

Prevalencia del polimorfismo I/D del gen de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en la población de Montevideo

Lic. Pilar Zorrilla*, Dra. Adriana Mimbacas^{†‡}, Lic. Cecilia Gascue[§],
Dres. Gerardo Javiel[¶], Horacio Cardoso^{††}

Departamento de Citogenética, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Resumen

Las nuevas técnicas de biología molecular aplicadas al diagnóstico genético y el uso de marcadores moleculares posibilitan el estudio de los mecanismos que subyacen en la predisposición individual y familiar a padecer determinadas enfermedades. Para llevar a cabo estos estudios, es necesario en primera instancia establecer cuál es la prevalencia de dichos marcadores en la población general.

El estudio se realizó empleando una muestra de 108 individuos seleccionados por muestreo simple del banco de ADN de 500 individuos representativos de nuestra población, que pertenece al Departamento de Citogenética del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Para establecer el genotipo del gen de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en cada una de las muestras, se amplificó un fragmento de ADN perteneciente al intrón 16 de este gen mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El genotipo predominante en esta población control es el heterocigota I/D (50,9%), encontrándose el genotipo homocigota para la delección (D/D) (30,6%) en mayoría con respecto al genotipo homocigota para la inserción (I/I) (18,5%). Los resultados sugieren que existe, por tanto, un predominio del alelo D con respecto al alelo I en la población montevideana, habiéndose hallado diferencias significativas con respecto a poblaciones de origen asiático y americano, pero no con poblaciones europeas.

Palabras clave: *POLIMORFISMO (GENÉTICA) - genética.
PREDISPOSICIÓN GENÉTICA A LA ENFERMEDAD.
GRUPOS DE POBLACIÓN CONTINENTAL - genética.
URUGUAY - epidemiología.*

* Investigador honorario. Departamento de Citogenética, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE).

† Asistente DT. Departamento de Citogenética, Unidad Asociada al Instituto de Biología. Facultad de Ciencias.

‡ Investigadora Asociada. Departamento de Citogenética, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

§ Becaria. Departamento de Citogenética, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

¶ Coordinador de la Unidad de Diabetología del CASMU.

†† Investigador Jefe. Departamento de Citogenética, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Correspondencia: Dra. Adriana Mimbacas
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
Av. Italia 3318. Montevideo, Uruguay.

E-mail: abmg@iibce.edu.uy

Recibido: 9/6/05.

Aceptado: 25/10/05.

Introducción

Las nuevas técnicas de biología molecular aplicadas al diagnóstico genético y el uso de marcadores moleculares posibilitan el estudio de los mecanismos que subyacen en la predisposición individual y familiar a padecer determinadas enfermedades siendo, en todos los casos, necesario establecer previamente cuál es la prevalencia de dichos marcadores en la población general.

Uruguay presenta algunas particularidades desde el punto de vista poblacional que lo diferencian del resto de los países latinoamericanos. Es una población de origen trihíbrido (europeo, africano y amerindio) con un intenso proceso de miscegenación y no presenta, desde la mitad del siglo XVIII, grupos amerindios aislados⁽¹⁾. Estudios realizados en nuestro laboratorio sobre fibrosis quística, enfermedad celíaca y diabetes mellitus, mostraron que el comportamiento de los genes fue diferente según la enfermedad estudiada, siendo fuerte la influencia de la mezcla étnica en ciertos marcadores y comportándose como una población caucásica en otros, pero, en general, diferente al resto de los países latinoamericanos⁽²⁻⁷⁾. El gen de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) se expande a lo largo de 21 kb, (26 exones y 25 intrones), se ubica en la región cromosómica 17q23^(8,9), y pertenece al sistema renina-angiotensina (SRA) junto con los genes de la renina, del angiotensinógeno (AGT), y de los receptores de tipo I y II de la angiotensina II (AGTR₁ y AGTR₂). La principal función de este sistema es la conversión del angiotensinógeno en angiotensina II por parte de las enzimas renina y ECA^(9,10).

