

Óxido Nítrico y Sistema Cardiovascular: Activación Celular, Reactividad Vascul ar y Variante Genética

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

Resumen

El óxido nítrico (NO), primariamente identificado como un factor relajante derivado del endotelio, es un radical libre actuante en la señalización de diferentes procesos biológicos. La identificación de las isoformas de las sintasas del NO (NOS) y la subsecuente caracterización de los mecanismos de activación celulares de las enzimas posibilitaron tanto la comprensión de parte de las interacciones fisiológicas como la comprensión de parte de los mecanismos de enfermedad, en la cual el NO está envuelto. La isoforma endotelial de la NOS (eNOS), expresada principalmente en el endotelio vascular, desempeña importante papel en la regulación de la reactividad vascular y en el desarrollo y en la progresión de la aterosclerosis. Esta revisión tiene el propósito de contextualizar al lector sobre la estructura de la eNOS y sus mecanismos de activación celular. Teniendo en vista los avances de la biología molecular, trataremos aun de los conocidos mecanismos de regulación de la expresión génica y del papel de variantes en el código genético de la eNOS asociados a fenotipos cardiovasculares. Aunque se reconozca la importancia del NO como molécula ateroprotectora, nuestra atención estará volcada a la revisión de literatura envolviendo NO y su participación en la modulación del fenotipo de vasodilatación muscular.

Introducción

La evidencia primaria de que el endotelio es un componente indispensable en la regulación del tono vascular surgió cuando análisis experimentales demostraron que, en la ausencia de esa monocapa de epitelio pavimentoso, la vasodilatación inducida por la acetilcolina no ocurría. En aquel momento, Furchgott y Zawadzki¹ documentaron que, cuando era estimulado, el endotelio era capaz de liberar una sustancia vasoactiva que fue denominada factor relajante derivado del endotelio

Palabras clave

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

(EDRF, del inglés *endothelium-derived relaxing factor*). Pasados algunos años, el EDRF fue identificado por Ignarro et al² como el óxido nítrico (NO), un compuesto caracterizado en 1977 por Ferid Murad que, cuando liberado por nitratos, causaba relajación en células musculares lisas. Ese contexto le valió a Robert F. Furchgott, Ferid Murad y Louis J. Ignarro el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1998 (fig. 1). Una serie de estudios fue responsable por la caracterización de que el endotelio libera otros EDRF como la prostaciclina (PGI₂) y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF, del inglés *endothelium-derived hyperpolarizing factor*), además de factores constrictores derivados del endotelio (EDCF, del inglés *endothelium-derived contracting factors*), como la endotelina (ET-1), productos de la vía de la ciclooxigenasa como el tromboxano A₂ (TXA₂) y especies reactivas de oxígeno como el anión superóxido (O₂⁻)³. Esos descubrimientos asociados a la caracterización del endotelio como un sensor biológico capaz de detectar cualquier estímulo mecánico, físico o químico - y responder a él - lo elevó al puesto de un tejido multifuncional que desempeña importante papel en la homeostasia de todos los sistemas fisiológicos.

Óxido nítrico y sistema cardiovascular

El NO, una molécula gaseosa actuante en la señalización de diferentes procesos biológicos, es un radical libre que presenta un electrón desemparejado en la última capa y una vida media de 4 a 8 segundos en medio acuoso oxigenado^{4,5}. Descrito como un gas lábil, capaz de libre difusión en las membranas celulares, tal característica colabora con su alta actividad biológica⁶. El reconocimiento de que el endotelio vascular es un órgano activo y que su integridad favorece efectos benéficos, como acción antioxidante, antiinflamatoria, anticoagulante, profibrinolítica, inhibitoria de la adhesión y migración de leucocitos, inhibitoria de la proliferación y migración de las células musculares lisas, inhibitoria de la agregación y adhesión plaquetaria, vino a ampliar aun más las múltiples acciones del NO⁷. Así, ese escenario ateroprotector es caracterizado por una armonía entre sustancias liberadas por el endotelio, en el cual el NO es citado como uno de los compuestos vasoactivos de mayor relevancia. Caracterizado como un desorden sistémico que antecede a la aterosclerosis y sus complicaciones, la disfunción endotelial en arterias coronarias ateroscleróticas fue inicialmente demostrada por Ludmer et al⁸ y, después, relacionada a la alteración en la biodisponibilidad del NO⁹.

