

# Estudio comparativo de prevalencia del gen de la ECA en muestras de diabéticos y población general

Lic. Mariana Fernández\*, Dres. Marta Acosta†, Cecilia Airaudó†, Jorge Fernández‡, Rita Ferrero§, Gerardo Javiel¶, Ana Pena†, Beatriz Simonelli†, Enrique Soto§, Graciela Vitarella††, Adriana Mimbacas‡‡

## Resumen

**Introducción:** previamente se ha demostrado que los pacientes diabéticos poseen una incidencia aumentada de patologías micro y macrovasculares. En la exploración de posibles determinantes aparece como candidato atractivo el gen de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) el cual presenta de acuerdo al polimorfismo InDel existente, un aumento de la concentración enzimática en sangre asociado a enfermedades vasculares.

**Objetivo:** se plantearon como objetivos establecer la prevalencia del polimorfismo del gen de la ECA, en pacientes diabéticos y comparar las frecuencias con las halladas para la población general de manera de revelar si existe asociación del locus con la diabetes mellitus.

**Material y método:** la población estudiada consistió en 131 individuos con diagnóstico certero de diabetes según criterios de la American Diabetes Association. Se hallaron las frecuencias génicas y genotípicas del polimorfismo InDel del gen de la ECA mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

**Resultados:** no se encontraron diferencias significativas en la prevalencia del marcador estudiado entre diabéticos y la población general. Las frecuencias génicas halladas en diabéticos fueron 0,435 para alelo I y 0,565 para alelo D versus 0,440 alelo I y 0,560 alelo D en la población general.

**Discusión:** en suma, este marcador es un factor de riesgo que no está asociado a la diabetes en sí misma, sino que la relación entre este gen y las complicaciones vasculares serían las mismas para diabéticos que para la población general.

**Palabras claves:** DIABETES MELLITUS.  
ENZIMA CONVERTIDORA ANGIOTENSINA.  
POLIMORFISMO GENÉTICO.  
PREVALENCIA

**Keywords:** DIABETES MELLITUS.  
ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME.  
POLYMORPHISM, GENETIC.  
PREVALENCE.

\* Unidad de Genética Humana, Departamento de Genética. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Uruguay.

† Policlínica de Endocrinología Hospital Pasteur, Ministerio de Salud Pública. Uruguay.

‡ Jefe de Policlínica de Endocrinología Hospital Pasteur, Ministerio de Salud Pública. Uruguay.

§ Medicina descentralizada (General y Cardiología) del Centro de Asistencia del Sindicato Médico del Uruguay. Uruguay.

¶ Policlínica de Endocrinología Hospital Pasteur, Ministerio de Salud Pública. Coordinador de la Unidad de Diabetología, Centro de Asistencia del Sindicato Médico del Uruguay. Uruguay.

†† Unidad de Diabetología, Centro de Asistencia del Sindicato Médico del Uruguay. Uruguay.

‡‡ Unidad de Genética Humana, Departamento de Genética. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Departamento de Genética Evolutiva. Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Uruguay.

**Correspondencia:** Lic. Mariana Fernández  
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, IIBCE.  
Av. Italia 3318, Montevideo, Uruguay.

Correo electrónico: maritafdc@gmail.com

Recibido: 9/3/09.

Aceptado: 1/6/09.

## Introducción

La diabetes mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de defectos tanto en la secreción de insulina, acción de insulina, o ambas<sup>(1)</sup>. Este aumento de glucosa en sangre conlleva a complicaciones múltiples a nivel de distintos sistemas del organismo.

