

Análise da tendência temporal de dano renal agudo entre pacientes graves conforme polimorfismos I/D e -262A > T da enzima conversora da angiotensina

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

Autores

José Alberto Rodrigues Pedroso¹

Diego d'Avila Paskulin²

Fernando Suparregui Dias³

Everaldo de França⁴

Clarice Sampaio Alho⁵

¹Programa de Transplante Renal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e Hospital de Pronto Socorro (HPS) de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

²Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brasil

³Unidade de Terapia Intensiva (UTI) Geral do Hospital São Lucas (HSL) da PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil

⁴Escritório de Transferência de Tecnologia da PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil

⁵Faculdade de Biociências da PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil

Data de submissão: 04/12/2009

Data de aprovação: 11/02/2010

Correspondência para:

Faculdade de Biociências – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)
Av. Ipiranga, nº 6.681, P12, 2º andar, Partenon – Porto Alegre – RS – Brasil
CEP: 90619-900
Tel.: (51) 3320-3568
E-mail: jose-pedroso@uol.com.br

Suporte financeiro:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo # 505536/2004-8); Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – Programa de Bolsa/Pesquisa para Alunos da Graduação (edital Pibic/CNPq/PUCRS, 2005)..

Declaramos a inexistência de conflitos de interesse.

RESUMO

A síndrome de disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (DMOS) e a disfunção renal aguda compartilham muitos dos fatores fisiológicos envolvidos em seu desenvolvimento. Estudos recentes correlacionam suscetibilidades individuais, determinadas geneticamente, à disfunção de órgãos em pacientes criticamente enfermos, situação em que o gene da enzima conversora da angiotensina (ECA) poderia ser um candidato para elucidar predisposição ou risco genético. Nosso objetivo foi examinar os efeitos da presença de dois polimorfismos, I/D e -262A > T, na disfunção renal em pacientes agudamente graves do Sul do Brasil. O escore SOFA (*sequential organ failure assessment*) à admissão e a tendência da função renal (medida pelo escore renal diário do SOFA) foram determinados em pacientes de unidade de terapia intensiva (UTI). Um total de 153 pacientes adultos (79 homens) foi incluído no estudo. Houve monitoração diária da função renal durante toda a permanência na UTI e também pós-UTI. Observou-se a progressão para insuficiência renal (SOFA 3 e 4) nos primeiros sete dias de internação em UTI, bem como necessidade de diálise. As frequências genotípicas gerais em nossa amostra foram II = 0,17; ID = 0,46; DD = 0,37; e AA = 0,30; AT = 0,55; TT = 0,15; e as frequências alélicas foram I = 0,40, D = 0,60; e A = 0,56; T = 0,44. Este é o primeiro estudo para verificar a influência de polimorfismos I/D e -262A > T da ECA em disfunção renal aguda em pacientes críticos. Nenhuma associação significativa foi encontrada entre os genótipos ou as frequências alélicas e a evolução da função renal. Os polimorfismos I/D e

ABSTRACT

Multiple organ failure syndrome and acute renal dysfunction share many of physiologic factors involved in their development. Recent studies correlate the susceptibility to organ dysfunction in critically ill patients with genetic inheritance. Many of them consider ACE gene could be a possible candidate to elucidate a genetic predisposition or a genetic risk factor. We aimed to examine the effects of I/D and -262A > T ACE polymorphisms in the renal function in severely ill southern Brazilians patients. A multi-organ worldwide known failure score, the SOFA (*sequential organ failure assessment*), was used to determine the basal health state at first day (ICU admission). Considering admission SOFA score and trend of renal function (measured by daily renal SOFA scores, with daily measure of serum creatinine and diuresis), we hypothesize that ACE polymorphisms could influence in the trend of renal function in ICU patients. A total of 153 critically ill adult patients (79 men) were included in this study. We monitored the patients daily during their entire ICU and post-ICU (hospital) stay (measured from the ICU admission day to a maximum of 224 days). We observed progression to renal failure (SOFA scores 3 and 4) in first seven days of ICU stay and need for dialysis. The general genotypic frequencies in our sample were II = 0.17; ID = 0.46; DD = 0.37 and AA = 0.30; AT = 0.55; TT = 0.15, and the allelic frequencies were I = 0.40; D = 0.60 and A = 0.56; T = 0.44. This is the first study to verify the influence of I/D and -262A > T ACE polymorphisms in acute renal dysfunction among critically ill patients. No significant association was

-262A > T da ECA não têm impacto significativo sobre a evolução da função renal durante a primeira semana de internação na UTI nem exercem qualquer influência sobre a mortalidade em pacientes graves.

Palavras-chave: polimorfismo genético, insuficiência renal aguda, sistema renina-angiotensina.

[J Bras Nefrol 2010;32(2):182-194]©Elsevier Editora Ltda.

found between genotypes or allele frequencies and the trend of the renal function. The I/D and -262A > T ACE polymorphisms have no significant impact on the trend of renal function during the first week of ICU stay, neither any influence in mortality in critically ill patients.

Keywords: genetics medical, acute kidney failure, renin-angiotensin system.

INTRODUÇÃO

Pacientes críticos em unidade de terapia intensiva (UTI) apresentam com frequência lesão renal aguda, que se caracteriza por uma redução abrupta na função renal, desenvolvendo-se nesses pacientes em virtude de condições associadas à alta mortalidade.¹ Atualmente, a insuficiência renal da disfunção de múltiplos órgãos é considerada uma causa de mortalidade, e não apenas um epifenômeno. Trata-se de um fator de risco independente para mortalidade.^{1,2} O desequilíbrio ácido-básico e os efeitos da resposta inflamatória estão associados à permanência prolongada no hospital e na UTI.³ Como parte da síndrome de disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (DMOS), a disfunção renal aguda apresenta os mesmos fatores fisiológicos envolvidos em seu desenvolvimento.⁴ A vasoconstrição renal é causada por um desequilíbrio entre substâncias vasoativas sistêmicas e locais, com alterações na hemodinâmica glomerular. A vasoconstrição renal pode levar à insuficiência renal aguda (IRA) meramente hemodinâmica, com redução da taxa de filtração glomerular, ou à necrose tubular aguda, provavelmente causada por insuficiência sistêmica hemodinâmica e por mediadores inflamatórios.⁵ Apesar da melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos, as taxas de mortalidade persistem elevadas.⁴

Na sepse, há uma intensa produção de citocinas pró-inflamatórias envolvidas na DMOS. Considerando-se a repercussão clínica do controle microvascular, fatores que modifiquem o adequado desempenho da função vascular e endotelial podem levar a alterações hemodinâmicas ou vasculares que interferem na recuperação dos pacientes sépticos.⁶ O sistema renina-angiotensina-aldosterona e o sistema nervoso simpático são ativados durante o choque endotóxico (séptico), com consequente aumento na atividade da renina plasmática e na vasoconstrição renal.⁵

A suscetibilidade individual à disfunção de órgãos em pacientes críticos pode estar relacionada com a herança genética.⁷⁻¹⁰ Variação polimórfica em genes humanos pode resultar em modificações estruturais ou regulatórias que podem alterar muitas funções metabólicas. A enzima conversora da angiotensina (ECA) tem um papel potencial na homeostase, incluindo efeitos no tônus vascular, permeabilidade, sobrevivência da célula epitelial e ativação de fibroblastos.¹¹ Demonstrou-se que um polimorfismo de inserção/deleção (I/D) no gene ECA (*locus* 17q23) afeta o prognóstico renal em algumas condições patológicas.¹² A atividade da ECA pode ser geneticamente modulada por um polimorfismo I/D de 287 pares de base no íntron 16 do gene ECA.^{12,13} Estudos usando o polimorfismo I/D do gene ECA mostraram um efeito de dose do alelo D como um fator de risco genético para disfunção circulatória e vasoconstrição,¹⁴⁻¹⁸ mas outros autores relataram resultados controversos ou não descreveram qualquer associação significativa.¹⁹⁻²⁵ Acredita-se que esse polimorfismo intrônico (não codificante) possa ser um marcador para outro(s) *locus* (ou *loci*) genético(s) com mais significado funcional. Haplotipagem extensa da região avaliou a região promotora e alguns éxons.^{11,26} A transição A > T (-262A > T) localizada dentro da região 5'UTR (que modula a capacidade de translação em eucariotas) é outro polimorfismo estudado no gene ECA, com alguns relatos publicados sobre sua influência em doenças humanas, mas nenhum ainda a respeito da influência na função renal.²⁷⁻³⁶ A creatinina sérica, a diurese e o uso de vasopressores na UTI são importantes indicadores de IRA ou de predisposição a essa disfunção.² Tais variáveis podem ser medidas por meio de um escore de falência de múltiplos órgãos, o escore SOFA (em inglês, *sequential organ failure assessment*).³⁷ Considerando-se o escore SOFA da admissão e a tendência da função renal (medida por escores SOFA renais diários), elaboramos a hipótese

de que polimorfismos da ECA podem influenciar na tendência da função renal em pacientes de UTI. O objetivo do estudo foi examinar os efeitos dos polimorfismos I/D e -262A > T do gene ECA na evolução da disfunção renal em pacientes críticos.