En la actual literatura, hay concordancia de que la reducida actividad biológica de NO, causada tanto por la reducción en la síntesis como por el aumento de la

Correspondencia: 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

Artículo recibido en 12/02/09; revisado recibido en 26/06/09; aceptado en 14/08/09.



Fig. 1 - Ganadores del Premio Nobel en Fisiología o Medicina en 1998. Fuente: Disponible en: <<http://nobelprize.org>>.

degradación por el estrés oxidativo, ha sido identificada como el mecanismo de mayor relevancia en el proceso multifactorial en la disfunción endotelial y en la participación de las principales disfunciones cardiovasculares¹⁰. Así, la reducción en la biodisponibilidad del NO y la consecuente disfunción endotelial determinan, en el ambiente vascular, el desencadenamiento de eventos como alteraciones en el tono, disfunciones trombóticas, proliferación y migración de células musculares lisas (CML), y adhesión de leucocitos¹¹. En la disfunción endotelial, ocurre también el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO)¹², y estas pueden reducir la disponibilidad de NO endotelial por diferentes vías: inactivación directa del NO por superóxido, con formación de peroxinitrito (ONOO⁻)¹³; reducción en la expresión y en la actividad de las sintasas del NO, por causa de los cambios en sus sustratos o cofactores, y en el aumento de los niveles de dimetilarginina asimétrica (ADMA)¹⁴; y, aun, desacoplamiento de la NOS endotelial causado por la oxidación aumentada de tetraidrobiopterina (BH₄)¹⁵.

El entendimiento de la complejidad de la función endotelial y la dificultad de estudiar cada uno de sus componentes aisladamente vienen siendo superados. En ese contexto, modelos animales capaces de reproducir una disfunción endotelial fueron desarrollados, posibilitando, por ejemplo, el funcionamiento del sistema en condiciones de baja o aumentada biodisponibilidad de NO. Además de eso, estudios *in vivo* en humanos, a través de la infusión intraarterial de compuestos con potencial de modular la función endotelio dependiente o endotelio independiente, posibilitaron la investigación de los mecanismos moduladores de la función vascular en las diferentes condiciones fisiológicas y enfermedades de mayor prevalencia.

Sintasas de óxido nítrico

La producción enzimática del NO a partir del aminoácido L-arginina es mediada por una familia de tres sintasas de óxido nítrico (NOS), codificadas por genes distintos¹⁶. Las isoformas comparten 50%-60% de homología en la secuencia de aminoácidos, en los dominios oxidasa y reductasa¹⁷. Esas isoformas exhiben características distintas que reflejan sus funciones específicas *in vivo*¹⁸.

La sintasa endotelial del óxido nítrico (eNOS o NOS III; 7q35-36) y la sintasa neuronal del óxido nítrico (nNOS o NOS I; 12q24.2) poseen mecanismo de activación constitutivo (cNOS). La isoforma inducida (iNOS o NOS II; 17cen-q12) se encuentra expresada en procesos celulares anormales como en la insuficiencia cardíaca¹⁹, inducidas por citoquinas y agentes inflamatorios, lo que resulta en alto flujo de NO^{20,21}. La eNOS, encontrada principalmente en las células endoteliales en compartimientos denominados caveolas²², es esencial para la manutención del tono vascular basal. Ese tono es, en parte, mediado por la síntesis del NO, un compuesto vasoactivo participante en la regulación del flujo sanguíneo en los diversos lechos vasculares y, particularmente, en el flujo sanguíneo coronario²³. La ubicación subcelular de la síntesis de NO ejerce gran influencia en su actividad biológica. En la década de 1990, la identificación inicial de la ubicación de la eNOS en la caveola, en la membrana plasmática de las células, proveyó la base estructural para el reconocimiento de la compartimentación en los mecanismos de señalización celular promovido por el NO. La subsecuente observación de que la eNOS interactúa directamente con las proteínas estructurales de la caveola, las caveolinas, proveyó la evidencia bioquímica de la interacción entre eNOS y caveola y su implicación con numerosas moléculas de señalizaciones concentradas en

Artículo de Revisión

ese ambiente de la membrana celular²⁴. Un gran número de evidencias reveló que las caveolas son capaces de reclutar numerosas moléculas de señalización y regular sus actividades en vez de servir como simple soporte para el intercambio y el transporte celulares²⁵. Así, fue descrito que la eNOS se ubica dentro de la caveola y es mantenida en un estado menos activo por medio de su interacción con la caveolina-1²⁶.

