

Óxido Nítrico e Sistema Cardiovascular: Ativação Celular, Reatividade Vascular e Variante Genética

Nitric Oxide and the Cardiovascular System: Cell Activation, Vascular Reactivity and Genetic Variant

Rodrigo Gonçalves Dias^{1,2}, Carlos Eduardo Negrão¹, Marta Helena Krieger²

Instituto do Coração - InCor (HCFMUSP)¹, São Paulo, SP; Labcardio - Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)², Campinas, SP - Brasil

Resumo

O óxido nítrico (NO), primariamente identificado como um fator relaxante derivado do endotélio, é um radical livre atuante na sinalização de diferentes processos biológicos. A identificação das isoformas das sintases do NO (NOS) e a subsequente caracterização dos mecanismos de ativação celulares das enzimas possibilitaram tanto a compreensão de parte das interações fisiológicas como a compreensão de parte dos mecanismos de doença, na qual o NO está envolvido. A isoforma endotelial da NOS (eNOS), expressa principalmente no endotélio vascular, desempenha importante papel na regulação da reatividade vascular e no desenvolvimento e na progressão da aterosclerose. Esta revisão tem o propósito de contextualizar o leitor sobre a estrutura da eNOS e seus mecanismos de ativação celular. Tendo em vista os avanços da biologia molecular, trataremos ainda dos conhecidos mecanismos de regulação da expressão gênica e do papel de variantes no código genético da eNOS associados a fenótipos cardiovasculares. Embora se reconheça a importância do NO como molécula ateroprotetora, nossa atenção estará voltada à revisão de literatura envolvendo NO e sua participação na modulação do fenótipo de vasodilatação muscular.

Introdução

A evidência primária de que o endotélio é um componente indispensável na regulação do tono vascular surgiu quando análises experimentais demonstraram que, na ausência dessa monocamada de epitélio pavimentoso, a vasodilatação induzida pela acetilcolina não ocorria. Naquele momento, Furchgott e Zawadzki¹ documentaram que, quando estimulado, o endotélio era capaz de liberar uma substância vasoativa que foi denominada fator relaxante derivado do

endotélio (EDRF, do inglês *endothelium-derived relaxing factor*). Passados alguns anos, o EDRF foi identificado por Ignarro e cols.² como o óxido nítrico (NO), um composto caracterizado em 1977 por Ferid Murad que, quando liberado por nitratos, causava relaxamento em células musculares lisas. Esse contexto rendeu a Robert F. Furchgott, Ferid Murad e Louis J. Ignarro o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1998 (fig. 1). Uma série de estudos foi responsável pela caracterização de que o endotélio libera outros EDRF como a prostaciclina (PGI₂) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF, do inglês *endothelium-derived hyperpolarizing factor*), além de fatores constritores derivados do endotélio (EDCF, do inglês *endothelium-derived contracting factors*), como a endotelina (ET-1), produtos da via da ciclo-oxigenase como o tromboxano A₂ (TXA₂) e espécies reativas de oxigênio como o ânion superóxido (O₂⁻)³. Essas descobertas associadas à caracterização do endotélio como um sensor biológico capaz de detectar qualquer estímulo mecânico, físico ou químico - e responder a ele - elevou-o ao posto de um tecido multifuncional que desempenha importante papel na homeostasia de todos os sistemas fisiológicos.

Óxido nítrico e sistema cardiovascular

O NO, uma molécula gasosa atuante na sinalização de diferentes processos biológicos, é um radical livre que apresenta um elétron desemparelhado na última camada e uma meia-vida de 4 a 8 segundos em meio aquoso oxigenado^{4,5}. Descrito como um gás lábil, capaz de livre difusão nas membranas celulares, tal característica colabora com sua alta atividade biológica⁶. O reconhecimento de que o endotélio vascular é um órgão ativo e que sua integridade favorece efeitos benéficos, como ação antioxidante, anti-inflamatória, anticoagulante, profibrinolítica, inibitória da adesão e migração de leucócitos, inibitória da proliferação e migração das células musculares lisas, inibitória da agregação e adesão plaquetária, veio ampliar ainda mais as múltiplas ações do NO⁷. Assim, esse cenário ateroprotetor é caracterizado por uma harmonia entre substâncias liberadas pelo endotélio, no qual o NO é citado como um dos compostos vasoativos de maior relevância. Caracterizada como uma desordem sistêmica que antecede a aterosclerose e suas complicações, a disfunção endotelial em artérias coronárias ateroscleróticas foi inicialmente demonstrada por Ludmer e cols.⁸ e, depois, relacionada à alteração na biodisponibilidade do NO⁹.

Na atual literatura, há concordância de que a reduzida atividade biológica do NO, causada tanto pela redução na síntese como pelo aumento da degradação pelo estresse

Palavras-chave

Óxido nítrico, óxido nítrico sintase tipo III, polimorfismo genético.

Correspondência: Rodrigo Gonçalves Dias •

Unidade de Hipertensão - Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 (2º andar; Bloco II) - Cerqueira César -
05403-000 - São Paulo, SP - Brasil
E-mail: diasrg99@yahoo.com.br
Artigo recebido em 12/02/09; revisado recebido em 26/06/09; aceito em
14/08/09.



Fig. 1 - Ganhadores do Prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina em 1998. Fonte: Disponível em: <<http://nobelprize.org>>.

oxidativo, tem sido identificada como o mecanismo de maior relevância no processo multifatorial na disfunção endotelial e na participação das principais disfunções cardiovasculares¹⁰. Assim, a redução na biodisponibilidade do NO e a consequente disfunção endotelial determinam, no ambiente vascular, o desencadeamento de eventos como alterações no tono, disfunções trombóticas, proliferação e migração de células musculares lisas (CML), e adesão de leucócitos¹¹. Na disfunção endotelial, ocorre também o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)¹², e estas podem reduzir a disponibilidade de NO endotelial por diferentes vias: inativação direta do NO por superóxido, com formação de peroxinitrito (ONOO⁻)¹³; redução na expressão e na atividade das sintases do NO, por causa das mudanças nos seus substratos ou cofatores, e no aumento dos níveis de dimetilarginina assimétrica (ADMA)¹⁴; e, ainda, desacoplamento da NOS endotelial causado pela oxidação aumentada de tetraidrobiopterina (BH₄)¹⁵.