Las poblaciones presentan un polimorfismo de inserción/delección (I/D) para este gen, que involucra la presencia (alelo I), o la ausencia (alelo D) de una secuencia Alu repetida de 287 pares de bases en el intrón 16⁽¹¹⁾. Estas variantes tienen como principal efecto una alteración de las concentraciones celulares y plasmáticas de la enzima codificada por este gen, convirtiéndolo en un posible candidato para la susceptibilidad al desarrollo de afecciones tales como la enfermedad cardiovascular y las complicaciones crónicas de la diabetes⁽¹²⁾. Estudios acerca de la ECA han demostrado diferencias en sus niveles plasmáticos según el genotipo del individuo: los individuos cuyo genotipo es D/D poseen niveles dos veces más altos que los individuos cuyo genotipo es I/I, mientras que los individuos heterocigotas portan niveles intermedios de la enzima circulante^(13,14). Varios estudios acerca de este polimorfismo I/D de la ECA a nivel poblacional demuestran que su prevalencia varía en los distintos grupos étnicos, y que la frecuencia del alelo D es inferior en las poblaciones de origen asiático que en las poblaciones de origen europeo⁽¹¹⁾. Resulta, por tanto, interesante estudiar al gen que codifica la ECA en nuestra población, ya que podría estar asociado al desarrollo de trastornos vas-

culares, la principal causa de mortalidad de nuestro país⁽¹⁵⁾. Basados en estos comportamientos diferenciales de los genes y en las particularidades genéticas de nuestra población, consideramos necesario determinar previamente los datos presentados en este trabajo para realizar estudios epidemiológicos.

Material y método

El estudio se realizó empleando una muestra de 108 individuos seleccionados del banco de ADN perteneciente al Departamento de Citogenética del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). El banco de ADN comprende 500 individuos sin relación de parentesco entre sí, colectado con un diseño estadístico que aseguró una correcta representación de la población general de Montevideo estratificada por cobertura de salud y nivel socioeconómico. Las muestras fueron elegidas al azar en 15 centros asistenciales públicos y privados de la ciudad de Montevideo (cinco públicos y diez privados).

El diseño estadístico se basó en un estudio sobre nivel socioeconómico y salud pública en la población de Montevideo⁽¹⁶⁾. El número de individuos analizado en cada uno de los 15 centros se determinó sobre la base de seis categorías socioeconómicas arbitrarias establecidas en el mencionado estudio, respetando asimismo las proporciones descriptas en cada categoría a fin de lograr una muestra representativa de la población montevideana total.

La elección de las 108 muestras a analizar se realizó por muestreo aleatorio, siguiendo los mismos criterios que fueron utilizados para el banco de ADN a fin de mantener de esa forma la representatividad poblacional.

Para establecer el genotipo del gen de la ECA se amplificó un fragmento de ADN perteneciente al intrón 16 mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizaron dos juegos de cebadores: el primer par flanquea los extremos de la secuencia a amplificar y el segundo par reconoce específicamente la secuencia de inserción. La amplificación por PCR se realizó siguiendo el protocolo utilizado por Hsieh y colaboradores⁽¹¹⁾.

Los cebadores que se utilizaron en la primera reacción de PCR fueron:

5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3' (1R), y
5'-GATGTGGCCATCACATTGGTCAGAT-3' (1F).

Los fragmentos amplificados que poseen la inserción (alelo I) y los que no la poseen (alelo D) tienen un tamaño de 480 y 191 pares de bases respectivamente. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (5 mg/ml).

Se realizó una segunda amplificación por PCR para confirmar la ausencia de la inserción, utilizando los cebadores 1R (ya descrito) y 2F, cuya secuencia es:

5' CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3' (2F).