Estructura de la eNOS

La eNOS funciona como un dímero, constituida de dos monómeros idénticos, que, a su vez, pueden ser divididos funcional y estructuralmente en dos dominios principales: un dominio C-terminal reductasa, homólogo al citocromo P450 y que contiene sitios de ligazón para NADPH, flavina mononucleótido (FMN) y flavina adenina dinucleótido (FAD), y un dominio N-terminal oxidasa, que abstrae un electrón del sustrato L-arginina y posee sitios de ligazón para el hierro heme, para el cofactor tetraidrobiopterina (BH₄) y para la L-arginina^{20,21,27} (fig. 2). La reacción de catálisis de las NOS constitutivas envuelve dos niveles de oxidación: la hidroxilación de la L-arginina en N^G-hidroxi-L-arginina, seguida

de la oxidación de este intermediario con utilización de un electrón de la NADPH, formando L-citrulina y NO²⁸. Esa reacción consume 1,5 mol de NADPH y 2 mols de oxígeno por mol de L-citrulina formada^{16,29,30}. Cofactores como hierro heme, BH₄ y L-arginina han sido particularmente estudiados, y la baja biodisponibilidad de estos induce al fenómeno de la eNOS disfuncional³¹⁻³³. El hierro heme es esencial para la dimerización de las tres isoformas³⁴, bajas concentraciones o ausencia de L-arginina catalizan la reducción del oxígeno en superóxido (O₂⁻)³⁵, y niveles disminuidos de BH₄ llevan a la producción simultánea de NO y O₂⁻, productos que reaccionan entre si formando peroxinitrito (ONOO⁻)³⁶.

Regulación de la expresión génica y de la actividad de la eNOS

Una vez verificado que las células endoteliales contienen una concentración basal de la proteína eNOS, el gen de la eNOS fue considerado constitutivamente expresado. Es interesante que, estudios posteriores demostraron que concentraciones estables del mRNA son sujetas a un modesto nivel de regulación³⁷. La región promotora del gen de la eNOS