PACIENTES E MÉTODOS

Desenho do estudo e critérios de inclusão/exclusão. Trata-se de estudo transversal de pacientes críticos internados na UTI geral do Hospital São Lucas (HSL), da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), entre 1.º de maio e 28 de novembro de 2002, e entre 1.º de janeiro e 30 de junho de 2005. Cada paciente foi convidado individualmente a participar do estudo e forneceu termo de consentimento informado. Um membro da família assinou o termo de consentimento quando o paciente estava inconsciente ou sem condições de fazê-lo. O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS aprovou o estudo (protocolos # 05-02357 e # 03-01732).

SELEÇÃO DE PACIENTE

Todos os pacientes eram do Sul do Brasil. Todos os profissionais que cuidavam dos pacientes estavam envolvidos de maneira cega no processo de seleção e nos resultados de genotipagem. Os seguintes pacientes não eram elegíveis: menores de 18 anos; com diagnóstico de infecção pelo HIV (vírus da imunodeficiência humana); grávidas; lactantes; ou em uso de imunossuppressores.

POLIMORFISMOS SELECIONADOS

O gene ECA é responsável pela síntese da enzima de conversão da angiotensina. Localiza-se no *locus* 17q23 e interfere na modulação da função vascular sistêmica, com repercussão orgânica de algumas doenças.^{38,39} Muitos polimorfismos do gene ECA foram descritos, sendo o mais frequente o polimorfismo inserção/deleção (I/D).¹³ Tal polimorfismo consiste na presença (alelo I) ou ausência (alelo D) de um fragmento 287 bp Alu dentro do íntron 16 do gene ECA. Embora I/D represente um polimorfismo intrônico, há muitos estudos que descrevem uma correlação com com a herança isolada ou intra-haplótipo que poderia explicar parte da variabilidade total da atividade da enzima ECA e algumas condições clínicas.^{26,28,40}

Os possíveis genótipos para o polimorfismo I/D do gene ECA são II, ID ou DD. O polimorfismo -262A > T do gene ECA é um polimorfismo de nucleotídeo único (em inglês, SNP), primeiro identificado por Villard *et al.*, em 1996,⁴⁰ e originalmente descrito como -240A > T. Zhu *et al.*²⁸ mudaram a nomenclatura para -262A > T e sugeriram um novo nome, polimorfismo ECA 4,

para clareza entre os outros polimorfismos considerados em sua análise. Alguns estudos usam a nomenclatura A-239T41. Os genótipos possíveis para o SNP -262A > T do gene ECA são AA, AT ou TT.

COLETA DE DNA

Em um sistema estéril com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), uma amostra de 5 mL de sangue foi coletada de cada paciente à admissão na UTI e mantida refrigerada a 4° C ou congelada a -20° C até a extração de DNA. O DNA genômico foi isolado de leucócitos por meio de procedimentos padronizados e mantido no freezer (-20° C), como descrito por Lahiri e Nurnberger.⁴²

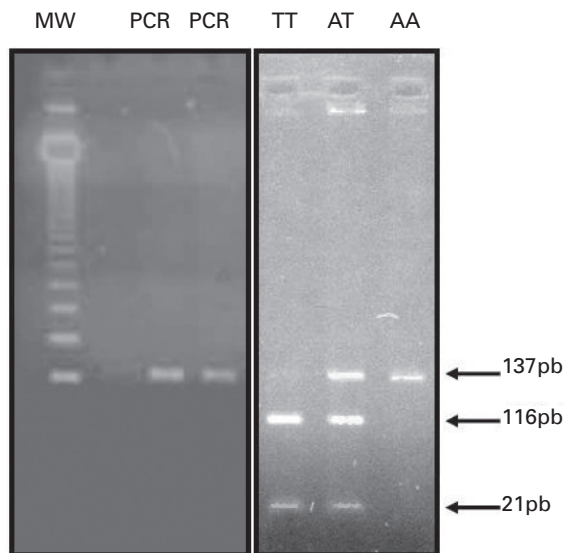
GENOTIPAGEM

Protocolos de genotipagem para determinação do íntron 16 do polimorfismo I/D do gene ECA foram previamente descritos por Rigat *et al.*¹³ O polimorfismo I/D bialélico do gene ECA foi determinado de acordo com o método PCR-AFLP. A reação em cadeia da polimerase foi realizada em um volume total de 25 µL com 10-100 ng de DNA genômico, 2,5 U Taq DNA polimerase em tampão Taq (Invitrogen-Life Technologies, São Paulo, SP, Brasil), e a concentração final de cada dNTP (desoxirribonucleotídeo trifosfatado) foi 0,2 mmol/L e 2 mmol/L MgCl₂. O polimorfismo I/D ECA foi amplificado usando-se 0,4 pmol de cada *primer sense*, 5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3', e *antisense*, 5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T-3' (sintetizado por Invitrogen-Life Technologies, São Paulo, SP, Brasil), em uma termocicladora PTC-100 (MJ Research, Watertown, MA, EUA), como se segue: desnaturação inicial a 94° C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos a 94° C por 1 minuto, 60° C por 1 minuto, 72° C por 1 minuto e extensão final por 5 minutos. O genótipo foi determinado por eletroforese de segmentos amplificados de DNA em gel agarose a 1,5%, considerando-se que o alelo I amplificou um segmento de 480 bp; e o alelo D, um de 190 bp. A sequência de 16 genes do íntron da ECA e os dois alelos I/D estão registrados na base de dados EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) como GI 28921 (número de acesso no GenBank, X62855). O polimorfismo -262A > T do gene ACE foi amplificado usando-se 0,3 pmol de cada *primer forward*, 5'-TCG GGC TGG GAA GAT CGA GC -3', e *primer reverse*, 5'-GAG AAA GGG CCT CCT CTC TCT-3' (sintetizado por Invitrogen-Life Technologies, São Paulo, SP, Brasil), em que o nucleotídeo sublinhado representa um deliberado *mismatch* de *primer* designado a introduzir um sítio de restrição artificial. A reação em cadeia da polimerase foi realizada em um volume total de 30 µL com 10-100 ng de DNA genômico, 1,7 U

Taq DNA polimerase em tampão Taq (Invitrogen-Life Technologies, São Paulo, SP, Brasil), e a concentração final de cada dNTP foi 0,2 mmol/L e 2 mmol/L MgCl₂. A amplificação foi feita usando-se a mesma termocicladora mencionada antes, como se segue: desnaturação inicial a 94° C por 5 minutos, seguida por 40 ciclos a 94° C por 1 minuto, 63° C por 25 segundos e 72° C por 10 segundos. A extensão final foi prolongada para 5 minutos a 72° C. O produto amplificado PCR 137 bp (20 µL) foi clivado em um tampão apropriado com 10U de XbaI (5'-T/CTAGA-3'; Gibco BRL®-Life Technologies™, Rockville, MD, EUA), em um volume total de 25 µL a 37° C por 3 horas.