O entendimento da complexidade da função endotelial e a dificuldade de se estudar cada um de seus componentes isoladamente vêm sendo superados. Nesse contexto, modelos animais capazes de reproduzir uma disfunção endotelial foram desenvolvidos, possibilitando, por exemplo, o funcionamento do sistema em condições de baixa ou aumentada biodisponibilidade de NO. Além disso, estudos *in vivo* em humanos, através da infusão intra-arterial de compostos com potencial em modular a função endotélio-dependente ou endotélio-independente, possibilitaram a investigação dos mecanismos moduladores da função vascular nas diferentes condições fisiológicas e doenças de maior prevalência.

Sintases de óxido nítrico

A produção enzimática do NO a partir do aminoácido L-arginina é mediada por uma família de três sintases de óxido nítrico (NOS), codificadas por genes distintos¹⁶. As isoformas compartilham 50%-60% de homologia na sequência de aminoácidos, nos domínios oxidase e reductase¹⁷. Essas isoformas exibem características distintas que refletem suas funções específicas *in vivo*¹⁸.

A sintase endotelial do óxido nítrico (eNOS ou NOS III; 7q35-36) e a sintase neuronal do óxido nítrico (nNOS ou NOS I; 12q24.2) possuem mecanismo de ativação constitutivo (cNOS). A isoforma induzida (iNOS ou NOS II; 17cen-q12) encontra-se expressa em processos celulares anormais como na insuficiência cardíaca¹⁹, induzidas por citocinas e agentes inflamatórios, o que resulta em alto fluxo de NO^{20,21}. A eNOS, encontrada principalmente nas células endoteliais em compartimentos denominados cavéolas²², é essencial para a manutenção do tono vascular basal. Esse tono é, em parte, mediado pela síntese do NO, um composto vasoativo participante na regulação do fluxo sanguíneo nos diversos leitos vasculares e, particularmente, no fluxo sanguíneo coronariano²³. A localização subcelular da síntese de NO exerce grande influência na sua atividade biológica. Na década de 1990, a identificação inicial da localização da eNOS na cavéola, na membrana plasmática das células, forneceu a base estrutural para o reconhecimento da compartimentalização nos mecanismos de sinalização celular promovido pelo NO. A subsequente observação de que a eNOS interage diretamente com as proteínas estruturais da cavéola, as caveolinas, forneceu a evidência bioquímica da interação entre eNOS e cavéola e a sua implicação com numerosas moléculas de

sinalizações concentradas nesse ambiente da membrana celular²⁴. Um grande número de evidências revelou que as cavéolas são capazes de recrutar numerosas moléculas de sinalização e regular suas atividades em vez de servirem como simples suporte para a troca e o transporte celulares²⁵. Assim, foi descrito que a eNOS localiza-se dentro da cavéola e é mantida em um estado menos ativo via sua interação com a caveolina-1²⁶.

Estrutura da eNOS

A eNOS funciona como um dímero, constituída de dois monômeros idênticos, que, por sua vez, podem ser divididos funcional e estruturalmente em dois domínios principais: um domínio C-terminal redutase, homólogo ao citocromo P450 e que contém sítios de ligação para NADPH, flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD), e um domínio N-terminal oxidase, que abstrai um elétron do substrato L-arginina e possui sítios de ligação para o ferro heme, para o cofator tetraidrobiopterina (BH₄) e para a L-arginina^{20,21,27} (fig. 2). A reação de catálise

das NOS constitutivas envolve dois estágios de oxidação: a hidroxilação da L-arginina em N^G-hidroxi-L-arginina, seguida da oxidação deste intermediário com utilização de um elétron da NADPH, formando L-citrulina e NO²⁸. Essa reação consome 1,5 mol de NADPH e 2 mols de oxigênio por mol de L-citrulina formada^{16,29,30}. Cofatores como ferro heme, BH₄ e L-arginina têm sido particularmente estudados, e a baixa biodisponibilidade destes induz ao fenômeno da eNOS disfuncional³¹⁻³³. O ferro heme é essencial para a dimerização das três isoformas³⁴, baixas concentrações ou ausência de L-arginina catalisam a redução do oxigênio em superóxido (O₂⁻)³⁵, e níveis diminuídos de BH₄ levam à produção simultânea de NO e O₂⁻, produtos que reagem entre si formando peroxinitrito (ONOO⁻)³⁶.

Regulação da expressão gênica e da atividade da eNOS

Uma vez verificado que as células endoteliais contêm uma concentração basal da proteína eNOS, o gene da eNOS foi considerado constitutivamente expresso. Interessantemente,