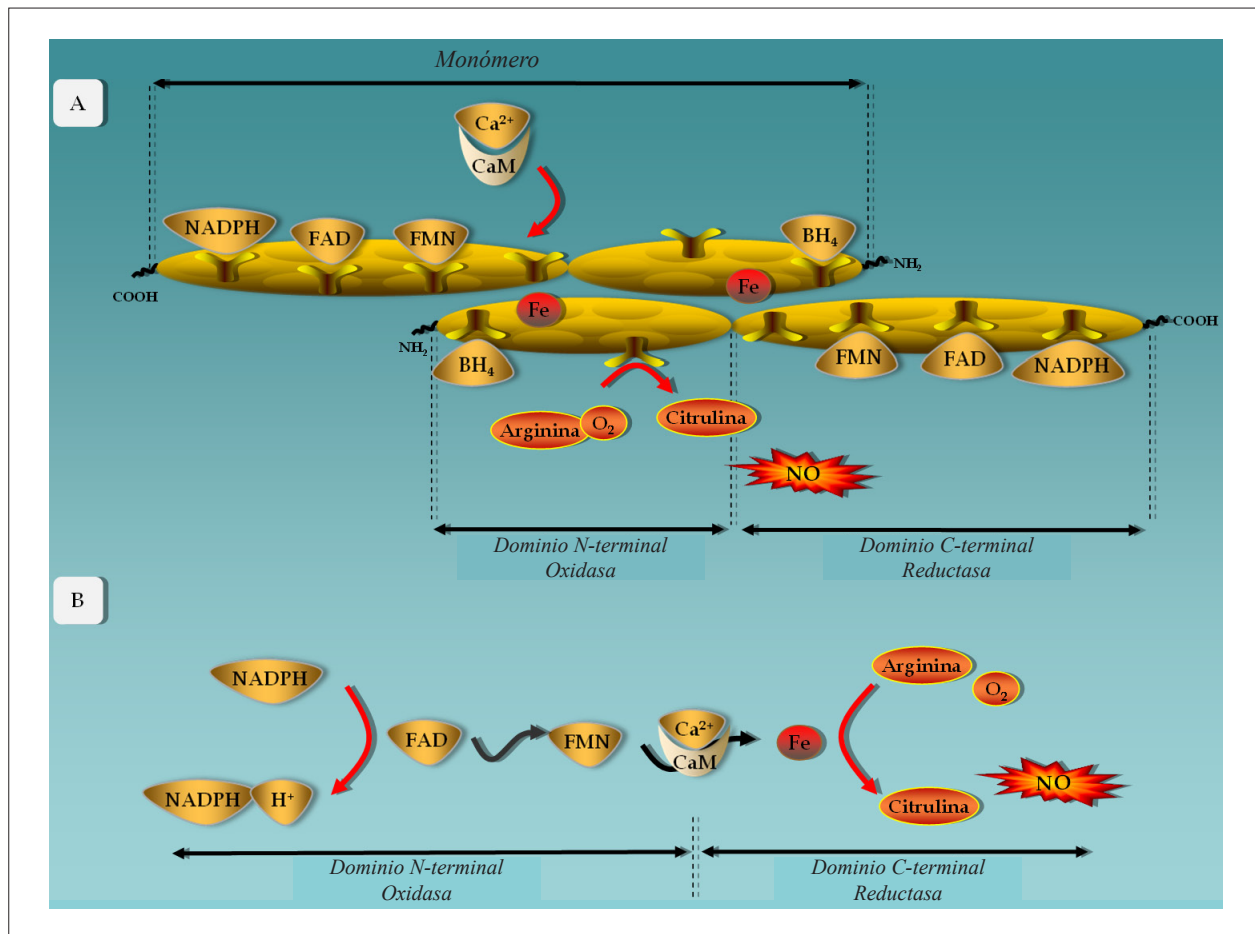


Fig. 2 - A) Modelo propuesto para la estructura dimérica de la eNOS. **B)** Transferencia de electrones entre los cofactores y sustratos de la estructura enzimática. El electrón fluye en el sentido NADPH → FAD → FMN del dominio reductasa de un monómero para el Fe del dominio oxidasa del monómero contralateral. En la figura A, observe que el flujo de electrones y la catálisis de la arginina son mostrados en apenas un lado de la enzima. La transferencia de electrones de un dominio para el otro es mediada por la calmodulina, lo que justifica la necesidad de su ligazón al sitio de reconocimiento para activación de la enzima y consecuente síntesis de NO. FAD - flavina adenina dinucleótido; FMN - flavina mononucleótido; BH₄ - tetraidrobiopterina; Fe - hierro heme; CaM - calmodulina.

fue clonada, demostrando poseer un complejo mecanismo de regulación de la expresión génica. Semejante a la región promotora de genes constitutivamente expresados, la región promotora del gen de la eNOS no contiene la secuencia TATA Box. Mientras tanto, posee múltiples secuencias DNA *cis*-regulatorias, incluyendo CCAT box, sitios Sp1, GATA motifs, CACCC box, sitios AP-1 y AP-2, región de ligazón p53, elementos NF-1, además de secuencias responsivas a elementos esteroides y *shear stress*³⁸. Las secuencias promotoras humana y bovina presentan 75% de homología, sugiriendo una alta conservación evolutiva de la regulación transcripcional del gen. Ubicados en la región promotora proximal, los dominios regulatorios positivos I y II (PRD I y PRD II) están envueltos en la regulación basal de la transcripción génica, presentando afinidad por los factores de transcripción Sp-1, Sp-3, Ets-1, Elf-1, YY1 y proteína *MYC-associated zinc finger*³⁹. Estudios *in vitro* demostraron que la responsividad del promotor de la eNOS al *shear stress* es dependiente de secuencias ubicadas entre -1.000 y -975, región relativa a la inicialización de la transcripción^{40,41}. Además de eso, la ligazón de las subunidades p50 y p65 del NF- κ B al elemento responsivo GAGACC (-990; -984), ubicado anteriormente al sitio de inicialización de la transcripción, está envuelta en la activación del promotor por el *shear stress*⁴². Y aun, la transcripción en células endoteliales bovina sometidas a flujo laminar presentó aumento de 9 veces del mRNA. Ese efecto fue mediado por dos mecanismos distintos: 1. aumento transiente de la transcripción del gen y 2. subsecuente vida media prolongada del mRNA⁴³.