Posteriormente, os produtos da restrição foram submetidos à eletroforese em gel agarose a 3%, corados com brometo de etídio e visualizados com transiluminador UV para determinar os genótipos AA (fragmento 137 bp); AT (fragmentos 137 pb, 116 pb e 21 pb); TT (fragmentos 116 pb e 21 pb) (Figura 1). Para confirmar que o produto amplificado PCR 137 bp realmente representa um produto almejado, realizamos a análise da sequência em sequenciador de DNA capilar MegaBase 1000 (Amersham Biosciences, Chalfont St. Giles, Bucks, UK), também usando os *primers* designados (*forward* e *reverse*). A sequência obtida foi submetida ao nucleotídeo-nucleotídeo

Figura 1. Imagem de eletroforese de uma amostra representativa em gel agarose a 3%.



MW: padrão de bandas de um marcador de peso molecular de 123 bp (Gibco BRL®-Life Technologies™, Rockville, MD, EUA); PCR: produto amplificado com 137 bp; TT: padrão de bandas para homocigoto TT (fragmentos 116 pb e 21 pb); AT: padrão de bandas para heterocigoto (fragmentos 137 bp, 116 pb e 21 pb); AA: padrão de bandas para homocigoto AA (fragmento 137 bp). A escala dos fragmentos encontra-se à direita.

BLAST em alinhamento linear (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) com os bancos de dados, e identificamos consenso com o gene ECA Homo sapiens, região promotora (número de acesso no GenBank, AF229986) e a sequência exportada do cromatograma. O alinhamento foi visualizado no programa ClustalX (versão 1.8, como descrito por Thompson *et al.*,⁴³ em <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>), em modo de alinhamento múltiplo, com sequências carregadas no formato FASTA.

SUJEITOS ESTUDADOS

Um total de 153 pacientes adultos críticos (79 homens e 77 mulheres) admitidos na UTI do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul foram incluídos neste estudo. Monitoramos os pacientes diariamente durante sua permanência na UTI e após a UTI, o que resultou em medidas a partir da admissão na UTI até o máximo de 224 dias. Esse grupo de pacientes adultos críticos foi parcialmente descrito antes por D'Avila *et al.*⁴⁴

DADOS CLÍNICOS

A disfunção foi avaliada usando-se o escore SOFA obtido nos primeiros sete dias de internação na UTI.^{37,45} O escore SOFA é um preditor de risco de UTI usado no mundo todo, tendo já obtido significativo desenvolvimento, validação e refinamento durante a última década e sido empregado para ajustar o risco de pacientes com doenças mais longas e mais graves (por exemplo, sepse ou insuficiência respiratória aguda). O escore descreve disfunção ou insuficiência de órgãos. A seguir, listamos os seis sistemas avaliados e suas respectivas condições clínicas de interesse obtidos para determinar esse escore: função cardiovascular (pressão arterial sistólica e diastólica, uso de vasopressores); função hepática (níveis de bilirrubina sérica); função respiratória (PaO₂, FiO₂); função neurológica (escore de coma de Glasgow); função da coagulação (contagem de plaquetas); e função renal (níveis séricos de creatinina, débito urinário). O escore SOFA total para um paciente é obtido pela soma de escores de seis sistemas (cada um com valores variando de 0 a 4), o que resulta em um número que varia de 0 a 24. Para todos os sistemas, quanto maior o escore, pior a função do órgão específico, sendo que um escore SOFA total maior é preditor de maior taxa de mortalidade na UTI. Para comparar a disfunção renal, aplicamos os seguintes valores do escore SOFA renal: escore 0 para níveis séricos de creatinina inferiores a 1,2 mg/dL (110 µmol/L); escore 1 para creatinina sérica de 1,2-1,9 mg/dL (110-170 µmol/L); escore 2 para creatinina sérica de 2,0-3,4 mg/dL

(171-299 $\mu\text{mol/L}$); escore 3 para creatinina sérica de 3,5-4,9 mg/dL (300-440 $\mu\text{mol/L}$) ou oligúria (diurese de 24 horas < 500 mL); e escore 4 para creatinina > 5,0 mg/dL (300-440 $\mu\text{mol/L}$) ou anúria (diurese 24 horas < 200 mL). Escolhemos o escore SOFA para estabelecer comparações da disfunção renal entre os grupos em vez de usar índices laboratoriais (como creatinina ou ureia, por exemplo), pois, em alguns casos, uma mera medida sérica daquela análise bioquímica não reflete o real estado da disfunção renal. Esse é o caso de pacientes em tratamento dialítico, nos quais medidas isoladas de creatinina ou ureia sérica refletem o efeito do *clearance* da máquina mais o *clearance* renal, mas não refletem diretamente o comprometimento da função renal. Utilizamos o escore SOFA para medir a disfunção renal, pois consideramos ser o mais preciso e informativo.

REPRESENTAÇÃO MATEMÁTICA DA TENDÊNCIA DO SOFA RENAL EM UMA SEMANA

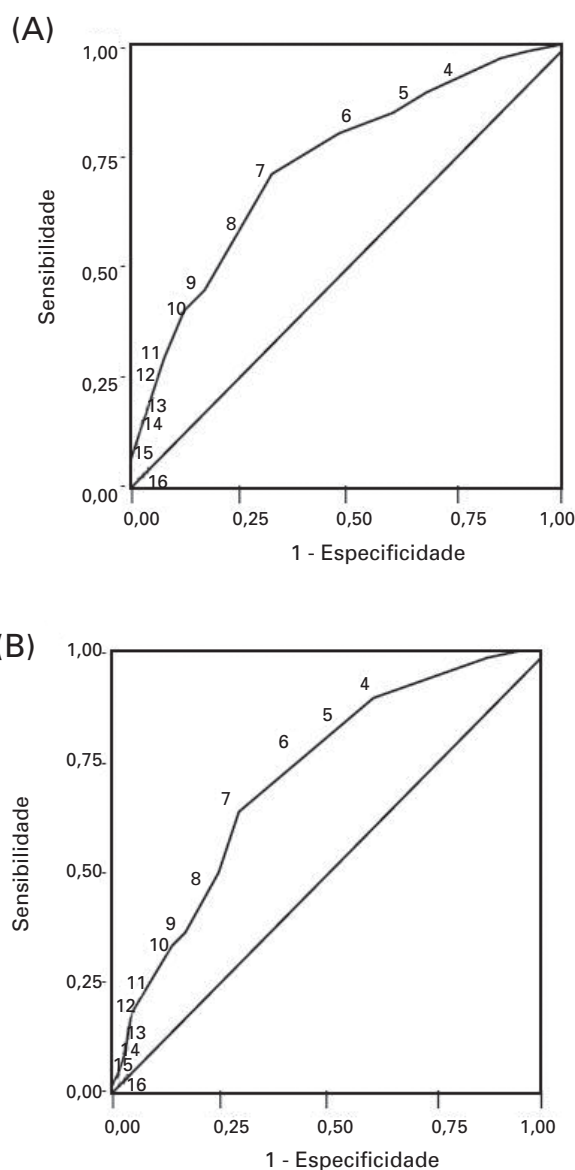
Obteve-se para cada paciente a tendência temporal da função renal considerando-se a evolução do escore SOFA renal desde o primeiro até o sétimo dia de observação (ou antes, se a permanência na UTI foi menor do que sete dias). Plotaram-se os resultados dos escores (y) *versus* o tempo (x), e obteve-se a tendência linear para cada paciente usando-se o programa Microsoft® Excel. A equação matemática para a linha reta é $y = Ax + B$, em que A é o declive e B é uma constante que representa a elevação. O coeficiente A foi usado como indicador da tendência da função renal ao longo do tempo. Valores positivos de A indicam escore SOFA renal progressivamente crescente ao longo dos sete dias de observação, o que significa uma evolução desfavorável. Por outro lado, valores negativos de A representam uma linha descendente, denotando uma tendência de recuperação da função renal (evolução favorável) ao longo do tempo. A ausência de modificações no escore SOFA renal ao longo da semana sugere que o valor de A é zero.