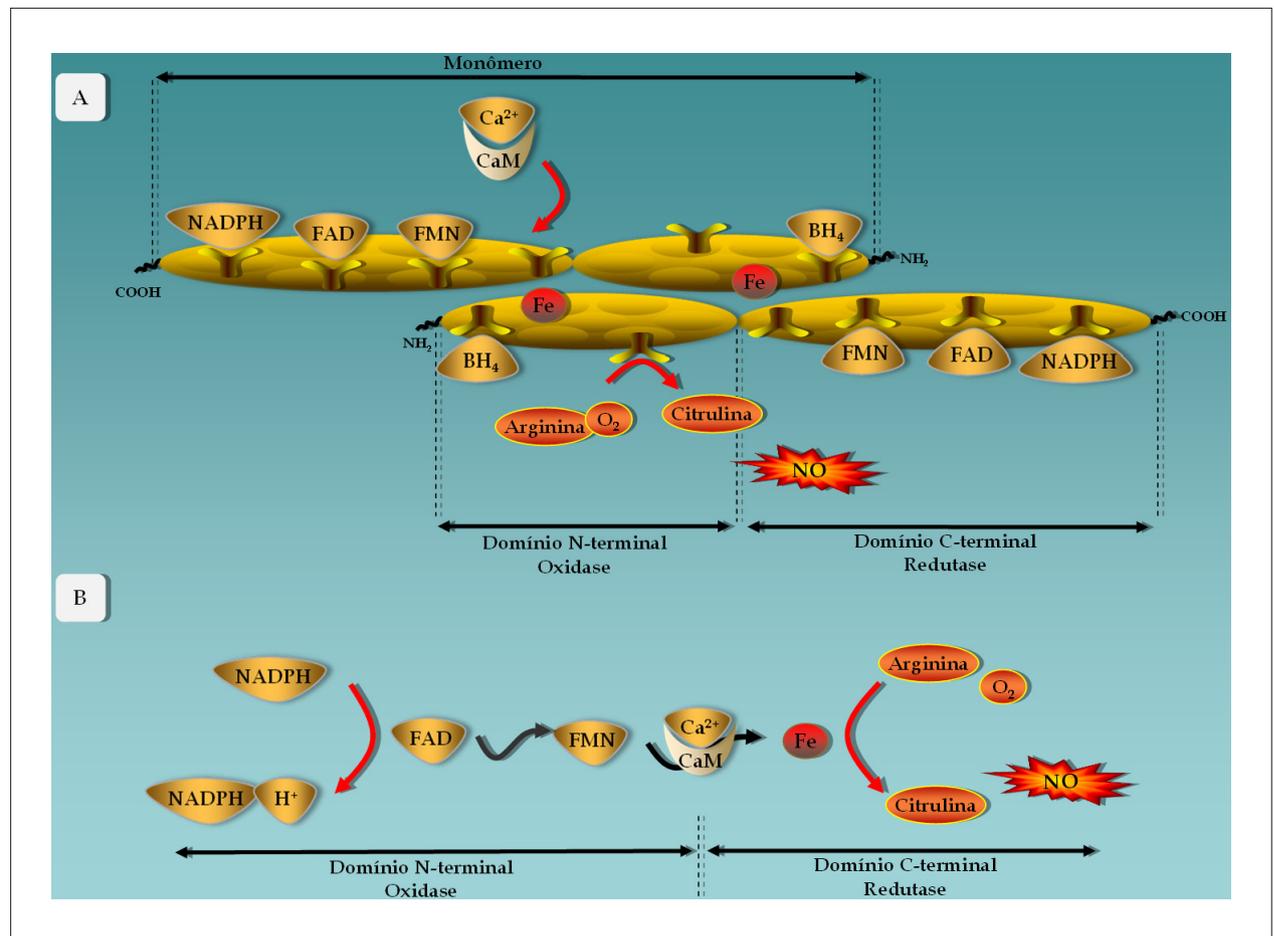


Fig. 2 - A) Modelo proposto para a estrutura dimérica da eNOS. **B)** Transferência de elétrons entre os cofatores e substratos da estrutura enzimática. O elétron flui no sentido NADPH → FAD → FMN do domínio redutase de um monômero para o Fe do domínio oxidase do monômero contralateral. Na figura A, observe que o fluxo de elétrons e a catálise da arginina são mostrados em apenas um lado da enzima. A transferência de elétrons de um domínio para o outro é mediada pela calmodulina, o que justifica a necessidade de sua ligação ao sítio de reconhecimento para ativação da enzima e consequente síntese de NO. FAD - flavina adenina dinucleotídeo; FMN - flavina mononucleotídeo; BH₄ - tetraidrobiopterina; Fe - ferro heme; CaM - calmodulina.

estudos posteriores demonstraram que concentrações estáveis do mRNA são sujeitas a um modesto nível de regulação³⁷. A região promotora do gene da eNOS foi clonada, demonstrando possuir um complexo mecanismo de regulação da expressão gênica. Semelhante à região promotora de genes constitutivamente expressos, a região promotora do gene da eNOS não contém a sequência TATA Box. No entanto, possui múltiplas sequências DNA *cis*-regulatórias, incluindo CCAT box, sítios Sp1, GATA motifs, CACCC box, sítios AP-1 e AP-2, região de ligação p53, elementos NF-1, além de sequências responsivas a elementos esteróis e *shear stress*³⁸. As sequências promotoras humana e bovina apresentam 75% de homologia, sugerindo uma alta conservação evolutiva da regulação transcricional do gene. Localizados na região promotora proximal, os domínios regulatórios positivos I e II (PRD I e PRD II) estão envolvidos na regulação basal da transcrição gênica, apresentando afinidade pelos fatores de transcrição Sp-1, Sp-3, Ets-1, Elf-1, YY1 e proteína MYC-associated zinc finger³⁹. Estudos *in vitro* demonstraram que a responsividade do promotor da eNOS ao *shear stress* é dependente de sequências localizadas entre -1.000 e -975, região relativa à inicialização da transcrição^{40,41}. Além disso, a ligação das subunidades p50 e p65 do NF- κ B ao elemento responsivo GAGACC (-990; -984), localizado anteriormente ao sítio de inicialização da transcrição, está envolvida na ativação do promotor pelo *shear stress*⁴². E ainda, a transcrição em células endoteliais bovina submetidas a fluxo laminar apresentou aumento de 9 vezes do mRNA. Esse efeito foi mediado por dois mecanismos distintos: 1. aumento transiente da transcrição do gene e 2. subsequente meia-vida prolongada do mRNA⁴³.