La hiperglicemia crónica está asociada con daño, a corto o largo plazo, disfunción y falla de varios órganos, especialmente ojos, riñón, corazón y vasos sanguíneos<sup>(1)</sup>. Por esta razón se han hecho múltiples esfuerzos por encontrar marcadores genéticos que determinen genotipos que conlleven un comportamiento diferencial de la enfermedad ya instalada así como una predisposición individual y familiar a presentar los trastornos asociados. Una de las complicaciones crónicas que afecta mayormente a los diabéticos es la evolución hacia enfermedades vasculares y desarrollo de cardiopatías. Los pacientes diabéticos muestran una incidencia aumentada de aterosclerosis cardiovascular, vascular periférica y cerebrovascular<sup>(2,3)</sup>. Esto presenta su mayor incidencia en diabéticos con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2<sup>(4)</sup>. A su vez, entre 20% y 60% de los pacientes diabéticos presentan hipertensión la cual es también el principal factor de riesgo para eventos cardiovasculares tales como infarto agudo de miocardio (IAM), accidente vascular encefálico (AVE) así como para complicaciones microvasculares (retino y nefropatía)<sup>(5)</sup>. Una extensa enumeración de evidencias señala la importancia de la susceptibilidad genética en la patogenia de las complicaciones diabéticas crónicas<sup>(6)</sup>. En este camino se están estudiando a nivel mundial muchos genes posiblemente relacionados con la diabetes y sus complicaciones, eligiendo candidatos atractivos según sus roles metabólicos y la complicación crónica en análisis. Uno de los genes estudiados para diabetes en general, y para eventos macrovasculares asociados en particular, es el gen de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). El locus genético de este gen ha sido propuesto como candidato para la susceptibilidad a desarrollar enfermedades cardiovasculares en vista al rol fisiológico de la ECA y el beneficio establecido de la terapia de los inhibidores de la ECA<sup>(7)</sup>. Algunos estudios han mostrado que en pacientes hipertensos con diabetes tipo 1, los inhibidores de la ECA pueden reducir el nivel de albuminuria y el rango de progresión a la enfermedad renal en mayor grado que otros agentes antihipertensivos.

Otros estudios han mostrado que son beneficiosos en reducir la progresión a la microalbuminuria en pacientes normotensos con diabetes tipo 1 y normo e hipertensos con diabetes tipo 2<sup>(8)</sup>. En la población uruguaya un estudio realizado en población de alto riesgo cardiovascular ha demostrado que el genotipo D/D (delección/delección),

junto con otros genes, está asociado con el aumento del riesgo para patologías vasculares<sup>(9)</sup>. Sin embargo, estudios sobre este marcador y su relación con la diabetes a nivel mundial han resultado controversiales. Parte de estos estudios señalan que el genotipo D/D está relacionado con el riesgo de desarrollar aterosclerosis en pacientes diabéticos<sup>(10)</sup>. A su vez, otros trabajos le adjudican el mismo riesgo para este marcador en individuos no diabéticos<sup>(11)</sup>. Existen estudios en los que se demostró relación del genotipo DD con valores clínicos que caracterizan al síndrome metabólico, por ejemplo hipertrigliceridemia<sup>(12)</sup>, aumento de apolipoproteína B<sup>(13)</sup>, desregulación del control glicémico<sup>(14)</sup>, y con la progresión hacia la nefropatía diabética<sup>(15)</sup>. En contraste, otros trabajos encontraron relación entre el genotipo I/I (inserción/inserción) y una menor sensibilidad a la insulina<sup>(16,17)</sup>. Estos resultados no esclarecen si el gen se encuentra asociado a la diabetes mellitus en sí misma, o la patología simplemente actúa como variable confusora. Por tanto, los objetivos de este trabajo fueron establecer la prevalencia del polimorfismo del gen de la ECA en pacientes diabéticos y compararla con la frecuencia hallada previamente en la población general de manera de revelar si existe asociación del locus con la diabetes mellitus.

## Material y método

La selección de la población estudiada fue realizada por el equipo médico especialista de ambas instituciones de salud. Consistió en pacientes que asistieron a consulta en los años 2002 y 2003. Se seleccionaron 131 individuos que cumplieran con diagnóstico certero de diabetes (tipo 1 y tipo 2) de acuerdo con los criterios de la American Diabetes Association<sup>(3)</sup>. Se excluyeron de la muestra los pacientes que presentaran algún proceso tumoral o tuviese otra enfermedad autoinmune asociada. Todos los sujetos fueron entrevistados por un mismo médico tratante, quien llenó el protocolo respectivo. En base a los estudios estadísticos anteriores que determinaron que una muestra de 500 individuos es representativa de toda la población de Montevideo y teniendo en cuenta la prevalencia de 8%, sería suficiente el análisis de unos pocos individuos. A los efectos de obtener mejores resultados se analizó esta cantidad de pacientes. Todos los pacientes participantes dieron su consentimiento escrito (aprobado por el Ministerio de Salud Pública, Ref. 1081/96). El presente estudio fue autorizado por los directivos de cada institución de salud participante así como por el comité de ética del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Para determinar las características de la muestra se realizó el análisis de Kolmogorov-Smirnov y se utilizaron tests estadísticos no paramétricos para el resto de los análisis. Se realizó, a su vez, el análisis de equilibrio de Hardy Weinberg.