Tabla 1. Frecuencias alélicas y genotípicas de la población de Montevideo

<i>Genotipos</i>	<i>N</i>	<i>Frecuencias genotípicas</i>	<i>Alelos (2n=216)</i>	<i>Frecuencias alélicas</i>
II	20	0,185	I	0,44
ID	55	0,509		
DD	33	0,306	D	0,56
Total	108	1		

Tabla 2. Comparación de frecuencias genotípicas entre la población de Montevideo y otras poblaciones (asiáticas, europeas y americanas), mediante análisis por Chi cuadrado

<i>Poblaciones</i>	<i>Frecuencia genotípica</i>			<i>N</i>	<i>Valor de X²</i>	<i>Valor de p</i>
	<i>II</i>	<i>ID</i>	<i>DD</i>			
Kaoshiung (Taiwán)	0,51	0,40	0,09	263	84,17	p<0,05
Beijing (China)	0,45	0,45	0,10	125	57	p<0,05
Viena (Austria)	0,21	0,51	0,28	182	0,736	NS
Rotterdam (Holanda)	0,21	0,32	0,47	206	0,132	NS
París (Francia)	0,20	0,44	0,37	128	1,05	NS
Ollantaytambo (Perú)	0,50	0,45	0,05	111	108,3	p<0,05
Península de Yucatán (México)	0,53	0,41	0,06	51	120,67	p<0,05

En el caso de la existencia del alelo I se produce una amplificación de 293 pares de bases. En todas las reacciones de PCR se incluyó un control negativo.

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando los programas estadísticos STATA 5.0 y Epiinfo 6.0. Se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas. Se realizó el test de Chi cuadrado para detectar si dicha población se encontraba en equilibrio Hardy-Weinberg, y compararla con estudios en otras poblaciones.

Resultados

Se establecieron las frecuencias génicas y genotípicas para la muestra estudiada (tabla 1).

Se evaluó la distribución de las frecuencias de los genotipos, demostrando que la misma es consistente con una población en equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 0,152$; $df = 2$; $p > 0,05$).

El análisis por Chi cuadrado detectó una diferencia significativa entre nuestra población y poblaciones asiáticas (Kaoshiung, Taiwán, y Beijing, China)^(11,17), así como latinoamericanas (Ollantaytambo, Perú, y península de Yucatán, México)⁽¹⁸⁾. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con poblaciones europeas (Viena, Austria; Rotterdam, Holanda y París, Francia)⁽¹⁹⁻²¹⁾ (tabla 2).

Discusión

Existe poca información, tanto en el ámbito regional como mundial, sobre la prevalencia de los polimorfismos del gen de la ECA. La mayoría de estos trabajos presentan un diseño de tipo caso-control^(17,19). Si bien ellos aportan información importante, la misma es limitada cuando queremos estudiar enfermedades con un patrón de herencia multifactorial. Cuando se diseña un estudio con la estructura caso-control, la definición de las poblaciones utilizadas como control sólo es válida para cada estudio y para cada enfermedad en particular. Un estudio de prevalencia, en cambio, brinda una visión más general del momento evolutivo de cada gen y la información obtenida no está sesgada con respecto a ninguna enfermedad en especial.

Estudios previos han establecido que la frecuencia del alelo D es mucho menor en los asiáticos que en los caucásicos⁽¹¹⁾. En nuestro trabajo, la comparación de nuestra población con otras poblaciones latinoamericanas proporcionó resultados quizá inesperados, al encontrar diferencias significativas con las mismas. Estos hallazgos son corroborados en parte por las diferencias estadísticas que se observaron entre nuestra muestra y poblaciones del continente asiático (Taiwán y China), probablemente relacionadas genéticamente con ancestros de las etnias indoamericanas. Sin embargo, la inexistencia de diferen-

cias significativas con poblaciones europeas (Francia, Austria y Holanda) sugeriría una similitud con estas poblaciones. A diferencia de lo observado con las frecuencias de mutaciones de otros genes tales, como el CFTR⁽³⁾, determinadas en la misma muestra, en el caso particular del polimorfismo del gen de la ECA, la población montevideana se comporta en forma similar a una población europea y no como una población trihíbrida. La población de nuestra capital estaría en el momento actual constituida por 86%-96% de genes de origen europeo, 1%-7% indoamericano y 4%-11% africano⁽²²⁾. Esos porcentajes relativamente bajos de miscegenación, si se los compara con Perú o México, aparentemente no son suficientes para modificar la frecuencia del marcador analizado. De acuerdo con nuestros datos, este polimorfismo se presenta en equilibrio de Hardy-Weinberg en nuestra muestra, razón por la cual consideramos que en el momento actual no estaría bajo una presión de selección de importancia y, por tanto, no es esperable un cambio en las frecuencias observadas.