O mecanismo de ativação da eNOS tem sido descrito como o mais elaborado das três isoformas, refletindo a complexidade do controle fisiológico dos diferentes leitos vasculares^{17,44}. O mecanismo clássico de ativação das isoformas constitutivas é dependente do cálcio (Ca⁺⁺), enquanto a iNOS independe da elevação das concentrações intracelulares de Ca⁺⁺, por causa da alta afinidade da ligação da enzima com a calmodulina^{31,39,44}.

A complexidade dos mecanismos de regulação pós-transcricionais da eNOS tem sido considerada, tanto como consequência da dimerização das subunidades da proteína quanto em função do papel da proteína caveolina na formação da estrutura caveolar⁴⁵. A eNOS localiza-se dentro da cavéola e é mantida em um estado menos ativo via sua interação com a caveolina-1²⁶. Os mecanismos de migração da membrana celular para o complexo de Golgi e as fosforilações Akt, PKA e AMPK-quinase dependentes são descritos como responsáveis pela ativação dessa isoforma da NOS. Assim, a interação mantém a eNOS inativa, e a calmodulina atua diretamente, competindo com a caveolina, para promover a ativação cálcio-dependente da enzima¹⁵. A atividade da eNOS é bem conhecida no ambiente vascular e é regulada por seis mecanismos após a sua tradução: inclusão de lipídios, mecanismo cálcio/calmodulina dependente, interações diretas proteína-proteína, diferentes fosforilações sítio dirigidas, glicosilação e disponibilidade de substratos e cofatores. Assim, a eNOS pode interagir com várias proteínas em seus estados “menos ativos” ou “mais ativos”. São requeridas etapas de

N-meristolação e palmitação da eNOS ligada a plamalema, que, neste estado, encontra-se associada a caveolina-1 e a HSP 90. A proteína que faz interação com a HSP70, denominada “CHIP”, interage com ambas HSP70 e HSP90, e regula negativamente o tráfego da eNOS para o complexo de Golgi, em contraste com a “NOSIP” e “NOSTRIN” que podem regular negativamente a localização da eNOS na membrana plasmática. O principal mecanismo de ativação da eNOS se dá pela fosforilação do aminoácido serina na posição 1177⁴⁶ pela enzima Akt-quinase (ou proteína quinase B), o que aumenta a sensibilidade da eNOS às concentrações basais de Ca⁺⁺/calmodulina⁴⁷. A ativação tônica ou física da eNOS em resposta ao fluxo sanguíneo é independente das alterações na concentração do Ca⁺⁺ e constitui-se do *shear-stress*. Dimmeler e cols.⁴⁸ demonstraram que a troca do resíduo de serina^{1177/1179} pelo aminoácido alanina torna a eNOS incapaz de responder à fosforilação e ativação pela enzima Akt, uma via dependente de fosfatidilinositol-3 quinase (PI-3K). Embora a fosforilação do resíduo de serina¹¹⁷⁷ desempenhe um papel preponderante na ativação enzimática da eNOS, é sabido que sua regulação também depende do padrão de fosforilação de outros sítios atualmente bem caracterizados⁴⁹. A fosforilação do resíduo de serina⁶³³, localizado no domínio de ligação da flavina mononucleotídeo (FMN), também aumenta a atividade da eNOS e parece ser particularmente importante na manutenção da síntese de NO após a ativação por Ca⁺⁺/calmodulina e fosforilação do resíduo de serina¹¹⁷⁷. Fosforilado pela proteína quinase C (PKC), o resíduo de treonina⁴⁹⁵ interfere com o domínio de ligação da calmodulina, regulando negativamente a síntese do NO.

Recentes estudos têm avaliado a capacidade de determinados fármacos na redução da disfunção endotelial, como os antioxidantes e bloqueadores do sistema renina-angiotensina, por meio dos mecanismos de ativação da eNOS via fosforilação dos sítios específicos como o resíduo de serina¹¹⁷⁷. Essa fosforilação pode ser afetada pela localização subcelular da enzima, tais como cavéola, junções intercelulares, complexo de Golgi e compartimentos citosólicos, bem como por quinases proteicas e fosfatases associadas a essas estruturas. Recentemente, nosso grupo⁵⁰ demonstrou que o Telmisartan, bloqueador do receptor de angiotensina II, promove redução da disfunção endotelial por meio da ativação da eNOS via fosforilação de sítios específicos, como o resíduo de serina¹¹⁷⁷ e serina⁶³⁵.

Óxido nítrico, tono vascular e vasodilatação muscular

Após a verificação de que o NO é sintetizado pelas células endoteliais e que ele participa da regulação hemodinâmica cardiovascular, o interesse passou a se concentrar na quantificação de sua participação na homeostasia desse sistema. Estudos *in vivo* em indivíduos saudáveis demonstraram que a administração intra-arterial de N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), um bloqueador inespecífico da atividade das NOS, reduz o fluxo sanguíneo local entre 25% e 50%⁵¹. Embora o tono vascular basal seja o produto das forças constritoras versus forças vasodilatadoras, esses resultados demonstram que o NO é, pelo menos em parte, o modulador do fenótipo em questão.