Una vez definida la muestra, a cada paciente se le realizó extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) de sangre periférica. Para la genotipificación del polimorfismo InDel del gen de la ECA se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con primers ya descritos<sup>(18)</sup> y corrida electroforética de los productos en gel de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio (5 mg/μl). Esta técnica incluye doble amplificación y juego de primers, a los efectos de descartar falsos positivos D/D por competición en la reacción.

Las comparaciones realizadas entre ambas muestras en estudio (diabéticos y población general) fueron realizadas mediante el uso de tablas de contingencia de 2 x 2.

Para los análisis estadísticos se utilizaron los paquetes estadísticos SPSS 10.0 y EpiInfo 2000.

### Resultados

Las características de la muestra en base al test de Kolmogorov-Smirnov mostraron que la población estudiada no presentaba una distribución normal.

Según los tests estadísticos no paramétricos aplicados y a la tipificación genética se observaron las siguientes frecuencias génicas, 0,435 para el alelo I y 0,565 para el alelo D. Se estableció, a su vez, que la muestra se encontraba en equilibrio de Hardy Weinberg para el locus en estudio.

Las frecuencias obtenidas se compararon con las derivadas del trabajo de Zorrilla P<sup>(19)</sup>, para el mismo marcador en una muestra representativa de la población general de Montevideo (figura 1, tabla 1).