El mecanismo de activación de la eNOS ha sido descrito como el más elaborado de las tres isoformas, reflejando la complejidad del control fisiológico de los diferentes lechos vasculares^{17,44}. El mecanismo clásico de activación de las isoformas constitutivas es dependiente del calcio (Ca^{++}), mientras que la iNOS es independiente de la elevación de las concentraciones intracelulares de Ca^{++} , debido a alta afinidad de la ligazón de la enzima con la calmodulina^{31,39,44}.

La complejidad de los mecanismos de regulación post transcripcionales de la eNOS ha sido considerada, tanto como consecuencia de la dimerización de las subunidades de la proteína como en función del papel de la proteína caveolina en la formación de la estructura caveolar⁴⁵. La eNOS se ubica dentro de la caveola y es mantenida en un estado menos activo por su interacción con la caveolina-1²⁶. Los mecanismos de migración de la membrana celular para el complejo de Golgi y las fosforilaciones Akt, PKA y AMPK-quinasa dependientes son descritos como responsables por la activación de esa isoforma de la eNOS. Así, la interacción mantiene la eNOS inactiva, y la calmodulina actúa directamente, compitiendo con la caveolina, para promover la activación calcio-dependiente de la enzima¹⁵. La actividad de la eNOS es bien conocida en el ambiente vascular y es regulada por seis mecanismos después de su traducción: inclusión de lípidos, mecanismo calcio/calmodulina dependiente, interacciones directas proteína-proteína, diferentes fosforilaciones sitio dirigidas, glucosilación y disponibilidad de sustratos y cofactores. Así, la eNOS puede interactuar con varias proteínas en sus estados "menos activos" o "más activos". Son requeridas etapas de N-meristolación y palmitación de la eNOS ligada a plamalema, que, en este estado, se encuentra asociada a caveolina-1 y a HSP 90. La

proteína que hace interacción con la HSP70, denominada "CHIP", interactúa con ambas HSP70 y HSP90, y regula negativamente el tráfico de la eNOS para el complejo de Golgi, en contraste con la "NOSIP" y "NOSTRIN" que pueden regular negativamente la ubicación de la eNOS en la membrana plasmática. El principal mecanismo de activación de la eNOS se da por la fosforilación del aminoácido serina en la posición 1177⁴⁶ por la enzima Akt-quinasa (o proteína quinasa B), lo que aumenta la sensibilidad de la eNOS a las concentraciones basales de Ca^{++} /calmodulina⁴⁷. La activación tónica o fásica de la eNOS en respuesta al flujo sanguíneo es independiente de las alteraciones en la concentración del Ca^{++} y se constituye del *shear-stress*. Dimmeler et al⁴⁸ demostraron que el intercambio del residuo de serina^{1177/1179} por el aminoácido alanina vuelve a la eNOS incapaz de responder a la fosforilación y activación por la enzima Akt, una vía dependiente de fosfatidilinositol-3 quinasa (PI-3K). Aunque la fosforilación del residuo de serina¹¹⁷⁷ desempeñe un papel preponderante en la activación enzimática de la eNOS, es sabido que su regulación también depende del estándar de fosforilación de otros sitios actualmente bien caracterizados⁴⁹. La fosforilación del residuo de serina⁶³³, ubicado en el dominio de ligazón de la flavina mononucleótido (FMN), también aumenta la actividad de la eNOS y parece ser particularmente importante en la manutención de la síntesis de NO después de la activación por Ca^{++} /calmodulina y fosforilación del residuo de serina¹¹⁷⁷. Fosforilado por la proteína quinasa C (PKC), el residuo de treonina⁴⁹⁵ interfiere con el dominio de ligazón de la calmodulina, regulando negativamente la síntesis del NO.