Durante condições de estresse mental e exercício, é observado, juntamente com a resposta taquicárdica e o aumento da pressão arterial, vasodilatação em leito muscular esquelético como parte das respostas fisiológicas de ajuste do organismo. Foi postulado que parte dessa resposta vasodilatadora muscular seria modulada por um componente neural, o que ficou evidente posteriormente pela existência de fibras simpáticas colinérgicas para a musculatura esquelética de algumas espécies de mamíferos, com exceção de primatas e humanos. Verificou-se que a estimulação elétrica do nervo simpático provocava vasodilatação em leito muscular humano quando a liberação pré-sináptica de noradrenalina era inibida pela infusão intra-arterial de fármacos. No entanto, essa resposta vasodilatadora mostrou-se atenuada quando um antagonista muscarínico foi administrado^{52,53}. Posteriormente, ficou evidente que o NO constitui-se, pelo menos em parte, como o modulador da resposta vasodilatadora verificada quando fibras simpáticas colinérgicas são estimuladas⁵⁴. De fato, Blair e cols.⁵⁵ já haviam evidenciado que, em humanos, a vasodilatação no antebraço, durante manobras fisiológicas, é mediada por um componente neural. Durante a aplicação do estresse mental, o fluxo sanguíneo no membro simpatectomizado não se alterava, quando comparado ao fluxo sanguíneo no membro controle. Além disso, a infusão intra-arterial de atropina no membro controle reduzia em aproximadamente 50% o aumento no fluxo sanguíneo. Naquele momento, utilizando-se das evidências indiretas, os autores sugeriram a existência de inervação simpática colinérgica para a musculatura esquelética de humanos. Mimetizando os experimentos em animais, mais tarde os estudos de Dietz e cols.^{56,57} deixaram evidente que parte da resposta vasodilatadora muscular, medida no antebraço, durante o estresse mental ou o exercício é atenuada com a administração intra-arterial do L-NMMA. Os mecanismos pelos quais a acetilcolina e o NO são sintetizados e liberados durante as reações de defesa do organismo não estão completamente elucidados em humanos. As evidências alcançadas com bloqueios farmacológicos permitem apenas sugerir a existência de fibras simpáticas colinérgicas para a musculatura esquelética. Decorrente de tais limitações, os autores não descartam a possibilidade de que a vasodilatação seja causada por uma combinação entre fatores circulantes e locais. Uma pequena parte das células endoteliais poderia sintetizar e liberar acetilcolina⁵⁸. Além disso, a ativação de receptores β_2 -adrenérgicos localizados no músculo liso vascular resultaria no relaxamento desse tecido e, em consequência, na vasodilatação. No entanto, Majmudar e cols.⁵⁹ verificaram que parte da vasodilatação resultante da ativação dos β_2 -adrenoceptores é mediada pelo NO. Embora os autores não expliquem o mecanismo responsável por esse fenômeno, aproximadamente 25% da vasodilatação observada no antebraço com a infusão de Ritodrine (agonista seletivo β_2 -adrenérgico) foi atenuada com a coinfusão de L-NMMA. Esses resultados sugerem a existência dos β_2 -adrenoceptores no endotélio vascular, contribuindo para o aumento da atividade da eNOS. Além disso, o aumento da estimulação mecânica do endotélio vascular resultaria em síntese aumentada de NO, via PI-3K-Akt quinase, com subsequente fosforilação do resíduo de serina¹¹⁷⁷.

Polimorfismos da eNOS e estudos funcionais da variante G894T

Genotipada e sequenciada em 1993 por Marsden e cols.³⁸ (GenBank D26607), a eNOS está localizada no cromossomo 7q35-36, e variações em sua sequência têm sido descritas na região promotora, éxons e íntrons²⁷. O gene (21-22 kbp) compreende 26 éxons e 25 íntrons com 133 kDa. A sequência polipeptídica gerada contém 1.203 aminoácidos³⁸. Já está descrita na literatura a existência de três polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) na região promotora, em localizações de não ligação de fatores de transcrição³⁹. Nos íntrons 2, 11, 12, 18, 22 e 23, foram encontrados SNP⁶⁰ e polimorfismos de sequências repetidas nos íntrons 2, 4, 8 e 13^{38,61}. Dos polimorfismos encontrados nos éxons 6 e 7, a substituição da base nitrogenada guanina por timina (G→T), na posição 894 localizada no éxon 7, resulta na substituição do aminoácido glutamato (GAG) por aspartato (GAT) na posição 298 da sequência polipeptídica⁶². Sugere-se que os polimorfismos localizados na região promotora do gene desempenham influência na transcrição do RNAm, enquanto os polimorfismos localizados em regiões codificadoras podem resultar em alteração de atividade enzimática⁶³.

O resíduo 298 está localizado externamente no domínio oxidase da enzima, sítios de ligação para L-arginina ou BH₄. Estudos enzimáticos que utilizaram eNOS recombinante mostraram não haver diferença na constante de Michaelis (k_m) nem na $V_{máx}$ entre as duas formas da enzima⁶³. Embora a atividade enzimática pareça não ser afetada pela forma Asp²⁹⁸ da enzima, Tesouro e cols.⁶⁴ mostraram que essa variante apresenta maior suscetibilidade à clivagem proteolítica em fragmentos de 100 e 35 KDa, precisamente na posição Asp²⁹⁸-Pro²⁹⁹, quando comparada à variante Glu²⁹⁸. No entanto, Fairchild e cols.⁶⁵ demonstraram que tal suscetibilidade proteolítica ocorria por causa de um artefato da preparação do experimento. A inconsistência desses resultados não exclui a possibilidade de que, *in vivo*, um desconhecido mecanismo proteolítico, ou até mesmo uma alteração na regulação pós-transcricional, possa estar sendo modulado pela variante Asp²⁹⁸ da enzima.

Associação da variante G894T do gene da eNOS com fenótipos cardiovasculares

Diversas doenças têm sido associadas a anormalidades na biossíntese do NO, e muitas dessas condições estão relacionadas à disfunção autonômica. Estudos em genética populacional têm demonstrado importante associação do polimorfismo G894T do gene da eNOS com doença arterial coronariana (DAC)⁶⁶⁻⁶⁸ e também com o espasmo coronariano induzido por acetilcolina (Ach)⁶⁹. Entre as disfunções cardiovasculares, foi ainda verificado que a variante G894T encontra-se associada à hipertensão arterial^{70,71}, embora essa associação não tenha sido verificada em outras populações^{72,73}.