GRUPOS PARA COMPARAÇÃO

Sendo um escore prognóstico, há consenso de que o escore SOFA total no primeiro dia pode prever mortalidade, mas não há consenso quanto ao valor que representa o ponto de corte ideal (de 0 a 24). Como diferentes populações são consideradas nos estudos publicados,⁴⁶ um viés de seleção pode levar a diferentes pontos de corte em diferentes estudos. Assim, em nosso estudo, determinamos o limiar ideal com base em critérios de maiores sensibilidade e especificidade. Realizamos a determinação de previsão de mortalidade com a área sob a curva ROC (*receiver operating characteristic*) e observamos uma discriminação consistente de mortalidade na UTI

ou hospitalar com o escore SOFA total no primeiro dia, com quase a mesma área sob a curva para os dois desfechos (mortalidade na UTI ou no hospital, $0,73 \pm 0,04$; $p < 0,001$). A melhor combinação de sensibilidade com especificidade para prever desfecho de morte foi obtida com o escore 7 no SOFA total no primeiro dia. Menor frequência de mortes foi observada no grupo com escores inferiores a 7 e pior prognóstico quando o escore SOFA total no dia da admissão foi igual a 7 ou maior do que 7 (Figura 2).

Figura 2. Curva ROC para o escore SOFA total do primeiro dia.



Sensibilidade e especificidade de mortalidade em UTI (A) e hospitalar (B) (os segmentos diagonais são produzidos pela união dos pontos).

Os grupos para comparação foram escolhidos considerando-se o seguinte: (1) o escore SOFA renal total do primeiro dia (admissão); e (2) a tendência do escore SOFA renal ao longo dos sete primeiros dias. Quatro grupos distintos representando quatro tendências evolutivas da função renal na primeira semana de permanência na UTI resultaram no seguinte: (1) Grupo 1: SOFA total no dia da admissão < 7 (bom prognóstico de sobrevivência), com tendência similar para a função renal na primeira semana (estabilidade ou melhora da função renal; coeficiente A = 0); (2) Grupo 2: SOFA total no dia da admissão < 7 (bom prognóstico de sobrevivência), com tendência oposta para a função renal na primeira semana (piora da função renal; coeficiente A > 0); (3) Grupo 3: SOFA total no dia da admissão = 7 (mau prognóstico de sobrevivência), com tendência oposta para a função renal na primeira semana (melhora da função renal, coeficiente A < 0); (4) Grupo 4: SOFA total no dia da admissão = 7 (mau prognóstico de sobrevivência), com tendência similar de função renal na primeira semana (estabilidade ou piora; coeficiente A = 0).

OUTROS DADOS CLÍNICOS

O acompanhamento de nossos pacientes estendeu-se durante o tempo total de permanência no hospital (até 224 dias). Os pacientes foram monitorados durante toda a permanência na UTI e no hospital, com aferição de seus dados clínicos desde o dia da admissão até a alta hospitalar ou morte. Para o diagnóstico de sepse e choque séptico, foram utilizados os critérios do American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference,⁴⁷ incluindo pelo menos dois dos seguintes critérios: febre ou hipotermia (temperatura corporal central > 38°C ou < 36°C); taquicardia (frequência ventricular > 90 bpm); taquipneia ou hiperventilação (> 20 incursões/min ou PaCO₂ < 32 mmHg); leucocitose ou leucopenia. Para avaliar a gravidade da doença, utilizou-se o escore APACHE-II (*acute physiology and chronic health evaluation II*)⁴⁸ obtido no dia da admissão na UTI. Os desfechos clínicos do estudo foram alta hospitalar (sobreviventes) ou morte (não sobreviventes). A mortalidade foi medida em dias até a morte. Para os pacientes com múltiplas internações na UTI durante o período estudado, apenas os dados da primeira internação foram considerados. O delta SOFA renal foi obtido pela simples diferença entre o valor do escore SOFA renal do sétimo dia de permanência na UTI (ou o último dia

de permanência na UTI, se a saída ocorreu antes do sétimo dia) menos o escore SOFA renal do primeiro dia. O Delta SOFA Renal resume a evolução dos escores de SOFA renal, mas não reflete de forma adequada alterações reversíveis ocorridas dentro do período considerado.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os cálculos estatísticos, incluindo análise multivariada, foram realizados com o pacote estatístico SPSS 13 (SPSS, Chicago, Illinois, EUA). A menos que de outra forma especificado, os resultados de variáveis contínuas são expressos como média ± desvio-padrão (DP), e as variáveis categóricas, como porcentagens e frequências. As médias foram comparadas por meio de variância de uma via ou teste de Kruskal-Wallis para variáveis de distribuição não normal. Para os dados categóricos, usaram-se os testes qui-quadrado de Pearson ou exato de Fisher. O teste qui-quadrado de Pearson também foi usado para checar o equilíbrio de Hardy-Weinberg. O método de Kaplan-Meier e a regressão de Cox foram usados na análise de sobrevida.⁶⁹ Todos os valores relatados de p foram bicaudais e considerados estatisticamente significativos quando iguais a 0,05 ou menores. As curvas ROC foram empregadas durante a fase de definição de métodos e seu uso descrito anteriormente.

Financiamento: Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (processo # 505536/2004-8), Programa de Bolsa/Pesquisa para Alunos da Graduação – edital Pibic/CNPq/PUCRS (2005) – e pela Faculdade de Biociências (PUCRS). É parte da dissertação de mestrado de José Alberto Rodrigues Pedroso e recebeu suporte da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

RESULTADOS

DADOS CLÍNICOS

Os grupos diferiram essencialmente quanto à gravidade da doença na admissão (medida pelo escore SOFA total) e à tendência da função renal. Como esperado, o Grupo 1 tinha os pacientes mais jovens (p = 0,018), menores escores APACHE-II (p = 0,001) e menor prevalência de sepse (42,5% *versus* 84% no Grupo 4; p = 0,001) ou choque séptico (17,8%; p = 0,001; Tabela 1). A permanência na UTI foi mais longa no Grupo 4 (p = 0,018). Durante todo o período

observado, a menor prevalência de sepse ocorreu no Grupo 1 e a maior, no Grupo 4 ($p = 0,001$); ao se considerar a primeira semana de permanência da UTI, apenas os Grupos 3 e 4 apresentaram mortes (Tabela 1).

A necessidade de terapia de substituição renal na primeira semana foi maior no Grupo 4 ($p = 0,012$), com sete das nove intervenções ocorrendo nesse grupo (14%). Nove pacientes (5,8%) foram submetidos à terapia de substituição renal durante a permanência na UTI. O método de escolha para os pacientes graves e instáveis foi a hemodiálise venovenosa contínua (sigla em inglês, CVVHD). Apenas um paciente sem sepse foi submetido à hemodiálise intermitente convencional, tendo recuperado a função na primeira semana (Grupo 4). Entre os pacientes com disfunção renal, houve apenas uma morte na primeira semana. Tratava-se de um paciente com sepse abdominal, que teve recuperação parcial da função renal após CVVHD (Grupo 1), mas morreu na primeira semana em virtude de outras complicações (cardiovasculares e hematológicas). Oito de nove pacientes em hemodiálise eram sépticos e foram submetidos à CVVHD (um do Grupo 2; um do Grupo 3; e seis do Grupo 4).

Um deles morreu na primeira semana, os outros sete sobreviveram à primeira semana, mas não resistiram à estada na UTI. Dois dos nove pacientes em

terapia renal substitutiva sobreviveram à permanência na UTI (ambos do Grupo 4).

DADOS GENOTÍPICOS

As frequências de alelos e genótipos não diferiram dos valores esperados por meio do modelo de Hardy-Weinberg para os dois polimorfismos do gene ECA (Tabela 2). Embora uma diferença significativa nas características clínicas tenha sido observada entre os quatro grupos, não houve associação significativa entre as frequências ECA genotípica ou alélica e os grupos, isto é, não houve diferenças estatisticamente significativas nas frequências para genótipos ECA I/D (II, ID ou DD) ou genótipos ECA -262A > T (AA, AT ou TT) nos quatro grupos prognósticos específicos (Tabela 2). Da mesma forma, não houve associação significativa entre os grupos e os genótipos quando os dois polimorfismos foram estudados juntos (Tabela 2). Considerando as frequências alélicas ECA I/D e -262A > T observadas (I = 0,40; D = 0,60; A = 0,56; T = 0,44), as frequências esperadas para os haplotipos seriam: I/A = 0,224; I/T = 0,176; D/A = 0,336; D/T = 0,264, e esses quatro haplotipos podem gerar nove possíveis genótipos duplos. Não houve uma significativa diferença entre o número de pacientes esperado e observado para cada um dos genótipos duplos.

