO. 1981. Apoproteins B and A1 in coronary artery disease in human. **Arteriosclerosis,** 4:79.
- CAMBIEN F, COSTEROUSSE O, TIRET L, et al., 1994. Plasma level and gene polymorphism of angiotensin-converting enzyme in relation to myocardial infarction. **Circulation.** 90: 669-76.
- CAMBIEN F, POIRIER O, LECERF L, et al., 1992. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. **Nature.** 359: 641-3.
- CASSEL J, HEYDEN S, BARTEL AG et al.,. 1971. Occupation and physical activity and coronary heart disease. **Arch, int. Med.** 128:920.

- CURB JD, REED DM. 1985. Fish consumption and mortality from cardiovascular disease. **N. Engl. J. Med.** 313:821.
- CELERMAJER DS, ADAMS MR, CLARKSON P, ROBINSON J, McCREDIE R, DONALD A, DEANFIELD JE. 1996. Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults. **N Engl J Med.** 334:150-154.
- CHIU AT, HERBLIN WF, McCALL DE, ARDECKY RJ, CARINI DJ, DUNCIA JV, PEASE LJ, WONG PC, WEXLER RR, JOHNSON AL, TIMMERMANS PBMWM. 1989. Identification of angiotensin II receptor subtypes. **Biochem Biophys Res Commun.** 165:196-203.
- DAEMAN MJAP, LANBARDI DM, BOSMAN FT, SCHWARTZ SM. 1991. Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. **Res.** 68:450-456.
- DAHLOF B & HANSSON L. 1992. Regression of left ventricular hypertrophy in previously untreated essential hypertension; different effects of enalapril and hydrochlorothiazide. **J Hypertens.** 10:1513-1524.
- DEMAKIS JG, PROSKEY A, RAHIMTOOLA SH, JAMIL M, SUTTON GC, ROSEN KM, GUNNAR RM, TOBIN JR. 1974. The natural course of alcoholic cardiomyopathy. **Ann Intern Med.** 80:293-297.
- ELLIS et al., 1990. Coronary morphologic and clinical determinants of procedural outcome with angioplasty for multivessel coronary disease. Implications for patient selection. **Circulation.** 82:1193-1202
- ETSUKO M, HIROH S, YOKOYAMA S. 1996. PCR-LIS-SSCP (Low Ionic Strength Polymorphism) - A simple method for high-resolution allele typing of HLA-DRB1, DQB1 e DPB1. **Genome Research.** 6:50-57

- EVANS AE, POIRIER O, KEE F, et al. 1994. Polymorphisms of the angiotensin-converting-enzyme gene in subjects who die from coronary heart disease. **Q J M.** 87: 211-4.
- FABRICANT CG, FABRICANT J, MINICK CR, LITRENTA MM. 1983. Herpesvirus-induced atherosclerosis in chickens. **Fed Proc.** 42:2467-2469.
- FARHY RD, HO KL, CARRETERO AO, SEIELI AG. 1992. Kinins mediate the antiproliferative effect of ramipril in rat carotid artery. **Biochem Biophys Res Commun.** 182:283-288.
- FRIED LP, MOORE RD, PEARSON TA. 1986. Long-terms effects of cigarette smoking and moderate alcohol consumption on coronary artery diameter. Mechanisms of coronary artery disease independent of atherosclerosis or thrombosis? **Am J Med.** 80:37
- FURCHGOTT RF & ZAWADZKI JV. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature.** 299:373-376.
- GARDEMANN A, WEIB T, SCHWARTZ O, et al. 1995. Gene polymorphism but not catalytic activity of angiotensin I-converting enzyme is associated with coronary artery disease and myocardial infarction in low-risk patients. **Circulation.** 92(10): 2796-99.
- GRODZICKER T, WILLIAMS J, SHARP P, SAMBROOK J. 1974. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses, Cold Spring Harbor Symp. **Quant Biol.** 39:439-446.
- HABER E. 1995. Angiotensin-converting enzyme and lipoprotein as risk factors in myocardial infarction. **Circulation.** 91:1888-1890.

HINA K, KUSACHI S, IWAKI K, NOGAMI K, MORITANI H, KITA T, TANIGUCHI G, TSUJI. 1993. Progression of left ventricular enlargement in patients with hypertrophic cardiomyopathy: Incidence and prognostic value. **Clin Cardiol.** 16:403-407.

Informe Epidemiológico do SUS, ano II, Nº. 4 de julho/agosto 1993.

JUILLIÈRE Y, GILLET C, DANCHIN N, THOUVENIN A, KARCHER G, PAILLE F, BERTRAND A, BARRUCAND D, CHERRIER F. 1990. Abstention from alcohol in dilated cardiomyopathy: Complete regression of the clinical disease but persistence of myocardial perfusion defects on exercise thallium-201 tomography. **Eur J Nucl Med.** 17:279-281.