A correlação entre genótipo e fenótipo clínico varia quantitativa e qualitativamente, e a inconsistente associação entre o polimorfismo da eNOS e vários fenótipos clínicos é um fenômeno frequentemente observado em outros genes associados a fenótipos²⁷. Essa inconsistência tem sido atribuída a

fatores ambientais, alelos independentes, interação entre genes e variabilidades em fenótipos clínicos. A importância dos fatores ambientais na gênese de doenças reflete-se nas diferenças de morbidade e mortalidade entre grupos geneticamente homogêneos, porém com estilos de vida diferentes.

Uma variação genética pode não ser relevante a uma determinada população, refletindo diferenças na frequência da distribuição dos alelos. Um exemplo disso é a frequência do alelo 894T que é significativamente maior em populações brancas quando comparado à população japonesa²³. A inconsistente associação entre o polimorfismo da eNOS e as alterações vasculares ainda tem sido atribuída à variação na distribuição da eNOS em diferentes órgãos. Artérias de órgãos específicos são sujeitas a diferentes pressões hemodinâmicas, determinando a resposta da parede do vaso e o consequente grau de disfunção endotelial²⁷.

Philip e cols.⁶² observaram, em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização, que a reatividade vascular à infusão de fenilefrina (PE) é influenciada pela variante G894T do gene da eNOS. A resposta vasoconstritora dose-dependente à PE foi significativamente maior para os alelos TT e GT, quando comparada ao grupo homocigoto GG, indicando que a reatividade vascular às drogas vasoconstritoras pode ser influenciada pelo polimorfismo da eNOS em humanos. A maior resposta dose-dependente dos pacientes com a variante 894T sugere uma reduzida biossíntese do NO. A administração sistêmica de N^G-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) provoca hipertensão em humanos^{74,75}. Segundo Frandsenn e cols.⁷⁶, a administração de 4 mg/kg de L-NAME em humanos reduz em 67% a atividade da eNOS. A possível biodisponibilidade reduzida do NO, em consequência das variações no gene da eNOS, é um importante candidato para a suscetibilidade ao desenvolvimento da disfunção endotelial^{62,63} e à alteração da modulação da atividade nervosa simpática sobre o vaso⁷⁷.

As pesquisas que demonstraram associação da variante G894T do gene da eNOS com fenótipos cardiovasculares apontam para uma possível redução da biodisponibilidade do NO, sugerindo que a eNOS transcrita do alelo mutante apresenta atividade enzimática alterada. A falta de evidências sobre este racional nos incentivou a testar a funcionalidade da variante genética no fenótipo de vasodilatação muscular⁷⁸. Se a variante G894T do gene da eNOS fosse capaz de diminuir a atividade enzimática, indivíduos portadores do alelo mutante (T) apresentariam menor aumento do fluxo sanguíneo muscular em resposta ao exercício isométrico de *handgrip*. Para testar tal hipótese, 287 indivíduos foram genotipados, e, dentre eles, selecionaram-se 33 saudáveis para representar três genótipos: GG (*wild-type*), GT e TT. Como resultado, a atenuada vasodilatação muscular reflexa ao exercício ocorreu apenas no genótipo TT, uma vez que a vasodilatação entre os heterocigotos (genótipo GT) foi similar àquela observada entre os indivíduos homocigotos para o alelo G (genótipo GG). Esses resultados sugerem que a presença do alelo G é o suficiente para superar a possível deficiência do alelo T. Análises subsequentes *in vivo* comprovaram que a atenuada vasodilatação muscular observada no genótipo TT é consequência da reduzida vasodilatação mediada pela eNOS, uma vez que a infusão intra-arterial de L-NMMA não alterou a resposta vasodilatadora ao exercício nesse genótipo.

Em contraste, o L-NMMA reduziu de forma significativa a resposta vasodilatadora ao exercício no genótipo GG, para valores similares aos do genótipo TT. Além disso, nosso estudo demonstrou que a atenuada vasodilatação muscular observada no genótipo TT não pode ser creditada a um possível tônus simpático vasoconstritor aumentado. De fato, a atividade nervosa simpática muscular, medida diretamente no nervo fibular pela técnica de microneurografia, aumentou de forma semelhante entre os genótipos durante o exercício. Embora esses resultados não confirmem a funcionalidade do alelo T na alteração da atividade enzimática (essa variante pode estar em desequilíbrio de ligação com outra variante funcional no mesmo gene ou em um gene próximo no mesmo cromossomo), podem ser utilizados como um marcador da disfunção observada do fenótipo de vasodilatação muscular. Esta é a primeira demonstração de que a variante G894T do gene da eNOS está funcionalmente associado à reduzida vasodilatação mediada pela eNOS. Além disso, tais resultados sugerem que a reduzida vasodilatação endotélio-dependente possa antecipar uma disfunção vascular em indivíduos portadores do genótipo TT.

Conclusão

A verificação de que as sintases de NO são constitutivamente expressas (eNOS e nNOS) e que o NO desempenha importante função na regulação das atividades cardiovasculares aumentou o interesse pelo entendimento dos mecanismos celulares e moleculares que regem sua funcionalidade. Embora esses mecanismos sejam complexos e de difícil acesso, uma parcela deles já foi elucidada, permitindo parcial compreensão da biologia do NO. Nesse contexto, os avanços nas técnicas de biologia molecular possibilitaram a identificação de variantes no código genético humano que pudessem explicar, pelo menos em parte, a variação de resposta fenotípica entre indivíduos. Os estudos de associação em genética não são fáceis de compreender. Um único gene pode desempenhar de média a moderada participação na regulação de um fenótipo multigênico, e, nessa situação, uma determinada variante genética funcional nesse gene poderia explicar apenas uma pequena parcela da variação de resposta do fenótipo. O rastreamento de genes candidatos, ou seja, a identificação de múltiplos genes e seus respectivos polimorfismos desencadeantes de variações na função cardiovascular, caminha para o momento em que parte do diagnóstico e da conduta adotados para o tratamento será baseada na medicina genômica.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado pela FAPESP.

Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Rodrigo Gonçalves Dias pela Universidade Estadual de Campinas e Instituto do Coração - InCor (HCFMUSP) de São Paulo.

Referências

1. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 288: 373-6.
2. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84: 9265-9.
3. Vila E, Salaices M. Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 288: H1016-21.
4. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. The biological significance of nitric oxide formation from L-arginine. *Biochem Soc Trans*. 1989; 17: 642-4.
5. Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res*. 1999; 43: 562-71.
6. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327: 524-6.
7. Förstermann U. Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal. *Biol Chem*. 2006; 387 (12): 1521-33.
8. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1986; 315: 1046-51.
9. Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ. Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. *Circulation*. 2003; 108: 2054-9.
10. Pepine CJ. The impact of nitric oxide in cardiovascular medicine: untapped potential utility. *Am J Med*. 2009; 122 (5 Suppl): S10-5.
11. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25: 29-38.
12. Cai H. NAD(P)H oxidase-dependent self-propagation of hydrogen peroxide and vascular disease. *Circ Res*. 2005; 96: 818-22.
13. Gao L, Mann GE. Vascular NAD(P)H oxidase activation in diabetes: a double-edged sword in redox signalling. *Cardiovasc Res*. 2009; 82 (1): 9-20.
14. De Gennaro Colonna V, Bianchi M, Pascale V, Ferrario P, Morelli F, Pascale W, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and a novel cardiovascular risk molecule. *Med Sci Monit*. 2009; 15 (4): RA91-101.
15. Sessa WC. eNOS at a glance. *J Cell Sci*. 2004; 117: 2427-9.
16. Marletta MA. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*. 1994; 78: 927-30.
17. Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001; 280: F193-206.
18. Stuehr DJ. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997; 37: 339-59.
19. Ferreiro CR, Chagas AC, Carvalho MH, Dantas AP, Scavone C, Souza LC, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase is increased in patients with heart failure due to ischemic disease. *Braz J Med Biol Res*. 2004; 37: 1313-20.
20. Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res*. 1999; 43: 521-31.
21. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001; 357: 593-615.
22. Shaul PW, Anderson RG. Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am J Physiol*. 1998; 275: L843-51.
23. Wang XL, Sim AS, Wang MX, Murrell GA, Trudinger B, Wang J. Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *FEBS Lett*. 2000; 471: 45-50.
24. Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, et al. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin: functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem*. 1997; 272: 25437-40.
25. Razani B, Lisanti MP. Caveolin-deficient mice: insights into caveolar function human disease. *J Clin Invest*. 2001; 108: 1553-61.
26. Buccì M, Gratton JP, Rudic RD, Acevedo L, Roviezzo F, Cirino G, et al. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat Med*. 2000; 6: 1362-7.
27. Wang XL, Wang J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Mol Genet Metab*. 2000; 70: 241-51.
28. Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol*. 2003; 199: 8-17.
29. Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol*. 1995; 57: 707-36.
30. Korth HG, Sustmann R, Thater C, Butler AR, Ingold KU. On the mechanism of the nitric oxide synthase-catalyzed conversion of N omega-hydroxyl-L-arginine to citrulline and nitric oxide. *J Biol Chem*. 1994; 269: 17776-9.
31. Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest*. 1997; 100: 2153-7.
32. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 9220-5.
33. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000; 87: 840-4.
34. Klatt P, Pfeiffer S, List BM, Lehner D, Glatter O, Bachinger HP, et al. Characterization of heme-deficient neuronal nitric-oxide synthase reveals a role for heme in subunit dimerization and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem*. 1996; 271: 7336-42.
35. Mayer B, John M, Heinz B, Werner ER, Wachter H, Schultz G, et al. Brain nitric oxide synthase is a biopterin- and flavin-containing multi-functional oxidoreductase. *FEBS Lett*. 1991; 288: 187-91.
36. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*. 1996; 271: C1424-37.
37. Searles CD. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006; 291: C803-16.
38. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem*. 1993; 268: 17478-88.
39. Karantzioulis-Fegaras F, Antoniou H, Lai SL, Kulkarni G, D'Abreo C, Wong GK, et al. Characterization of the human endothelial nitric-oxide synthase promoter. *J Biol Chem*. 1999; 274: 3076-93.
40. Malek AM, Jiang L, Lee I, Sessa WC, Izumo S, Alper SL. Induction of nitric oxide synthase mRNA by shear stress requires intracellular calcium and G-protein signals and is modulated by PI 3 kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 254: 231-42.
41. Silacci P, Formentin K, Bouzourene K, Daniel F, Brunner HR, Hayoz D. Unidirectional and oscillatory shear stress differentially modulate NOS III gene expression. *Nitric Oxide*. 2000; 4: 47-56.
42. Davis ME, Grumbach IM, Fukai T, Cutchins A, Harrison DG. Shear stress regulates endothelial nitric-oxide synthase promoter activity through nuclear factor kappaB binding. *J Biol Chem*. 2004; 279: 163-8.
43. Davis ME, Cai H, Drummond GR, Harrison DG. Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways. *Circ Res*. 2001; 89: 1073-80.
44. Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest*. 1997; 100: 2146-52.
45. Zhang Q, Church JE, Jagnandan D, Catravas JD, Sessa WC, Fulton D. Functional relevance of Golgi- and plasma membrane-localized endothelial NO synthase in reconstituted endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26: 1015-21.
46. Boo YC, Kim HJ, Song H, Fulton D, Sessa W. Coordinated regulation of endothelial nitric oxide synthase activity by phosphorylation and subcellular