Se ha demostrado que el gen de la ECA presenta diferentes frecuencias y asociaciones con afecciones tales como nefropatía diabética, cardiopatía isquémica e hipertensión arterial, según el origen étnico de las poblaciones^(11,12). Este estudio de prevalencia en la población general servirá como base para estudiar en el futuro si existen diferencias en las frecuencias genotípicas o alélicas, o ambas, en el gen de la ECA con respecto a la presencia de alguna enfermedad específica como la diabetes mellitus. En ese caso, el principal resultado del análisis de marcadores genéticos de riesgo y protección para afecciones de herencia multifactorial será la determinación de aquellos genotipos con mayor predisposición al desarrollo de complicaciones, lo que contribuiría a la realización de una mejor medicina predictiva⁽¹²⁾.

Summary

New technologies of molecular biology applied to genetic diagnosis and molecular markers allow the influence of personal and familial predisposition to certain diseases. The first step of this study was to determine the prevalence of these markers.

A population of 108 randomly assigned people out of 500 representative samples of a DNA bank from the Cytology Department of the Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE, Biological Research Centre Clemente Estable) was studied.

Genotype of angiotensin-converting enzyme (ACE) gene was determined using an amplified DNA fragment of intron 16 by polymerase chain reaction technique. Predominant genotype was I/D genotype (50.9%), D/D (30.6%) and I/I (18.5%).

Results suggest a predominant D allele, comparing to I allele in the Montevideo population, showing significant differences with American and Asian population.

Résumé

Les nouvelles techniques de biologie moléculaire appliquées au diagnostic génétique, et l'emploi de marqueurs moléculaires, permettent d'étudier les mécanismes qui demeurent dans la prédisposition individuelle et familiale à subir certaines maladies. Pour mener à bout ces études, il faut d'abord établir quelle est la prévalence de ces marqueurs dans la population générale.

On a pris un échantillon de 108 individus choisis par échantillonnage simple de la banque d'ADN de 500 individus représentatifs de notre population, qui appartiennent au Département de Cytogénétique de l'Institut de Recherches Biologiques Clemente Estable (IIBCE). Afin d'établir le génotype du gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) à chaque échantillon, on a agrandi un fragment d'ADN appartenant à l'intron 16 de ce gène, au moyen de la technique de réaction en chaîne de la polymérase (PCR). Le génotype dominant dans cette population-contrôle est l'hétérozygote I/D (50,9%), le génotype homozygote pour la délétion (D/D) (30,6%) se trouvant en majorité par rapport au génotype homozygote pour l'insertion (I/I) (18,5%). Il existe donc selon ces résultats, une prévalence de l'allèle D par rapport à l'allèle I dans la population de Montevideo; il y a des différences remarquables par rapport à des populations d'origine asiatique et américaine, mais pas par rapport aux populations européennes.

Bibliografía

1. **González R, Rodríguez S.** Guaraníes y Paisanos. Montevideo: Nuestra Tierra, 1992.
2. **Crispino B, Mimbacas A, Cardoso H, Cabezas E.** Fibrosis Quística: ¿se presenta de la misma forma en el Uruguay que en el viejo mundo? Rev Med Uruguay 1994; 10(1): 29-33.
3. **Crispino B, Cardoso H, Luzardo G, Mimbacas A, Aznarez I, Martínez ML, et al.** Identificación de mutaciones del gen CFTR presentes en pacientes fibroquísticos provenientes de la población uruguaya. Arch Pediatr Urug 1996; 67(1): 37-41.
4. **Mimbacas A, González S, Cardoso H, Poggio R, Javiel G, García S, et al.** Alelos HLA-DQ y diabetes mellitus tipo I en el Uruguay. Rev Med Uruguay 1998; 14(3): 216-20.
5. **Mimbacas A, Pérez-Bravo F, Hidalgo P, Javiel G, Pisciotano C, Grignola R, et al.** Association between diabetes type 1 and DQB1 alleles in a case-control study conducted in Montevideo, Uruguay. Genet Mol Res 2003; 2(1): 29-35.
6. **Mimbacas A, Pérez-Bravo F, Santos JL, Pisciotano C, Grignola R, Javiel G, et al.** The association between HLA DQ genetic polymorphism and type 1 diabetes in a case-parent study conducted in an admixed population. Eur J Epidemiol 2004; 19(10): 931-4.