Tabela 1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES SEGUNDO OS GRUPOS

	Grupo 1(i) (n = 73)	Grupo 2(i) (n = 9)	Grupo 3(i) (n = 21)	Grupo 4(i) (n = 50)	Valor de p
Sexo (masculino/feminino) ³	35/38	7/2	14/07	21/29	NS
Idade [anos; média ± DP]*1	51 ± 20,2	64,4 ± 19	62,4 ± 15,8	59 ± 18,3	0,018*
Escore APACHE-II [média ± DP]*1	16,1 ± 6,3	22,2 ± 6,1	25,8 ± 6,1	23,9 ± 7,5	0,001*
Pacientes sépticos [n (%)]2	31 (42,5%)	6 (66,7%)	17 (81%)	43 (86%)	0,001*
Pacientes com choque séptico [n (%)]2	13 (17,8%)	3 (33,3%)	15(71,4%)	35 (70%)	0,001*
Permanência na UTI [dias; média ± DP]1	14,6 ± 11,2	14,7 ± 11,2	16,4 ± 11,6	22,1 ± 16,3	0,018*
Pós-UTI [dias; média ± DP]1	15,2 ± 21,6	18,9 ± 25,7	11,1 ± 21,5	11,6 ± 22,5	NS
Permanência no hospital [dias; média ± DP]1	37,6 ± 26,7	34,6 ± 25,3	42,3 ± 26,5	45,2 ± 28,8	NS
Desfecho na UTI na 1ª semana [morte; n (%)]2	0	0	2 (9,5%)	4 (8%)	NS
Desfecho na UTI [morte; n (%)]2	13 (17,8%)	3 (33,3%)	11(54,2%)	28(56%)	0,001*
Desfecho no hospital [morte; n (%)]2	23 (31,5%)	5 (55,6%)	12(57,1%)	37(74%)	0,001*
Escore SOFA total – 1º dia (0-24) [média ± DP]*1	3,8 ± 1,7	4,9 ± 1,3	10,1 ± 2	9,3 ± 2,2	0,001*
Escore SOFA renal – 1º dia (0-4) [média ± DP]*1	0,1 ± 0,6	2 ± 1,3	1,2 ± 1,2	1,4 ± 1,7	0,001*
Necessidade de diálise na 1.ª semana	0	1 (11,1%)	1(4,8%)	7 (14%)	0,012*

n = número; DP = desvio-padrão da média; APACHE-II = *acute physiology and chronic health evaluation II*; SOFA = *sequential organ failure assessment*; UTI = unidade de terapia intensiva; permanência no hospital = inclui o período antes, durante e depois da permanência na UTI; 1 = Anova 1 via; 2 = teste qui-quadrado; * nível de significância $p < 0,05$ (i). Veja Pacientes e Métodos para a descrição dos grupos.

Tabela 2

FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICA, ALÉLICA E DOS GENÓTIPOS DUPLOS DOS POLIMORFISMOS I/D E -262A > T DO GENE ECA ESTUDADOS NOS GRUPOS 1, 2, 3 E 4

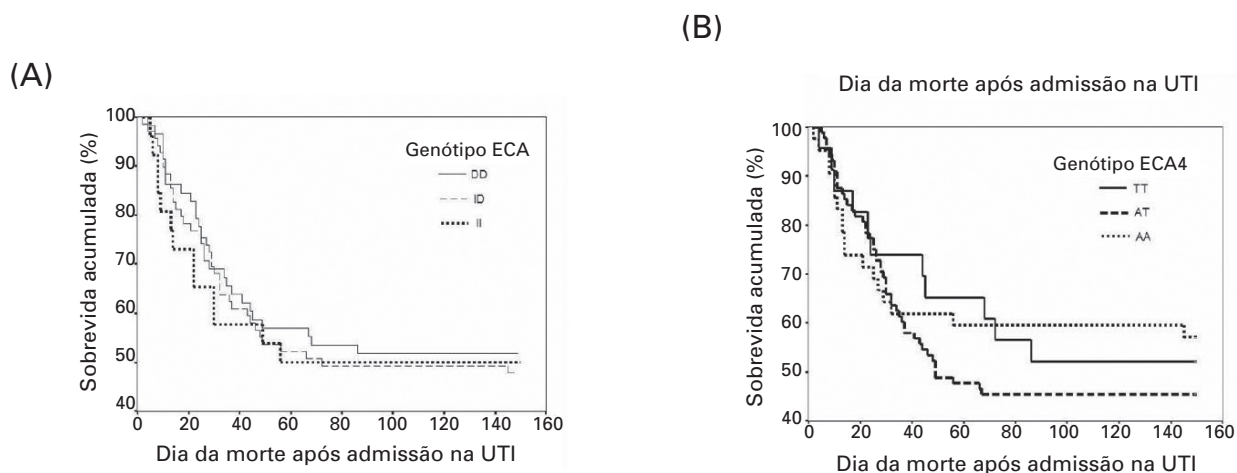
	Grupo 1 (n = 73)	Grupo 2 (n = 9)	Grupo 3 (n = 21)	Grupo 4 (n = 50)	Total (n = 153)	Valor de p*
Genótipos						
II	0,178	0,111	0,190	0,160	0,167	NS
ID	0,452	0,333	0,571	0,420	0,462	
DD	0,370	0,556	0,238	0,420	0,372	
AA	0,301	0,333	0,333	0,200	0,275	NS
AT	0,548	0,222	0,619	0,600	0,575	
TT	0,151	0,444	0,048	0,140	0,150	
Alelos						
I	0,405	0,277	0,476	0,370	0,396	NS
D	0,595	0,723	0,524	0,630	0,604	
A	0,575	0,440	0,640	0,530	0,562	NS
T	0,425	0,560	0,360	0,470	0,438	
Genótipos duplos						
II/AA	0,068	0,111	0,048	0,020	0,052	NS
II/AT	0,096	0	0,143	0,140	0,111	
II/TT	0,014	0	0	0	0,006	
ID/AA	0,178	0,111	0,238	0,140	0,170	
ID/AT	0,233	0	0,333	0,280	0,248	
ID/TT	0,041	0,222	0	0	0,033	
DD/AA	0,055	0,111	0	0,040	0,046	
DD/AT	0,219	0,222	0,190	0,240	0,222	
DD/TT	0,096	0,222	0,048	0,140	0,111	

NS = não significativo; * teste qui-quadrado comparando a frequência de um mesmo genótipo nos diferentes grupos.

RELAÇÕES ENTRE OS ACHADOS CLÍNICOS E OS DADOS GENOTÍPICOS

Considerando-se toda a população estudada (n = 153), realizou-se Anova para comparar as médias do SOFA total no primeiro dia, SOFA renal no primeiro dia, SOFA renal no dia 7 ou no último dia aferido, e o delta SOFA renal com genótipos, alelos ou genótipos duplos para polimorfismos I/D e -262A > T do gene ECA. Não se observou qualquer diferença estatisticamente significativa. No final do período de observação, para os genótipos II, ID e DD, foram observadas 10 (38,5%), 27 (39,1%) e 18 (31%) mortes em UTI, respectivamente (teste do qui-quadrado; p não significativo). Para os genótipos AA, AT e TT, foram observadas 16 (38,1%), 33 (37,5%) e 6 (26,1%) mortes (teste qui-quadrado; p não significativo). Resultados similares foram observados para II, ID e DD, com 13 (50%), 36 (52,2%) e 28 (48,3%) mortes hospitalares, respectivamente (teste qui-quadrado; p não significativo). Para os genótipos AA, AT e TT, resultados similares não significativos foram encontrados para o mesmo estudo estatístico com 18 (42,9%),

48 (54,5%) e 11 (47,8%) mortes, respectivamente. Análise de sobrevida foi realizada considerando-se todas as mortes. Por meio da análise de sobrevida de Kaplan-Meier, de acordo com seus genótipos ECA I/D, houve uma tendência similar para os genótipos ECA I/D e -262A > T (p não significativo; Figura 3). A Figura 4 mostra as curvas de sobrevida Kaplan-Meier para os Grupos 1, 2, 3 e 4. Como esperado pelos resultados descritos na Tabela 1, a taxa de mortalidade aumenta do Grupo 1 ao 4, sendo que o último apresenta as maiores taxas de mortalidade (p < 0,05). Um modelo de regressão de riscos proporcionais de Cox para tempo de sobrevida desde a internação na UTI foi construído incorporando os genótipos de dois *loci* em um modelo geral, como ilustrado na Tabela 3. Gênero, idade, ocorrência de sepse ou de choque séptico, necessidade de diálise e grupos (1 a 4) foram examinados. Os modelos satisfizeram as suposições dos riscos proporcionais (p = 0,0001). Observou-se que apenas idade e ocorrência de choque séptico apresentavam associação estatística com mortes. Não se observou correlação entre os genótipos ECA e os

Figura 3. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para polimorfismos ECA I/D (A) e -262A > T (B).

polimorfismos considerados. A mesma análise também foi realizada excluindo-se os Grupos 1 a 4, mas considerando-se outras variáveis (algumas contribuíram diretamente para o delineamento dos grupos). Uma associação estatisticamente significativa foi observada

com o aumento do risco de mortalidade pelo escore SOFA total no primeiro dia e com um maior delta SOFA (Tabela 3); de novo, nenhuma correlação foi observada com genótipos para os dois polimorfismos ECA considerados (dados não mostrados).

