

O POLIMORFISMO 894G>T DO GENE DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE ENDOTELIAL E SUA ASSOCIAÇÃO COM DOENÇA CORONÁRIA

THE 894G>T POLYMORPHISM OF THE ENDOTHELIAL CONSTITUTIVE NITRIC OXIDE SYNTHASE GENE AND ITS ASSOCIATION WITH CORONARY ARTERY DISEASE

Germán Iturry-Yamamoto, Alexandre C. Zago, Waldomiro C. Manfroi, Alcides J. Zago

RESUMO

O endotélio cumpre um papel fundamental na vasodilatação fisiológica e na proteção da parede arterial frente aos processos de trombose e aterosclerose, assim como na resposta à lesão provocada pela angioplastia ou implante de *stent* intracoronário. Essa função protetora é exercida, entre outros mecanismos, através da síntese e liberação de óxido nítrico (NO) pela célula endotelial. O NO inibe a adesão e a agregação plaquetária, assim como provoca a desagregação de agregado plaquetário. Inibe também a mitogênese e a proliferação de células de músculo liso vascular, assim como a quimiotaxia e a adesão de polimorfonucleares neutrófilos ao endotélio. O NO é sintetizado na célula endotelial, a partir da L-Arginina, pela NO sintase endotelial constitutiva (NOsec), uma enzima constitutiva codificada por um gene localizado no cromossomo 7q35-36, contendo 26 éxons que ocupam 21 quilobases. Foram descritos alguns polimorfismos deste gene, entre os quais, o polimorfismo 894G>T, presente no éxon 7 do gene da NOsec. Este polimorfismo consiste na substituição de uma base guanina por uma timina no nucleotídeo 894 do gene; esta mutação resulta na substituição de um aminoácido glutamato por aspartato na posição 298 da NOsec (Glu298Asp). Nesta revisão, descreve-se a possível associação desse polimorfismo com a doença coronária, destacando algumas contribuições de nosso grupo de pesquisa.

Unitermos: Óxido nítrico sintase endotelial constitutiva, gene, polimorfismo, doença coronária.

ABSTRACT

The endothelium plays a major role in the physiological vasodilatation, in the protection of the arterial wall against atherosclerotic and thrombotic process, as well as in the response to vessel injury after coronary angioplasty and stenting. This protective function is mediated, among others, by the synthesis and release of nitric oxide (NO) by endothelial cells. The NO has been shown to inhibit platelet adhesion and aggregation, and also to stimulate disaggregation of preformed platelet aggregates. It also inhibits mitogenesis and the proliferation of vascular smooth muscle cells, as well as polymorphonuclear adhesion and chemotaxis. The NO is synthesized in the endothelial cell from L-arginine, by endothelial constitutive nitric oxide synthase (ecNOS), which is a constitutive enzyme codified by a gene located in locus 7q35-36, containing 26 exons that occupy 21 kilobases. Some polymorphisms in this gene have been described. Among these, the 894G>T polymorphism present in the exon 7 of the

Unidade de Hemodinâmica, Serviço de Cardiologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS.

Correspondência: Alcides J. Zago, Unidade de Hemodinâmica, Serviço de Cardiologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-003, Porto Alegre, RS. Fone/Fax: (51) 2101-8342. E-mail: ajzago@terra.com.br
Apoio: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil (FAPERGS), processo 01/0075.6; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo 150102/01-1(NV); e Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, processo 00-246.

ecNOS gene. This polymorphism consists of the substitution of a guanine base by a thymine at nucleotide 894 of the gene; this mutation results in the substitution of the glutamate amino acid by aspartate at the 298th position of the ecNOS protein (Glu298Asp). In this review, we describe the possible association of this polymorphism with coronary artery disease and the contributions of our research group.

Key words: Endothelial constitutive nitric oxide synthase, gene, polymorphism, coronary artery disease.

INTRODUÇÃO

A partir da descoberta, em 1980, de que a célula endotelial libera o fator relaxante derivado do endotélio (1), iniciaram-se intensas pesquisas, que identificaram o fator relaxante derivado do endotélio (FRDE) como sendo o óxido nítrico (NO) (2), que o substrato para a síntese do NO é a L-Arginina (3) e que a enzima responsável por dita síntese é a óxido nítrico sintase endotelial constitutiva (NOsec) (4,5). Pesquisas na área da farmacologia também demonstraram diversos efeitos biológicos desta molécula. O NO foi descrito inicialmente como sendo um potente vasodilatador (1), que atua através da ativação da guanilato ciclase do músculo liso vascular, aumentando os níveis de GMPc (6). Posteriormente, foi demonstrado que o NO atua também sobre vários processos implicados na patogênese da aterosclerose e da trombose (7-10), como a adesão e agregação plaquetária (11-13), a formação de radicais livres de oxigênio nos leucócitos (14), a ativação de polimorfonucleares (14,15), a oxidação das lipoproteínas (16), a mitogênese e proliferação de células de músculo liso vascular (17) e a proliferação da íntima (18).