7. **Poggio Favotto R, Mimbacas A, Crispino B, Jasinski C, Cardoso H.** Alelos HLA-DQB1 y DRB1 asociados con la enfermedad celíaca en pacientes hospitalarios. *Rev Med Uruguay* 2001; 17(2): 107-13.
8. **Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F.** Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem* 1991; 266(23): 15377-83.
9. **Crisan D, Carr J.** Angiotensin I-converting enzyme. *J Mol Diagn* 2000; 2(3): 105-15.
10. **Thomas GN, Tomlinson B, Chan JC, Sanderson JE, Cockram CS, Critchley JA.** Renin-angiotensin system gene polymorphisms, blood pressure, dyslipidemia, and diabetes in Hong Kong Chinese: a significant association of the ACE insertion/deletion polymorphism with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2001; 24(2): 356-61.
11. **Hsieh MC, Lin SR, Hsieh TJ, Hsu CH, Chen HC, Shin SJ, et al.** Increased frequency of angiotensin converting enzyme DD genotype in patients with type 2 diabetes in Taiwan. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15(7): 1008-13.
12. **Frechtel GD, Taverna MJ, López AP.** Genética molecular de la diabetes y sus complicaciones. 3ª Edición, Buenos Aires: Akadia, 2003: 61-103.
13. **Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F.** An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86(4): 1343-6.
14. **Davis GK, Roberts DH.** Molecular genetics of the renin-angiotensin system: implications for angiotensin II receptor blockade. *Pharmacol Ther* 1997; 75(1): 43-50.
15. **Curto S.** Mortalidad por enfermedades cardiovasculares en el Uruguay: Actualización de datos correspondientes al año 2002. *CHSCV* 2003; 5(1): 8-11.
16. **Cardoso H, Crispino B, Mimbacas A, Cardoso ME.** A low prevalence of cystic fibrosis in Uruguayans of mainly European descent. *Genet Mol Res* 2004; 3(2): 258-63.
17. **Feng Y, Niu T, Xu X, Chen C, Li Q, Qian R, et al.** Insertion/deletion polymorphism of the ACE gene associated with type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51(6): 1986-8.
18. **Rupert JL, Kidd KK, Norman LE, Monsalve MV, Hochachka PW, Devine DV.** Genetic polymorphisms in the Renin-Angiotensin system in high-altitude and low-altitude Native American Populations. *Ann Hum Genet* 2003; 67(Pt 1): 17-25.
19. **Sunder-Plassmann G, Kittler H, Eberle C, Hirschl MM, Woisetschläger C, Derhaschnig U, et al.** Angiotensin converting enzyme DD genotype is associated with hypertensive crisis. *Crit Care Med* 2002; 30(10): 2236-41.
20. **Danser AH, Schalekamp MA, Bax WA, van den Brink AM, Saxena PR, Riegger GA, et al.** Angiotensin-converting enzyme in the human heart: effect of the deletion/insertion polymorphism. *Circulation* 1995; 92(6): 1387-8.
21. **Benetos A, Gautier S, Ricard S, Topouchian J, Asmar R, Poirier O, et al.** Influence of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms on aortic stiffness in normotensive and hypertensive patients. *Circulation* 1996; 94(4): 698-703.
22. **Sans M, Salzano FM, Chakraborty R.** Historical genetics in Uruguay: estimates of biological origins and their problems. *Hum Biol* 1997; 69(2): 161-70.