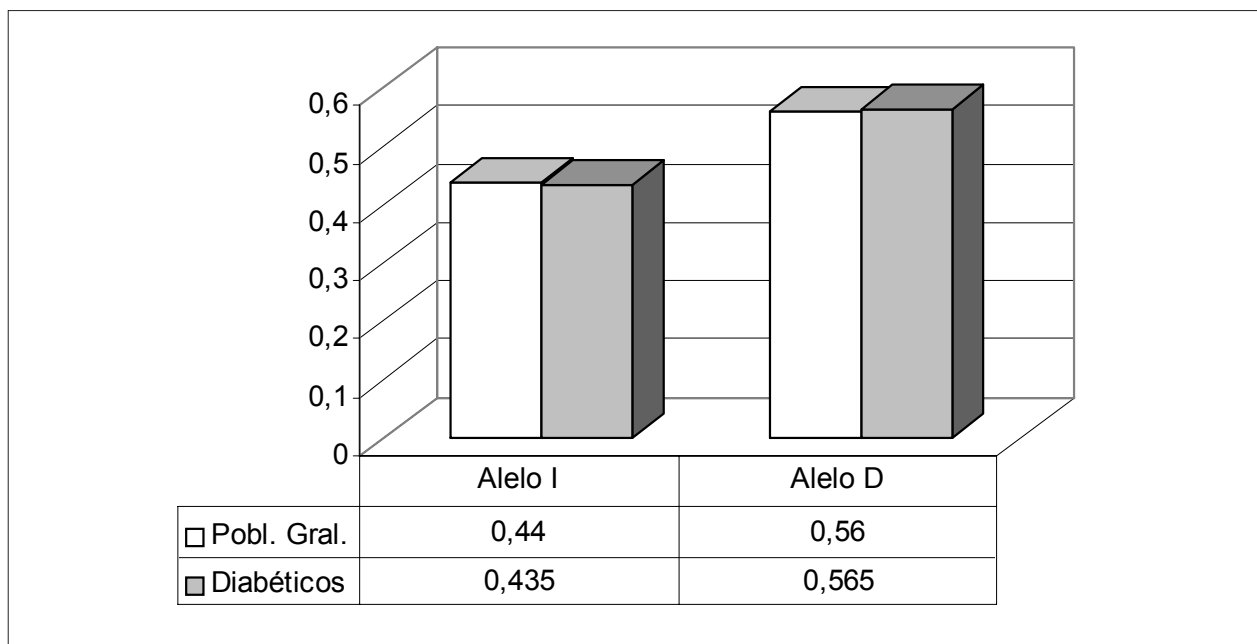
### Discusión

La diabetes mellitus en estas últimas décadas ha cobrado mucha relevancia llegando a ser considerada una enfermedad epidémica<sup>(20)</sup>. Este aumento observado a nivel mundial parece haber sido potenciado por las características de la sociedad occidental actual. La transición demográfica y epidemiológica de las poblaciones de los países de mayor desarrollo relativo han traído un cambio en las costumbres alimenticias y de actividad física, junto con modificaciones genéticas particulares y ambientales, que han ido dando progresivamente más relevancia a la expresión de esta patología<sup>(21)</sup>. Esto implica que la diabetes es en Uruguay una enfermedad que cada vez tiene más peso socioeconómico, tanto en recursos humanos como hospitalarios para el Estado, así como serios problemas a nivel de la población.

**Tabla 1.** Tabla de contingencia 2 x 2 para diabéticos (n=131; 2n=262) y población general (n=108; 2n=216)

	Con alelo D	Sin alelo D	Total 2n
Diabéticos	148	114	262
No diabéticos	121	95	216

OR = 1,02 (0,7-1,49), IC 95%, p valor >0,05



**Figura 1.** Prevalencia del polimorfismo de la enzima convertidora de angiotensina en población general y diabéticos

Creemos, a su vez, que la caracterización de la población de diabéticos de Uruguay es sumamente importante, principalmente debido a que nuestra población, desde el punto de vista genético, no parece comportarse de igual modo que otras en cuanto a las frecuencias genotípicas y alélicas de diferentes genes analizados<sup>(22-26)</sup>.

En el caso particular de este polimorfismo nuestros resultados indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la población general y la población diabética. Este hecho parecería apoyar la idea de que la asociación que presenta el gen de la ECA con el riesgo a desarrollar complicaciones macrovasculares sería independiente de la presencia de diabetes. Si bien ya se ha comprobado que los pacientes diabéticos presentan una mayor incidencia de complicaciones, en el caso de este polimorfismo, el ser diabético no aumentaría el riesgo sino que sería igual que para la población general. Esto, a su vez, podría ser una de las posibles explicaciones a los resultados contradictorios que se encuentran en la bibliografía con respecto a este marcador y la diabetes<sup>(10-17)</sup>. En dichos trabajos no se ha tenido en cuenta la prevalencia de dicho polimorfismo en cada una de las poblaciones analizadas, lo que podría traer aparejado el fenómeno de tomar a la diabetes como variable confusora. La asociación parecería no ser con la diabetes en sí misma, sino que los distintos genotipos para este gen darían una susceptibilidad diferencial a alguna de las complicaciones crónicas, apoyado esto por el papel funcional de la enzima ECA, lo cual hace plausible biológicamente que este marcador afecte a nivel de complicaciones micro y macrovasculares, potenciando así los efectos de la hiperglicemia sostenida.

En suma: no se encontraron diferencias significativas en la prevalencia del marcador molecular estudiado entre la población de diabéticos y la población general. Por tanto, estudios posteriores deben estar dirigidos a la búsqueda específica de asociaciones de este gen con patologías crónicas que lo involucren, tanto a nivel de su participación en rutas metabólicas como en aquellos casos donde, en la fisiopatología, se vea implicado su producto génico.

### Agradecimientos

A la Lic. Pilar Zorrilla y a la Mag. Cecilia Gascue por su participación en la recolección de muestras. Al personal de enfermería y secretaria de las instituciones participantes y a todos los pacientes que aceptaron ser parte de este estudio.

### Summary

*Introduction:* we have previously demonstrated that diabetic patients have an increased incidence of micro and

macrovascular pathologies. Upon exploration of possible determining factors, the ACE gene appears as an attractive factor, since it presents, according to the existing InDel polymorphism, an increase of the enzyme concentration in blood associated to vascular diseases.

*Objective:* to establish the prevalence of polymorphism of the ACE gene in diabetic patients, and to compare the frequencies with those found in the general population, in order to find out whether there is a relationship between locus and diabetes mellitus.

*Method:* the population studied consisted of 131 individuals with a certain diagnosis of diabetes, according to criteria of the American Diabetes Population. We determined InDel polymorphism's genic and genotypic frequencies in the ACE gene through the polymerase chain reaction (PCR).