Recientes estudios han evaluado la capacidad de determinados fármacos en la reducción de la disfunción endotelial, como los antioxidantes y bloqueadores del sistema renina-angiotensina, por medio de los mecanismos de activación de la eNOS vía fosforilación de los sitios específicos como el residuo de serina¹¹⁷⁷. Esa fosforilación puede ser afectada por la ubicación subcelular de la enzima, tales como caveola, uniones intercelulares, complejo de Golgi y compartimientos citosólicos, así como por quinasas proteicas y fosfatasa asociadas a esas estructuras. Recientemente, nuestro grupo⁵⁰ demostró que el Telmisartan, bloqueador del receptor de angiotensina II, promueve reducción de la disfunción endotelial por medio de la activación de la eNOS vía fosforilación de sitios específicos, como el residuo de serina¹¹⁷⁷ y serina⁶³⁵.

Óxido nítrico, tono vascular y vasodilatación muscular

Después de la verificación de que el NO es sintetizado por las células endoteliales y que participa de la regulación hemodinámica cardiovascular, el interés comenzó a concentrarse en la cuantificación de su participación en la homeostasia de ese sistema. Estudios *in vivo* en individuos sanos demostraron que la administración intraarterial de *N*^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), un bloqueador inespecífico de la actividad de las NOS, reduce el flujo sanguíneo local entre 25% y 50%⁵¹. Aunque el tono vascular basal sea el producto de las fuerzas constrictoras *versus* fuerzas vasodilatadoras, esos resultados demuestran que el NO es, por lo menos en parte, el modulador del fenotipo en cuestión.

Durante condiciones de estrés mental y ejercicio, es observado, juntamente con la respuesta taquicárdica y el aumento de la presión arterial, vasodilatación en lecho muscular esquelético como parte de las respuestas fisiológicas de ajuste del organismo. Fue postulado que parte de esa respuesta vasodilatadora muscular sería modulada por un componente neural, lo que quedó evidente posteriormente por la existencia de fibras simpáticas colinérgicas para la musculatura esquelética de algunas especies de mamíferos, con excepción de primates y humanos. Se verificó que la estimulación eléctrica del nervio simpático provocaba vasodilatación en lecho muscular humano cuando la liberación presináptica de noradrenalina era inhibida por la infusión intraarterial de fármacos. Mientras tanto, esa respuesta vasodilatadora se mostró atenuada cuando un antagonista muscarínico fue administrado^{52,53}. Posteriormente, quedó evidente que el NO se constituye, por lo menos en parte, como el modulador de la respuesta vasodilatadora verificada cuando fibras simpáticas colinérgicas son estimuladas⁵⁴. De hecho, Blair et al⁵⁵ ya habían evidenciado que, en humanos, la vasodilatación en el antebrazo, durante maniobras fisiológicas, es mediada por un componente neural. Durante la aplicación del estrés mental, el flujo sanguíneo en el miembro simpatectomizado no se alteraba, cuando era comparado al flujo sanguíneo en el miembro control. Además de eso, la infusión intraarterial de atropina en el miembro control reducía en aproximadamente 50% el aumento en el flujo sanguíneo. En aquel momento, utilizando las evidencias indirectas, los autores sugirieron la existencia de inervación simpática colinérgica para la musculatura esquelética de humanos. Mimetizando los experimentos en animales, más tarde los estudios de Dietz et al^{56,57} dejaron evidente que parte de la respuesta vasodilatadora muscular, medida en el antebrazo, durante el estrés mental o el ejercicio es atenuada con la administración intraarterial del L-NMMA. Los mecanismos por los cuales la acetilcolina y el NO son sintetizados y liberados durante las reacciones de defensa del organismo no están completamente elucidados en humanos. Las evidencias alcanzadas con bloqueos farmacológicos permiten apenas sugerir la existencia de fibras simpáticas colinérgicas para la musculatura esquelética. En consecuencia de tales limitaciones, los autores no descartan la posibilidad de que la vasodilatación sea causada por una combinación entre factores circulantes y locales. Una pequeña parte de las células endoteliales podría sintetizar y liberar acetilcolina⁵⁸. Además de eso, la activación de receptores β_2 -adrenérgicos ubicados en el músculo liso vascular resultaría en la relajación de ese tejido y, en consecuencia, en la vasodilatación. Mientras tanto, Majmudar et al⁵⁹ verificaron que parte de la vasodilatación resultante de la activación de los β_2 -adrenoceptores es mediada por el NO. Aunque los autores no expliquen el mecanismo responsable por ese fenómeno, aproximadamente 25% de la vasodilatación observada en el antebrazo con la infusión de Ritodrine (agonista selectivo β_2 -adrenérgico) fue atenuada con la confusión de L-NMMA. Esos resultados sugieren la existencia de los β_2 -adrenoceptores en el endotelio vascular, contribuyendo al aumento de la actividad de la eNOS. Además de eso, el aumento de la estimulación mecánica del endotelio vascular resultaría en síntesis aumentada de EN EL, vía PI-3K-Akt quinasa, con subsecuente fosforilación del residuo de serina¹¹⁷⁷.