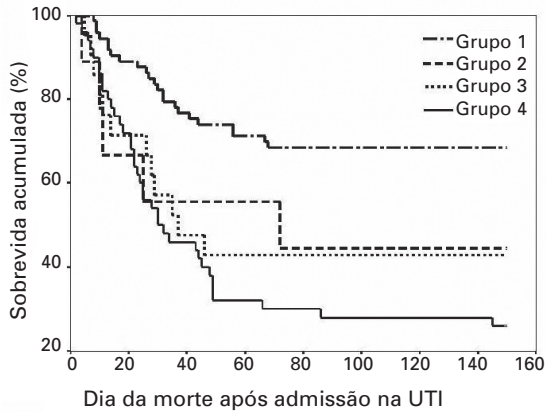
Tabela 3

MODELO DE RISCOS PROPORCIONAIS DE COX PARA MORTALIDADE INCORPORANDO OS POLIMORFISMOS I/D E - 262A > T DO GENE ECA

Variável	Razão de chance	Intervalo de confiança	Valor de p geral ^a
Considerando-se os Grupos 1 a 4			
genótipo ECA I/D (II)*			0,41
ID	1,10	0,53-2,27	0,47
DD	1,39	0,81-2,39	
Genótipo ECA -262A > T (AA)*			0,69
AT	0,77	0,33-1,75	
TT	0,98	0,47-2,05	
Idade (anos)	1,02	1,01-1,04	0,0001
Sexo (masculino)*	1,19	0,71-1,98	0,496
Sepse (negativo)*	0,71	0,33-1,49	0,37
Choque séptico (negativo)*	0,40	0,19-0,84	0,01
Diálise (negativo)*			0,52
CVVHD	0,31	0,03-2,72	
IVVHD	0,38	0,03-3,91	
Sem considerar os Grupos 1 a 4			
Pré-admissão na UTI (dias)	1,02	0,99-1,05	0,051
Permanência na UTI (dias)	0,98	0,96-1,01	0,15
Permanência no hospital (dias)	0,98	0,95-1,01	0,22
SOFA Total (1.º dia)	1,18	1,06-1,31	0,0016
SOFA Renal (1.º dia)	0,99	0,79-1,24	0,97
Delta SOFA (7.o-1.o)	1,36	1,03-1,80	0,03

* Fator de risco listado entre parênteses; a = valor de p geral é para o termo do modelo em geral, e não para categorias individuais; CVVHD = hemodiálise venovenosa contínua; IVVHD = hemodiálise venovenosa intermitente.

Figura 4. Curva de sobrevivência Kaplan-Meier para os Grupos 1, 2, 3 e 4.



DISCUSSÃO

A análise do genoma humano sugeriu que a informação genética podia ser usada como uma ferramenta complementar de prognóstico para muitas patologias graves.^{7,8,50,51} No entanto, alguns genes específicos exercem uma influência maior e mais direta nesse contexto. Ainda que alguns estudos genômicos sejam elaborados para identificar genes, marcadores genéticos ou grupo de genes que conferem suscetibilidade ou resistência a patologias, genótipos específicos não podem ainda prever o fenótipo final, mas apenas detectar a micropredisposição para um fenótipo. Mesmo nesse caso, os estudos tentam identificar suscetibilidades em razão de herança genética ou traço.⁵²⁻⁵⁸ Outros estudos conclusivos exibem várias limitações comuns à abordagem do “gene candidato”. A despeito do grande tamanho de algumas populações estudadas, um grande número de comparações estatísticas se faz necessário para se considerar todas as possíveis interações, o que aumenta a probabilidade de associação significativa.⁵⁹⁻⁶¹ A atividade da ECA é uma etapa de limitação de velocidade para a formação de angiotensina II. Os inibidores da ECA mostraram-se capazes de reduzir a pressão arterial e de desacelerar a progressão das doenças renais, com uma substancial variabilidade interindividual na resposta ao tratamento.⁶² Muitos estudos demonstraram a importância do sistema renina-angiotensina nos distúrbios renais, com repercussões clínicas associadas a níveis séricos de ECA geneticamente modulados ou em virtude de implicações na modulação do sistema farmacológico.^{12,41}

Estudos anteriores avaliaram a associação entre os polimorfismos do sistema renina-angiotensina e a progressão da insuficiência renal secundária a uma variedade de doenças, mas ainda existem várias razões para discrepâncias nos estudos genéticos de progressão. A base genética da insuficiência renal pode ser complexa, sendo provável que vários genes contribuam em conjunto, com genes individuais mostrando pequenos efeitos quantitativos de difícil detecção ou confirmação.⁶³ A diversidade da população estudada pode afetar os resultados de associações genéticas. A relevância de novos estudos reside na avaliação clínica concomitante com fatores de risco genético.⁶³ O mais frequentemente estudado é o polimorfismo I/D. Ele pode modular a resposta renal de inibidores da ECA em termos de função renal em pacientes com diabetes tipo 1¹² e tem também efeitos comprovados na neuropatia do diabetes tipo 2.⁶⁴

Outros estudos descrevem a influência dos polimorfismos ECA como fator de risco para complicações cardiovasculares em pacientes em hemodiálise de longo tempo,⁶⁵ ou efeitos nos níveis de citocinas inflamatórias, modulando sua produção e, conseqüentemente, a inflamação crônica em pacientes em HD.⁶⁶ Poucos estudos descrevem o polimorfismo -262A > T do gene ECA com relação à disfunção renal. Wetmore *et al.* (2006) relataram que um haplotipo ECA específico prediz sobrevivência em pacientes com doença renal avançada, e a maior parte dessa associação foi captada por esse promotor específico de polimorfismo.⁴¹

Pacientes graves internados na UTI requerem monitoração sofisticada que inclui coleta frequente de dados clínicos, fisiológicos e bioquímicos. Qualquer estudo que envolva características clínicas complexas, como as de pacientes de UTI, tem a possibilidade de viés de confusão. Uma estratégia para minimizar isso e padronizar comparações em diferentes países é o uso de escores preditivos. Trata-se de processos amplamente validados de coleta de dados sobre o estado de saúde em UTI com implicações prognósticas.

Ceriani *et al.*⁴⁶ relataram resultados semelhantes aos nossos, demonstrando que as variáveis derivadas do SOFA eram preditoras de mortalidade. Sugeriram que o escore total do primeiro dia representasse as condições do paciente na admissão na UTI e que o delta SOFA pudesse ser usado como uma medida de desenvolvimento de disfunção, o grau de melhora ou falta dela, durante a permanência na UTI. O escore SOFA é mais vantajoso do que o APACHE-II, pois pode ser repetido durante a permanência na UTI, estando diretamente correlacionado com desfechos significativos.