JUNQUEIRA LC & CARNEIRO J. **In histologia Básica.** ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 1995, 433p

KANNEL WB. 1981. Update on the role of cigarette smoking in coronary artery disease. **Am Heart J.**, 10:319.

KATSUYA T, KOIKE G, YEE TW, et al. 1995. Association of angiotensinogen gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease. **Lancet.** 345: 1600-3.

KEYS A & SHAPIRO MJ. 1957. Potency of the ductus arteriosus in adults. **Am Heart J.** 25:158.

KREUTZ T, LINDPAINNER K, PFEFFER MA, et al. 1993. Angiotensin-converting enzyme genotype and risk for coronary heart disease. **Circulation.** 88(suppl): I-510.

LEATHAM EW, BATH PM, TOOZE JÁ, CAMM AJ. 1995. Increased monocyte tissue factor expression in coronary disease. **Br Heart J.** 73:10-13.

- LERNER DJ, KNNEL WB. 1986. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: A 26-year follow-up of the Framingham population. **Am Heart J.** 111: 383.
- LINDPAINTNER K, PFEFFER MA, KREUTZ R, et al. 1995. A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. **N Engl J Med.** 332: 706-11.
- LUDWIG E, CORNELI PS, ANDERSON JL, MARSHALL HW, LAOULEL JM, WANT RH. 1995. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with myocardial infarction but not with development of coronary stenosis. **Circulation.** 91:2120-2124.
- LURCHER TF & VANHOUTTE PM. 1990. Endothelium; Modulator of cardiovascular function. Boca Raton, Fla. **CRC Press.**
- MANCINI G, HENRY G, MACAYA C et al. 1996. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. **Circulation.** 94(3): 258-265.
- MATTU RK, NEEDHAM EW, GLATON DJ, FRANGOS E, CLARK AJ, CAULFIELD M. 1995. A DNA variant at the angiotensin-converting enzyme gene locus associates with coronary artery disease in the Caerphilly Heart Study. **Circulation.** 91:270-274.
- MISSOURIS CG, BARLEY J, JEFFERY S, CARTER ND, SINGER DRJ, MACGREGOR GA. 1996. Genetic risk for renal stenosis: association with deletion polymorphism in angiotensin 1-converting enzyme gene. **Kidney Int.** 49:534-537.
- MULLIS KB. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American.** 260 (4):36-43.

- NATHAN C, XIE QW. 1994. Nitric oxide synthases; Roles, tolls end controls. **Cell**. 78:915-918.
- NIETO FJ, ALONSO J, CHAMBLESS LE, ZHONG M, CERASO M, ROMM FJ, COOPER L, FOLSOM AR, SZKLO M. 1995. Population awareness and control of hypertension and hypercholesterolemia: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. **Arch Intern Med**. 155:677-684.
- ORITA M, SUZUKI Y, SEKIYA T, HAYASHI K. 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. **Genomics**. 5:874-879.
- PALMER RM, ASBTON DS, MONCADA S. 1994. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**. 333:664-666.
- PANTEGHINI M, PAGANI F. 1998. Diagnostic value of a single measurement of troponin T in serum for suspected acute myocardial infarction. **Clin Chem**. 40:673-674.
- PAXTON WC, RUNGEM, HORULST C, COHEN C, ALEXANDER RW, BERNSTEIN KE. 1993. Immunohistochemical localization of rat angiotensin II AT1 receptor. **Am J physiol**. 264:F989-95.
- PELC LR, GROSS GJ, WARLTIER DC. 1991. Mechanisms of coronary vasodilatation produced by bradykinin. **Circulation**. 83:2048-2056.
- PESONEN E, KAPRIO E, RAPOLA J, SOVERI T, OKSANEN H. 1981. Endothelial cell damage in piglet coronary artery after administration of *E. coli* endotoxin. **A scanning and transmission electron microscopic study atherosclerosis**. 40:65-73.

- PORTO CC. **Aterosclerose coronariana.** In Doenças do Coração prevenção e tratamento. ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. cap 113, 1988, 568p
- POWELL JS, CLOZEL JP, MULLER RKM. 1989. Inhibitors of antiotensin- converting enzyme myointimal proliferation after vascular injury. **Science.** 245:186188.
- PREEDY VR, RICHARDSON PJ. 1996. Alcoholic cardiomyopathy: Clinical and experimental pathological changes, Herz:241-247.
- RAMALHO M, SANTOS JB, PINTO CB. **In Genética na agropecuária** 2°ed. São Paulo, 1989.359P.
- REIDY MA, BOWYER DE. 1978. Distortion of endothelial repair. The effect of hypercholesterolaemia on regulation of aortic endothelium following injury by endotoxin. **A scanning microscopy study Atherosclerosis.** 29:459-466.
- REPOPORT RM, DRAZNIN MB, MURAD F. 1983. Endothelium dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. **Nature.** 306:174-176.
- RIGAT B, HUBERT C, ALHENE-GELAS F, CAMBIEN F, CORVOL P, SOUBRIER F. 1990. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme leves. **J Clin Invest.** 86: 1343-6.
- RIGAT B, HUBERT C, CORVOL P, SOUBRIER F. 1992. PCR detection of the insertion/delection polymorphism of the human angiotensin-converting enzyme gene (DCP 1). **Nucleic Acids Res.** 20: 1433.