O POLIMORFISMO 894G>T DO GENE DA NOsec

Dadas as evidências de que o NO tem um papel importante no controle da homeostase vascular, estudos foram realizados para identificar eventuais polimorfismos do gene da NOsec e determinar a possível associação destes com algumas doenças cardiovasculares. O gene da NOsec está localizado no cromossomo 7q35-36, contendo 26 éxons que ocupam 21 quilobases (19). Foram descritos alguns polimorfismos, entre os quais, o polimorfismo 894G>T, presente no éxon 7 do gene da NOsec, que consiste na substituição de uma base guanina por uma timina no nucleotídeo 894 do mesmo; essa mutação resulta na substituição de um aminoácido glutamato por aspartato na posição 298 da enzima (Glu298Asp) (20).

ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO 894G>T DO GENE DA NOsec COM DOENÇA CORONÁRIA

Alguns trabalhos encontraram associação deste polimorfismo com doença coronária. Em uma população japonesa, a frequência dos homozigotos TT foi significativamente maior em pacientes com infarto de miocárdio, em comparação com um grupo de indivíduos sadios (21). Em outro estudo em população japonesa, uma frequência significativamente maior do alelo T foi observada em pacientes com infarto, quando comparados com um grupo-controle (22). Já em um estudo em população inglesa, foi observada uma frequência significativamente maior de homozigotos TT em um grupo de pacientes com doença coronária e em outro grupo de pacientes com infarto recente (23). Em alguns trabalhos, não foi encontrada relação desta mutação com doença isquêmica (24-26). Entretanto, uma meta-análise (27) mostra uma associação da variante 894G>T, assim como do polimorfismo no íntron 4 do gene, mas não do polimorfismo do promotor do gene da NOsec (polimorfismo -786T>C), com doença coronária.

Alguns estudos foram realizados em nossa população. Rios et al. encontraram associação da variante -786T>C, mas não da 894G>T, com doença coronária (28). Em trabalho realizado por nosso grupo, foi encontrada uma associação da mutação 894G>T com angina instável (29); neste estudo, foram incluídos pacientes referidos para revascularização percutânea, os quais foram divididos em dois grupos, conforme o quadro clínico: grupo 1 - pacientes com angina estável e grupo 2 - pacientes com angina instável, sendo excluídos pacientes assintomáticos. Foi observado que a presença do alelo T (genótipos T/T e T/G combinados) era a única variável com valor preditivo para angina instável, quando controlada para as demais variáveis. Deve-se salientar que ambos os grupos eram similares no que se refere a características demográficas, fatores de risco para doença coronariana e medicação em uso; portanto, o fato da frequência dos genótipos deste polimorfismo ser diferente em uma população homogênea sugere que a angina

na instável seja uma expressão fenotípica do alelo T na população estudada. Foram determinados também os níveis plasmáticos do fator de von Willebrand, um marcador de disfunção endotelial. Observamos que pacientes com angina instável portadores do alelo T apresentavam níveis plasmáticos elevados desse marcador em comparação com portadores do genótipo GG, denotando uma disfunção endotelial (30).

É pouco conhecido se a modificação na seqüência nucleotídica do gene da NOsec, conseqüência do polimorfismo 894G>T, poderia resultar em alterações na expressão fenotípica. Neste sentido, os resultados de alguns estudos sugerem que este polimorfismo teria um efeito funcional sobre a enzima; portadores do alelo T sem doença coronária apresentam disfunção vasomotora coronária, devido ao aumento da resistência microvascular em repouso, efeito não observado em portadores do alelo G. Ademais, este efeito parece ser alelo-dose dependente, já que homozigotos TT apresentam maior disfunção (31). Em outro estudo, também em pessoas sadias, não foi observado efeito do alelo T sobre a resposta vascular à acetilcolina; entretanto, os homozigotos TT apresentaram uma menor síntese de NO endógeno (32). Em nível molecular, o polimorfismo 894G>T resulta em uma fragmentação proteolítica aumentada da enzima NOsec, sugerindo que este polimorfismo tem um efeito funcional sobre a NOsec (33).