*Results:* we failed to find meaningful differences in the prevalence of the marker studied between diabetic patients and the general population.

*Discussion:* to sum up, the present marker is a risk factor that is not associated to diabetes itself; hence the relationship between this gene and vascular complications would be the same in diabetic patients and the general population.

### Résumé

*Introduction:* on a déjà montré que les patients diabétiques ont une incidence augmentée de pathologies micro et macro vasculaires. Le gène de l'ECA semble être le candidat préféré parmi les possibles responsables. Celui-ci présente, selon le polymorphisme In Del existant, une augmentation de la concentration enzymatique sanguine associée à des maladies vasculaires.

*Objectifs:* on s'est donc fixé comme but d'établir la prévalence du polymorphisme du gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) chez les diabétiques et en comparer les fréquences avec celles de la population générale, afin d'établir s'il existe une relation entre le locus et le diabète mellites.

*Matériel et méthode:* on a étudié 131 individus diabétiques selon les critères de l'American Association. On a trouvé les fréquences génotypiques et génétiques du polymorphisme InDel du gène de l'ECA, au moyen de la technique de réaction à la chaîne de la polymérase (PCR).

*Résultats:* il n'y a pas eu de différences significatives à la prévalence du marqueur étudié entre les diabétiques et la population générale. Les fréquences génétiques trouvées chez des diabétiques furent de 0,435 pour allèle I et de 0,565 pour allèle D versus 0,440 allèle I et 0,560 allèle D dans la population générale.

*Discussion:* bref, ce marqueur est un facteur de risque pas associé au diabète proprement dit, mais la relation de

ce gène et les troubles vasculaires serait la même pour les diabétiques que pour la population générale.

## Resumo

**Introdução:** está demonstrado que os pacientes diabéticos apresentam uma maior incidência de patologias micro y macrovasculares. Na pesquisa de possíveis determinantes aparece como candidato possível o gen da ECA que apresenta, de acordo ao polimorfismo Índio existente, um aumento da concentração enzimática no sangue associado a patologias vasculares.

**Objetivo:** estabelecer a prevalência do polimorfismo do gen da enzima convertidora de angiotensina (ECA), em pacientes diabéticos e comparar as frequências encontradas com as determinadas para a população em geral para verificar a existência de uma associação do locus com a diabetes mellitus.

**Material e método:** a população estudada estava composta por 131 indivíduos com diagnóstico confirmado de diabetes de acordo com os critérios da American Diabetes Association. As frequências gênicas e genotípicas do polimorfismo InDel do gen da ECA foram determinadas pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

**Resultados:** nao se encontraram diferenças significativas na prevalência do marcador estudado entre diabéticos e a população em geral. As frequências gênicas encontradas em diabéticos foram 0,435 para alelo I e 0,565 para alelo D e, 0,440 alelo I e 0,560 alelo D na população em geral.

**Discussão:** este marcador é um fator de risco que não está associado à diabetes, porém a relação entre este gen e as complicações vasculares seria a mesma para diabéticos que para a população em geral.