Polimorfismos de la eNOS y estudios funcionales de la variante G894T

Genotipada y secuenciada en 1993 por Marsden et al³⁸ (GenBank D26607), la eNOS está ubicada en el cromosoma 7q35-36, y variaciones en su secuencia han sido descritas en la región promotora, exones e intrones²⁷. El gen (21-22 kbp) comprende 26 exones y 25 intrones con 133 kDa. La secuencia polipeptídica generada contiene 1.203 aminoácidos³⁸. Ya está descrita en la literatura la existencia de tres polimorfismos de un único nucleótido (SNP) en la región promotora, en localizaciones de no ligazón de factores de transcripción³⁹. En los intrones 2, 11, 12, 18, 22 y 23, fueron encontrados SNP⁶⁰ y polimorfismos de secuencias repetidas en los intrones 2, 4, 8 y 13^{38,61}. De los polimorfismos encontrados en los exones 6 y 7, la sustitución de la base nitrogenada guanina por timina (G→T), en la posición 894 ubicada en el exón 7, resulta en la sustitución del aminoácido glutamato (GAG) por aspartato (GAT) en la posición 298 de la secuencia polipeptídica⁶². Se sugiere que los polimorfismos ubicados en la región promotora del gen desempeñan influencia en la transcripción del RNAm, mientras que los polimorfismos ubicados en regiones codificadoras pueden resultar en alteración de actividad enzimática⁶³.

El residuo 298 está ubicado externamente en el dominio oxidasa de la enzima, sitios de ligazón para L-arginina o BH_4 . Estudios enzimáticos que utilizaron eNOS recombinante mostraron que no hay diferencia en la constante de Michaelis (k_m) ni en la $V_{\text{máx}}$ entre las dos formas de la enzima⁶³. Aunque la actividad enzimática parezca no ser afectada por la forma Asp²⁹⁸ de la enzima, Tesouro et al⁶⁴ mostraron que esa variante presenta mayor susceptibilidad al clivaje proteolítico en fragmentos de 100 y 35 kDa, precisamente en la posición Asp²⁹⁸-Pro²⁹⁹, cuando es comparada a la variante Glu²⁹⁸. Mientras tanto, Fairchild et al⁶⁵ demostraron que tal susceptibilidad proteolítica ocurría por causa de un artefacto de la preparación del experimento. La inconsistencia de esos resultados no excluye la posibilidad de que, *in vivo*, un desconocido mecanismo proteolítico, o hasta aun una alteración en la regulación post transcripcional, pueda estar siendo modulado por la variante Asp²⁹⁸ de la enzima.

Asociación de la variante G894T del gen de la eNOS con fenotipos cardiovasculares

Diversas enfermedades han sido asociadas a anomalías en la biosíntesis del NO, y muchas de esas condiciones están relacionadas a la disfunción autonómica. Estudios en genética poblacional han demostrado importante asociación del polimorfismo G894T del gen de la eNOS con enfermedad arterial coronaria (EAC)⁶⁶⁻⁶⁸ y también con el espasmo coronario inducido por acetilcolina (Ach)⁶⁹. Entre las disfunciones cardiovasculares, fue aun verificado que la variante G894T se encuentra asociada a la hipertensión arterial^{70,71}, aunque esa asociación no haya sido verificada en otras poblaciones^{72,73}.