Confirmamos os achados de outros estudos que relacionaram escores SOFA mais altos no primeiro dia com maiores taxas de mortalidade. Em pacientes de UTI, os fatores de risco mais importantes para insuficiência renal aguda (IRA) ou mortalidade decorrente de IRA estão, em geral, presentes na admissão.⁶⁷ Nosso objetivo foi correlacionar a tendência da função renal ao longo da primeira semana de permanência na UTI com genótipos ECA específicos. Para fins de comparação, adotamos a estratégia de identificar grupos de pacientes de acordo com dois fatores: o estado de saúde, no dia da admissão, medido pelo escore SOFA e a tendência da função renal ao longo da primeira semana na UTI. Estávamos interessados nesse pequeno período de observação, uma vez que está relacionado com a causa original da internação na UTI. Após esse período, e, às vezes, antes, muitos outros fatores podem superpor-se em pacientes que necessitam de cuidados intensivos, tais como necessidade de cirurgias e suas complicações; procedimentos diagnósticos; infecções hospitalares em virtude de drenos, tubos ou cateteres; ou ainda uso de antibióticos de largo espectro. Alterações nas funções dos órgãos em pacientes com IRA durante a terapia de substituição renal e sua relação com o desfecho na UTI já foram avaliadas antes. Um estudo recente analisou mudanças no escore SOFA em um intervalo de tempo (delta SOFA), com avaliação desses valores nas primeiras 24 horas do início da terapia de substituição renal, e as relacionou com maior risco de mortalidade precoce durante permanência na UTI.⁶⁸ A formação dos Grupos 1 a 4, com gravidade crescente dos casos, correspondeu aos desfechos biológicos descritos na Tabela 1. Isso reforça o fato de que a disfunção renal está associada à maior morbimortalidade.

Nossos achados do escore SOFA do primeiro dia e do delta SOFA como fatores de risco independentes para o desfecho na UTI já haviam sido descritos na literatura.⁶⁹ A Tabela 2 mostra uma prevalência estatisticamente semelhante de genótipos, haplotipos e alelos nos Grupos 1 a 4 para os dois polimorfismos estudados. Se a herança genética desses polimorfismos tem algum efeito demonstrável na determinação dos escores SOFA ou SOFA Renal, devemos esperar uma prevalência diferenciada deles em grupos específicos, o que não ficou demonstrado. Estudos envolvendo polimorfismos genéticos e condições clínicas em UTI não são tão frequentes. A maioria refere-se a desfechos da síndrome de angústia respiratória aguda (SARA), com o polimorfismo I/D do gene ECA identificado como um significativo fator prognóstico para desfecho de SARA, alguns indicando II como um genótipo protetor⁷⁰ e outros atribuindo ao genótipo DD a responsabilidade

pela suscetibilidade à SARA e pior prognóstico na SARA.¹¹ Até onde sabemos, nenhum estudo investigou antes os polimorfismos I/D e -262A > T do gene ECA e o risco de mortalidade em indivíduos com IRA em UTI. Ainda, em nosso estudo, desenvolvemos uma nova e bem-sucedida estratégia para determinação do polimorfismo de nucleotídeo único -262A > T do gene ECA, para o qual apenas uma etapa de amplificação da PCR é necessária. Outros autores apresentaram a genotipagem SNP -262A > T do gene ECA incluindo obrigatoriamente duas sucessivas amplificações da PCR.^{26,28,40}

CONCLUSÃO

Nosso estudo é o primeiro a tentar fazer uma associação entre os polimorfismos I/D e -262A > T do gene ECA e disfunção renal aguda em pacientes muito graves. Nenhuma associação significativa entre os genótipos ou as frequências alélicas e a tendência da disfunção renal foi demonstrada. Os polimorfismos I/D e -262A > T do gene ECA aparentemente não têm impacto significativo na tendência da função renal na primeira semana de permanência em UTI e também não exercem influência sobre a mortalidade em pacientes graves.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Sidia Maria Callegari-Jacques (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil) sua contribuição na análise estatística deste estudo.

REFERÊNCIAS

1. Hoste EA, Kellum JA. Acute renal failure in the critically ill: impact on morbidity and mortality. In: Ronco C, Bellomo R, Brendolan A (eds.): Sepsis, Kidney and Multiple Organ Dysfunction. Contrib Nephrol. Basel, Karger 2004; 144:1-11.
2. Weisbord SD, Palevsky PM. Acute renal failure in the intensive care unit. Semin Respir Crit Care Med 2006; 27(3):262-73.
3. Kellum JA. Metabolic acidosis in patients with sepsis: epiphenomenon or part of the pathophysiology? Crit Care Resusc 2004; 6(3):197-203.
4. Piccinni P, Carraro R, Brendolan A. Acute renal failure in the Intensive Care Unit. In: Ronco C, Bellomo R, Brendolan A (eds.): Sepsis, Kidney and Multiple Organ Dysfunction. Contrib Nephrol. Basel, Karger 2004; 144:12-8.
5. Knobel E, Santos OFP, Batista MC (ed.) Terapia Intensiva: Nefrologia e Distúrbios do Equilíbrio Ácido-Base. São Paulo: Atheneu, 2004.
6. Bauer PR. Microvascular responses to sepsis: clinical significance. Pathophysiol 2002; 8:141-8.

7. DeAngelis CD, Rosenberg RN, Smith JM. Genomic medicine and the individual patient -byte to bedside: a call for papers. *JAMA* 2000; 284(20):2642.
8. Collins FC, Green ED, Guttmacher AE, Guyer MS. A vision for the future genomics research. *Nature* 2003; 422:835-47.
9. Phillips JA. Genomic medicine: managing the complexity. *JAMA* 2001; 286:1639.
10. Guttmacher AE, Collins, FS. Genomic Medicine. *N Engl J Med* 2002; 19:1512-20.
11. Marshall RP, Webb S, Bellingan GJ *et al.* Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism is associated with susceptibility and outcome in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:646-50.
12. Weekers L, Bouhanick B, Hadjadj S *et al.* Modulation of the renal response to ACE inhibition by ACE insertion/deletion polymorphism during hyperglycemia in normotensive, normoalbuminuric type 1 diabetic patients. *Diabetes* 2005; 54(10):2961-7.
13. Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). *Nucleic Acids Res* 1992; 20(6):1433.
14. O'Donnell CJ, Lindpaintner K, Larson MG *et al.* Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study. *Circulation* 1998; 97:1766-72.
15. Taitinen L, Uhari M, Kontula K *et al.* Angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism, angiotensinogen gene polymorphisms, family history of hypertension, and childhood blood pressure. *Am J Hypertens* 1999; 12:858-66.
16. Martínez E, Puras A, Escribano J *et al.* Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphisms, serum ACE activity and blood pressure in a Spanish-Mediterranean population. *J Hum Hypertens* 2000; 14:131-5.
17. Montgomery H, Brull D, Humphries SE. Analysis of gene-environment interactions by "stressing-the-genotype" studies: the angiotensin converting enzyme and exercise-induced left ventricular hypertrophy as an example. *Ital Heart J* 2002; 3:10-4.
18. Bengtsson K, Orho-Melander M, Lindblad U *et al.* Polymorphism in the angiotensin converting enzyme but not in the angiotensinogen gene is associated with hypertension and type 2 diabetes: the skaraborg hypertension and diabetes project. *J Hypertens* 1999; 17:1569-75.
19. Fujimura T, Yokota M, Kato S *et al.* Lack of association of angiotensin converting enzyme gene polymorphism or serum enzyme activity with coronary artery disease in Japanese subjects. *Am J Hypertens* 1997; 10:1384-90.
20. Poirier O, Georges JL, Richard S *et al.* New polymorphisms of the angiotensin II type 1 receptor gene and their associations with myocardial infarction and blood pressure: the ECTIM study. *Etude Cas-Témoins de l'Infarctus du Myocarde. J Hypertens* 1998; 16:1443-7.
21. Hung J, McQuillan BM, Nidorf M *et al.* Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and carotid wall thickening in a community population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:1969-74.
22. Pfohl M, Koch M, Prescod S *et al.* Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism, coronary artery disease and myocardial infarction. An angiographically controlled study. *Eur Heart J* 1999; 20:1318-25.
23. Zee RY, Ridker PM, Stampfer MJ *et al.* Prospective evaluation of the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and the risk of stroke. *Circulation* 1999; 99:340-3.
24. Renner W, Pabst E, Paulweber B *et al.* The angiotensin-converting-enzyme insertion/deletion polymorphism is not a risk factor for peripheral arterial disease. *Atherosclerosis* 2002; 165:175-8.
25. Poch E, La Sierra Ad A, González-Nuñez D *et al.* Genetic Polymorphisms of the renin-angiotensin system and essential hypertension. *Med Clin (Barc)* 2002; 118:575-9.
26. Keavney B, McKenzie CA, Connel JMC *et al.* Measured haplotype analysis of the angiotensin I-converting enzyme gene. *Hum Mol Genetics* 1998; 7(11):1745-51.
27. Foy CA, Rice GI, Ossei-Gerning N, Mansfield MW, Grant PJ. Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphisms in patients characterized by coronary angiography. *Hum Genet* 1997; 100(3-4):420-5.
28. Zhu X, Bouzekri N, Southam L *et al.* Linkage and association analysis of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-gene polymorphisms with ACE concentration and blood pressure. *Am J Hum Genet* 2001; 68(5):1139-48.
29. Kehoe PG, Katzov H, Feuk L *et al.* Haplotypes extending across ACE are associated with Alzheimers disease. *Hum Mol Genet* 2003; 12(8):859-67.
30. Haiman CA, Henderson SO, Bretsky P, Kolonel LN, Henderson BE. Genetic variation in angiotensin I-converting enzyme (ACE) and breast cancer risk: the multiethnic cohort. *Cancer Res* 2003; 63(20):6984-7.
31. Koh WP, Yuan JM, Sun CL *et al.* Angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene polymorphism and breast cancer risk among Chinese women in Singapore. *Cancer Res* 2003; 63(3):573-8.
32. Chou HT, Chen YT, Shi YR, Tsai FJ. Association between angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and mitral valve prolapse syndrome. *Am Heart J* 2003; 145(1):169-73.
33. Liu KP, Lin CY, Chen HJ, Wei CF, Lee-Chen GJ. Renin-angiotensin system polymorphisms in Taiwanese primary vesicoureteral reflux. *Pediatr Nephrol* 2004; 19(6):594-601.
34. Wu SF, Chang JS, Peng CT, Shi YR, Tsai FJ. Polymorphism of angiotensin-1 converting enzyme gene and Kawasaki disease. *Pediatr Cardiol* 2004; 25(5):529-33.
35. Hsieh YY, Chang CC, Tsai FJ, Hsu CM, Lin CC, Tsai CH. Angiotensin I-converting enzyme ACE 2350*G and ACE-240*T-related genotypes and alleles are associated with higher susceptibility to endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2005; 11(1):11-4.
36. McKenzie CA, Sinsheimer JS, Adeyemo AA *et al.* SNP haplotypes in the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene: analysis of Nigerian family data using gamete competition models. *Ann Hum Genet* 2005; 69(Pt 2):227-32.