## Bibliografía

1. **American Diabetes Association.** Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2006; 29(Suppl 1): S43-S48.
2. **Bloomgarden ZT.** The Epidemiology of Complications. *Diabetes Care* 2002; 25(5): 924-32.
3. **American Diabetes Association.** Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2004; 27(Suppl 1):S5-S10.
4. **Lim HS, MacFadyen RJ, Lip GY.** Diabetes mellitus, the renin-angiotensin-aldosterone system, and the heart. *Arch Intern Med* 2004; 164(16): 1737-48.
5. **Arauz-Pacheco C, Parrott MA, Raskin P.** The treatment of hypertension in adult patients with diabetes. *Diabetes Care* 2002; 25(1): 134-47.
6. **Frechtel G, Taverna M, López A.** Genética de las complicaciones diabéticas crónicas. En: Ruiz M, Ruiz de Morosini Manal, 3ª edición, eds. *Diabetes mellitus*. Buenos Aires: Akadia, 2004: 85-100.
7. **Keavney B, McKenzie C, Parish S, Palmer A, Clark S, Youngman L, et al.** Large-scale test of hypothesised associations between the angiotensin-converting-enzyme insertion/deletion polymorphism and myocardial infarction in about 5000 cases and 6000 controls. *International Studies of Infarct Survival (ISIS) Collaborators. Lancet* 2000; 355(9202): 434-42.
8. **Molitch ME, DeFronzo RA, Franz MJ, Keane WF, Mogensen CE, Parving HH, et al; American Diabetes Association.** Nephropathy in diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27(Suppl 1): S79-83.
9. **Stoll M, Lorenzo M, Artucio MC, Esperón P, Raggio V.** Polimorfismos genómicos en el riesgo cardiovascular. *Bol CHSCV* 2006; 8(1): 25-9.
10. **Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, et al.** Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992; 359(6396): 641-4.
11. **Ruiz J, Blanché H, Cohen N, Velho G, Cambien F, Cohen D, et al.** 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* 1994; 91(9): 3662-5.
12. **Lee YJ, Tsai JC.** ACE gene insertion/deletion polymorphism associated with 1998 World Health Organization definition of metabolic syndrome in Chinese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2002; 25(6): 1002-8.
13. **Tkác I, Salagovic J, Kozárová M, Rosolová H, Molcányiová A, Mosorjáková D, et al.** Interaction between angiotensin-converting enzyme genotype and glycaemic control influences lipoprotein levels in type 2 diabetes mellitus. *Wien Klin Wochenschr* 2003; 115(1-2): 36-40.
14. **Huang XH, Rantalaiho V, Wirta O, Pasternack A, Koivula T, Hiltunen T, et al.** Relationship of the angiotensin-converting enzyme gene polymorphism to glucose intolerance, insulin resistance, and hypertension in NIDDM. *Hum Genet* 1998; 102(3): 372-8.
15. **Fujisawa T, Ikegami H, Kawaguchi Y, Hamada Y, Ueda H, Shintani M, et al.** Meta-analysis of association of insertion/deletion polymorphism of angiotensin I-converting enzyme gene with diabetic nephropathy and retinopathy. *Diabetologia* 1998; 41(1): 47-53.
16. **Katsuya T, Horiuchi M, Chen YD, Koike G, Pratt RE, Dzau VJ, et al.** Relations between deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and insulin resistance, glucose intolerance, hyperinsulinemia, and dyslipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15(6): 779-82.
17. **Ryan AS, Nicklas BJ, Berman DM, Ferrell RE.** The insertion/deletion polymorphism of the ACE gene is related to insulin sensitivity in overweight women. *Diabetes Care* 2001; 24(9): 1646-52.
18. **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.
19. **Zorrilla P, Mimbacas A, Gascue C, Javiel G, Cardoso H.** Prevalencia del polimorfismo I/D del gen de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en la población de Montevideo. *Rev Med Urug* 2006; 22(1): 17-21.
20. **Ferrero Petean RT, García MV.** Encuesta de prevalencia de la diabetes en Uruguay. Primera fase: Montevideo año 2004. *Arch Med Interna (Montevideo)* 2005; 27(1):7-12.
21. **Turnes AL.** Introducción a la historia de la diabetes mellitus, desde la Antigüedad hasta la era pre-insulínica [artículo en línea]. *DiarioSalud.net* 2007. <http://www.diariosalud.net/docs/HISTORIA%20DE%20LA%20DIABETES%20IV%20-%20Antonio%20L.%20Turnes.pdf> (consultado el 14-3-07).
22. **Gascue C, Mimbacas A, Sans M, Gallino JP, Bertoni B,**

- Hidalgo P, et al.** Frequencies of the four major Amerindian mtDNA haplogroups in the population of Montevideo, Uruguay. *Hum Biol* 2005; 77(6): 873-8.
23. **Luzardo G, Aznárez I, Crispino B, Mimbacas A, Martínez L, Poggio R, et al.** Cystic fibrosis in Uruguay. *Genet Mol Res* 2002; 1(1): 32-8.
24. **Mimbacas A, Trujillo J, Gascue C, Javiel G, Cardoso H.** Prevalence of vitamin D receptor gene polymorphism in a Uruguayan population and its relation to type 1 diabetes mellitus. *Genet Mol Res* 2007; 6(3): 534-42.
25. **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.
26. **Mimbacas A, Pérez-Bravo F, Hidalgo PC, 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.