CONCLUSÃO

Há evidências de que o polimorfismo 894G>T não é silencioso, pois gera proteínas com diferente susceptibilidade para a fragmentação enzimática, tendo, portanto, um efeito funcional na proteína da NOsec. Este efeito tem como provável expressão fenotípica a disfunção endotelial observada em portadores do alelo T, sugerindo uma associação do polimorfismo 894G>T com doença coronária.

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. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:523-6.
3. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988;333:664-6.
4. Boje KM, Fung HL. Endothelial nitric oxide generating enzyme(s) in the bovine aorta: subcellular location and metabolic characterization. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;253:20-6.
5. Forstermann U, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:1788-92.
6. Ignarro LJ. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ Res* 1989;65:1-21.
7. Freedman JE, Loscalzo J. Nitric oxide and its relationship to thrombotic disorders. *J Thromb Haemost* 2003;1:1183-8.
8. Ignarro LJ. Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Biosci Rep* 1999;19:51-71.
9. Cooke JP. Role of nitric oxide in progression and regression of atherosclerosis. *West J Med* 1996;164:419-24.
10. Iturry-Yamamoto G, Alves AA, Picon PD. Propriedades anti-aterogênicas do fator relaxante derivado do endotélio (óxido nítrico). *Arq Bras Cardiol* 1997;69:349-57.
11. Azuma H, Ishikawa M, Sekizaki S. Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 1986;88:411-5.
12. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol* 1987;92:181-7.
13. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987;7:1057-8.
14. Clancy RM, Leszczynska-Piziak J, Abramson SB. Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. *J Clin Invest* 1992;90:1116-21.
15. Moilanen E, Vuorinen P, Kankaanranta H, Metsa-Ketela T, Vapaatalo H. Inhibition by nitric oxide-donors of human polymorphonuclear leukocyte functions. *Br J Pharmacol* 1993;109:852-8.
16. Hogg N, Parthasarathy S, Kalyanaraman B. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1993;15:495.

17. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989;83:1774-7.
18. Lee JS, Adrie C, Jacob HJ, Roberts JD, Zapol WM, Bloch KD. Chronic inhalation of nitric oxide inhibits neointima formation after balloon arterial injury in rats. *Circulation* 1995;92:1232.
19. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1993;268:17478-88.
20. Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, 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.
21. Hibi K, Ishigami T, Tamura K, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension* 1998;32:521-6.
22. Shimasaki Y, Yasue H, Yoshimura M, 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.
23. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, 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.
24. Via M, Lopez-Alomar A, Valveny N, et al. Lack of association between eNOS gene polymorphisms and ischemic heart disease in the Spanish population. *Am J Med Genet A* 2003;116: 243-8.
25. Granath B, Taylor RR, van Bockxmeer FM, Mamotte CD. Lack of evidence for association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and coronary artery disease in the Australian Caucasian population. *J Cardiovasc Risk* 2001;8:235-41.
26. Wang CL, Hsu LA, Ko YS, Ko YL, Lee YH. Lack of association between the Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene and the risk of coronary artery disease among Taiwanese. *J Formos Med Assoc* 2001;100:736-40.
27. Casas JP, Bautista LE, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: metaanalysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation* 2004;109:1359-65.
28. Rios DL, Callegari-Jacques SM, Hutz MH. Endothelial nitric oxide synthase and fractalkine chemokine receptor polymorphisms on angiographically assessed coronary atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2005;362(1-2):138-46.
29. Iturry-Yamamoto G, Alho C, Zago AC, et al. Associação do polimorfismo G894T do gene da óxido nítrico sintase endotelial (NOSe) com angina instável. *Arq Bras Cardiol* 2003;81(supl.III):11.
30. Iturry-Yamamoto G, Moriguchi HE, Zago AC, et al. Pacientes com angina instável portadores do polimorfismo G894T do gene da óxido nítrico sintase endotelial (NOSe) apresentam níveis plasmáticos elevados de fator de Von Willebrand. *Arq Bras Cardiol* 2004;83:59.
31. Naber CK, Baumgart D, Altmann C, Siffert W, Erbel R, Heusch G. eNOS 894T allele and coronary blood flow at rest and during adenosine-induced hyperemia. *Am J Physiol* 2001;281:H1908-12.
32. Sofowora G, Dishy V, Xie HG, et al. In-vivo effects of Glu298Asp endothelial nitric oxide synthase polymorphism. *Pharmacogenetics* 2001;11:809-14.
33. Tesouro 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.