37. Vincent JL, Moreno R, Takala J *et al.* The SOFA (sepsis-related organ failure assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 1996; 22(7):707-10.
38. Doevdans PA, Jukema W, Spiering W *et al.* Molecular genetics and gene expression in atherosclerosis. *Int J Cardiol* 2001; 80:161-72.
39. Niu T, Chen X, Xu X. Angiotensin Converting Enzyme gene insertion/deletion polymorphism and cardiovascular disease. *Drugs* 2002; 62(76):977-93.
40. Villard E, Tired L, Visvikis S, Rakotovo R, Cambien F, Soubrier F. Identification of new polymorphisms of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene, and study of their relationship to plasma ACE levels by two-QTL segregation-linkage analysis. *Am J Hum Genet* 1996; 58(6):1268-78.
41. Wetmore JB, Johansen KL, Sen S, Hung AM, Lovett DH. An angiotensin converting enzyme haplotypes predicts survival in patients with end stage renal disease. *Hum Genet* 2006; [Epub ahead of print].
42. Lahiri DK, Nurnberger JI Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; 19(19):5444.
43. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F *et al.* The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 1997; 24:4876-82.
44. D'Avila LC, Albarus MH, Franco CR *et al.* Effect of CD14 -260C > T polymorphism on the mortality of critically ill patients. *Immunol Cell Biol* 2006; 84(3):342-8.
45. Ferreira FL, Bota DL, Bross A, Mélot C, Vincent JL. Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients *JAMA* 2001; 286(14):1754-8.
46. Ceriani R, Mazzone M, Bortone F *et al.* Application of the sequential organ failure assessment score to cardiac surgical patients. *Chest*. 2003; 123:1229-39.
47. Levy MM, Fink MP, Marshall JC *et al.* 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. 2003; 31(4):1250-6.
48. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985; 13(10):818-29.
49. Chan YH. *Biostatistics 203 – survival analysis*. Singapore Med J 2004; 45:249-56.
50. Guttmacher AE, Collins FS. Genomic Medicine – a primer. *N Eng J Med* 2002; 19:1512-20.
51. Phillips JA 3rd. Genomic medicine: managing the complexity. *JAMA* 2001; 286(13):1639.
52. Wang DG, Fan JB, Siao CJ *et al.* Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 1998; 280:1077-82.
53. Rupert JL, Devine DV, Monsalve MV *et al.* Angiotensin-converting enzyme alleles in Quechua, a high altitude South American native population. *Ann Hum Biol* 1999; 26:375-80.
54. DeAngelis CD, Rosenberg RN, Smith JM. Genomic medicine and the individual patient. *JAMA* 2000; 284:22-9.
55. Sander C. Genomic medicine and the future of health care. *Science* 2000; 287:1977-8.
56. Bailey D, Zanders E, Dean P. The end of the beginning for genomic medicine. *Nat Biotechnol* 2001; 19:207-9.
57. Guttmacher AE, Jenkins J, Uhlmann WR. Genomic medicine: who will practice it? A call to open arms. *Am J Med Genet* 2001; 106:216-22.
58. Collins FS, McKusick VA. Implications of the Human Genome Project for medical science. *JAMA* 2001; 285:540-4.
59. Laurent S. Genotype interactions and intima-media thickness. *J Hypertension* 2002; 20:1477-8.
60. Wang JG, Stassen JA, Tizzoni L *et al.* Renal function in relation to three candidate genes. *Am J Kidney Dis* 2001; 38:1158-68.
61. Balkestein EJ, Wang JG, Struijker-Boudier HA *et al.* Carotid and femoral intima-media thickness in relation to three candidate genes in a Caucasian Population. *J Hypertension* 2002; 20:1551-61.
62. Mayer G. ACE genotype and ACE inhibitor response in kidney disease: a perspective. *Am J Kidney Dis* 2002; 40:227-35.
63. Coll E, Campos B, Gonzales-Nuñez D *et al.* Association between the A1166C polymorphism of the angiotensin II receptor type 1 and progression of chronic renal insufficiency. *J Nephrol* 2003; 16:357-64.
64. Ha SK, Park HC, Park HS *et al.* ACE gene polymorphism and progression of diabetic nephropathy in Korean type 2 diabetic patients: effect of ACE gene DD on the progression of diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2003; 41:943-9.
65. Ishimitsu T, Tsukada K, Ohta S *et al.* Increased cardiovascular risk in long term hemodialysis patients carrying deletion allele of ACE gene polymorphism. *Am J Kidney Dis* 2004; 44:466-75.
66. Gencoy G, Altun B, Kiykim AA *et al.* TNF alpha-308 genotype and rennin-angiotensin system in hemodialysis patients: an effect on inflammatory cytokine levels? *Artif Organs* 2005; 29:174-8.
67. de Mendonca A, Vincent JL, Suter PM *et al.* Acute renal failure in the ICU: risk factors and outcome evaluated by the SOFA score. *Intensive Care Med* 2000; 26(7):915-21.
68. Cappi SB, Sakr Y, Vincent JL. Daily evaluation of organ function during renal replacement therapy in intensive care unit patients with acute renal failure. *J Crit Care* 2006; 21(2):179-83.
69. Janssens U, Graf C, Graf J *et al.* Evaluation of the SOFA score: a single-center experience of a medical intensive care unit in 303 consecutive patients with predominantly cardiovascular disorders. *Sequential Organ Failure Assessment*. *Intensive Care Med* 2000; 26(8):1037-45.
70. Jerng JS, Yu CJ, Wang HC *et al.* Polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene affects the outcome of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2006; 34:1001-6.