- ROSS MH, Rowrell Lj. Histologia texto e atlas 2°ed. São Paulo: **Panamericana**. 1993 779p.
- RUIZ J. BLANCHE H, COHEN N, et al. 1994. 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 USA**. 91: 3662-5.
- RYAN T J, et al. 1996. Management of acute myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol**. 28: 1328-428.
- SAIKI KB, GYLLENSTEN UB & ERLICH HÁ. 1988. In genome analysis: A practical approach (ed. KE Davies), p. 141. IRL. **Press at Oxford University press, Oxford**.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANITIS, T. 1989. Molecular cloning. 2nd ed.. Cold Spring, New York: Cold Spring Harbor **Laboratory Press, E.U.A.**
- SCANDINAVIAN SIMVASTATIN SURVIVAL STUDY GROUP. 1994. Randomised trial of cholesterol lowering in 4,444 patients with coronary heart disease: The Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). **Lancet**. 344:1383-1389.
- SEILER C, JENNI R, VASSALLI G, TURINA M, HESS OM. 1995. Left ventricular chamber dilatation in hypertrophic cardiomyopathy: Related variables and prognosis in patients with medical and surgical therapy. **Br Heart J**. 74:508-516.
- SHANMUGAN V, SELL KW, SAHA BK. 1993. Mistyping ACE heterozygotes. **PCR Methods Appl**. 3:120-121.

SINGER D, MISSOURIS C, JEFFERY S. 1996. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism. What to do about all the confusion? **Circulation**. 94:36-9.

TAKANAYANAGI R, OHNA K, SAKAI Y, NAKAO R, YANASE T, HAJI M, INAGAMI T, FURUTA H, GOU DF, NAKAMUTA M, NAWATA H. 1992. Molecular cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding human type-1 angiotensin II receptor. **Biochem Biophys Res commun**. 183:910-16.

TIMI STUDY GROUP. The Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) Trial Phase I Findings. **N Engl J Med** 1985; 312(14): 932-36.

TIRET L, KEE F, POIRIER O, et al. 1993. Deletion polymorphism in angiotensin-converting enzyme gene associated with parental history of myocardial infarction. **Lancet**. 341:991-992.

TIRET L, BONNARDEAUX A, POIRIER O, et al. 1994. Synergistic effects of angiotensin-converting enzyme and angiotensin-II type1 receptor gene polymorphisms on risk of myocardial infarction. **Lancet**. 344: 910-4.

TSCHUDI M, RICHARD V, BUHLER FR, LURCHER TF. 1991. Importance of endothelium-derived nitric oxide in porcine coronary resistance arteries. **Am J Physiol**. 260:H13-H20.

UNGAR DP & PINHO JR. 1996. O polimorfismo ACE/ID: um fator de risco independente para infarto do miocárdio em indivíduos considerados de baixo risco. **NewsLab**. Ano IV - n. 18, p. 144.

- URBANO-MARQUEZ A, ESTRUCH R, NAVARRO-LOPEZ F, GRAU JM, MONT L, RUBIN E.1989. The effects of alcoholism on skeletal and cardiac muscle, **N Engl J Med.**320:409-415.
- WALD N, IDLE M, SMITH PG, BAILEY A. 1977. Carboxyhaemoglobin levels in smoke of filter and plain cigarettes. **Lancet.** i:110.
- VALLANCE P, LEONE A, CALVER A, COLLIER J, MONCADA S. 1992. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. **Lancet.** 339:572-575.
- WIEMER G, SCHOLKENS BA, BECKER RHA, BUSSE R. 1991. Ramiprilat enhances endothelial autocoid formation by inhibiting breakdown of endothelium derived bradykinin. **Hypertension.** 18:558-563.
- WOLFE KH, SHARP PM , LI WH. 1989. Rates of synonymous substitution in plant nuclear genes. **J Mol Evol.** 29:208-211
- WYMAN AR & WHITE R. 1980. A highly polymorphic locus in human DNA. **Proc Natl Acad Sci. USA.** 77:6754-6758.

FU-00010106-4