- localization. *Free Radic Biol Med.* 2006; 41 (1): 144-53.
47. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature.* 1999; 399: 597-601.
48. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 1999; 399: 601-5.
49. Mount PF, Kemp BE, Power DA. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol.* 2007; 42: 271-9.
50. Krieger MH, Di Lorenzo A, Sessa W. Telmisartan reverts endothelial dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009. In press.
51. Joyner MJ, Dietz NM. Nitric oxide and vasodilation in human limbs. *J Appl Physiol.* 1997; 83: 1785-96.
52. Abrahams VC, Hilton SM. The role of active muscle vasodilation in the alerting stage of the defence reaction. *J Physiol.* 1964; 171: 189-202.
53. Bolme P, Fuxe K. Adrenergic and cholinergic nerve terminals in skeletal muscle vessels. *Acta Physiol Scand.* 1970; 78: 52-9.
54. Matsukawa K, Shindo T, Shirai M, Ninomiya I. Nitric oxide mediates cat hindlimb cholinergic vasodilation induced by stimulation of posterior hypothalamus. *Jpn J Physiol.* 1993; 43: 473-83.
55. Blair DA, Glover WE, Greenfield AD, Roddie IC. Excitation of cholinergic vasodilator nerves to human skeletal muscles during emotional stress. *J Physiol.* 1959; 148: 633-47.
56. Dietz NM, Rivera JM, Warner DO, Joyner MJ. Is nitric oxide involved in cutaneous vasodilation during body heating in humans? *J Appl Physiol.* 1994; 76: 2047-53.
57. Dietz NM, Engelke KA, Samuel TT, Fix RT, Joyner MJ. Evidence for nitric oxide-mediated sympathetic forearm vasodilatation in humans. *J Physiol.* 1997; 498 (Pt 2): 531-40.
58. Milner P, Kirkpatrick KA, Ralevic V, Toothill V, Pearson J, Burnstock G. Endothelial cells cultured from human umbilical vein release ATP, substance P and acetylcholine in response to increased flow. *Proc Biol Sci.* 1990; 241: 245-8.
59. Majumdar NG, Anumba D, Robson SC, Ford GA. Contribution of nitric oxide to beta2-adrenoceptor mediated vasodilatation in human forearm arterial vasculature. *Br J Clin Pharmacol.* 1999; 47: 173-7.
60. Poirier O, Mao C, Mallet C, Nicaud V, Herrmann SM, Evans A, et al. Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene - no consistent association with myocardial infarction in the ECTIM study. *Eur J Clin Invest.* 1999; 29: 284-90.
61. Miyahara K, Kawamoto T, Sase K, Yui Y, Toda K, Yang LX, et al. Cloning and structural characterization of the human endothelial nitric-oxide-synthase gene. *Eur J Biochem.* 1994; 223: 719-26.
62. Philip I, Plantefevre G, Vuillaumier-Barrot S, Vicaut E, LeMarie C, Henrion D, et al. G894T polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with an enhanced vascular responsiveness to phenylephrine. *Circulation.* 1999; 99: 3096-8.
63. Hingorani AD. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis: John French Lecture 2000. *Atherosclerosis.* 2001; 154: 521-7.
64. Tesaro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP, Moss J. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 2832-5.
65. Fairchild TA, Fulton D, Fontana JT, Gratton JP, McCabe TJ, Sessa WC. Acidic hydrolysis as a mechanism for the cleavage of the Glu(298)-->Asp variant of human endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2001; 276: 26674-9.
66. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, et al. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation.* 1999; 100: 1515-20.
67. Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension.* 1998; 32: 521-6.
68. Shimasaki Y, Yasue H, Yoshimura M, Nakayama M, Kugiyama K, Ogawa H, et al. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 1998; 31: 1506-10.
69. Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H, Sugiyama S, et al. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet.* 1998; 103: 65-9.
70. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension.* 1998; 32: 3-8.
71. Lacolley P, Gautier S, Poirier O, Pannier B, Cambien F, Benetos A. Nitric oxide synthase gene polymorphisms, blood pressure and aortic stiffness in normotensive and hypertensive subjects. *J Hypertens.* 1998; 16: 31-5.
72. Kato N, Sugiyama T, Morita H, Nabika T, Kurihara H, Yamori Y, et al. Lack of evidence for association between the endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension. *Hypertension.* 1999; 33: 933-6.
73. Benjafeld AV, Morris BJ. Association analyses of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in essential hypertension. *Am J Hypertens.* 2000; 13: 994-8.
74. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet.* 1989; 2: 997-1000.
75. Haynes WG, Noon JP, Walker BR, Webb DJ. Inhibition of nitric oxide synthesis increases blood pressure in healthy humans. *J Hypertens.* 1993; 11: 1375-80.
76. Frandsen U, Bangsbo J, Sander M, Hoffner L, Betak A, Saltin B, et al. Exercise-induced hyperaemia and leg oxygen uptake are not altered during effective inhibition of nitric oxide synthase with N(G)-nitro-L-arginine methyl ester in humans. *J Physiol.* 2001; 531: 257-64.
77. Fabi F, Argiolas L, Chiavarelli M, Del Basso P. Nitric oxide-dependent and -independent modulation of sympathetic vasoconstriction in the human saphenous vein. *Eur J Pharmacol.* 1996; 309: 41-50.
78. Dias RG, Alves MJ, Pereira AC, Rondon MU, Dos Santos MR, Krieger JE, et al. Glu298Asp eNOS gene polymorphism causes attenuation in non-exercising muscle vasodilatation. *Physiol Genomics.* 2009; 37 (2): 99-107.