La correlación entre genotipo y fenotipo clínico varía cuantitativa y cualitativamente, y la inconsistente asociación entre el polimorfismo de la eNOS y varios fenotipos clínicos es un fenómeno frecuentemente observado en otros genes

asociados la fenotipos²⁷. Esa inconsistencia ha sido atribuida a factores ambientales, alelos independientes, interacción entre genes y variabilidades en fenotipos clínicos. La importancia de los factores ambientales en la génesis de enfermedades se refleja en las diferencias de morbilidad y mortalidad entre grupos genéticamente homogéneos, aunque con estilos de vida diferentes.

Una variación genética puede no ser relevante a una determinada población, reflejando diferencias en la frecuencia de la distribución de los alelos. Un ejemplo de eso es la frecuencia del alelo 894T que es significativamente mayor en poblaciones blancas cuando es comparado a la población japonesa²³. La inconsistente asociación entre el polimorfismo de la eNOS y las alteraciones vasculares aun ha sido atribuida a la variación en la distribución de la eNOS en diferentes órganos. Arterias de órganos específicos son sujetas a diferentes presiones hemodinámicas, determinando la respuesta de la pared del vaso y el consecuente grado de disfunción endotelial²⁷.

Philip et al⁶² observaron, en pacientes sometidos a cirugía de revascularización, que la reactividad vascular a la infusión de fenilefrina (PE) es influenciada por la variante G894T del gen de la eNOS. La respuesta vasoconstrictora dosis-dependiente a la PE fue significativamente mayor para los alelos TT y GT, cuando fue comparada al grupo homocigoto GG, indicando que la reactividad vascular a las drogas vasoconstrictoras puede ser influenciada por el polimorfismo de la eNOS en humanos. La mayor respuesta dosis-dependiente de los pacientes con la variante 894T sugiere una reducida biosíntesis del NO. La administración sistémica de N^C-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) provoca hipertensión en humanos^{74,75}. Según Frandsen et al⁷⁶, la administración de 4 mg/kg de L-NAME en humanos reduce en 67% la actividad de la eNOS. La posible biodisponibilidad reducida del NO, en consecuencia de las variaciones en el gen de la eNOS, es un importante candidata para la susceptibilidad al desarrollo de la disfunción endotelial^{62,63} y a la alteración de la modulación de la actividad nerviosa simpática sobre el vaso⁷⁷.

Las investigaciones que demostraron asociación de la variante G894T del gen de la eNOS con fenotipos cardiovasculares señalan una posible reducción de la biodisponibilidad del NO, sugiriendo que la eNOS transcripta del alelo mutante presenta actividad enzimática alterada. La falta de evidencias sobre este racional nos incentivó a testear la funcionalidad de la variante genética en el fenotipo de vasodilatación muscular⁷⁸. Si la variante G894T del gen de la eNOS fuese capaz de disminuir la actividad enzimática, individuos portadores del alelo mutante (T) presentarían menor aumento del flujo sanguíneo muscular en respuesta al ejercicio isométrico de *handgrip*. Para testear tal hipótesis, 287 individuos fueron genotipados, y, entre ellos, se seleccionaron 33 sanos para representar tres genotipos: GG (*wild-type*), GT y TT. Como resultado, la atenuada vasodilatación muscular refleja al ejercicio ocurrió apenas en el genotipo TT, una vez que la vasodilatación entre los heterocigotos (genotipo GT) fue similar a aquella observada entre los individuos homocigotos para el alelo G (genotipo GG). Esos resultados sugieren que la presencia del alelo G es lo suficiente para superar la posible deficiencia del alelo T. Análisis subsecuentes *in vivo* comprobaron que la atenuada vasodilatación muscular observada en el genotipo TT es consecuencia de la reducida vasodilatación mediada por la eNOS, una vez que la infusión

intraarterial de L-NMMA no alteró la respuesta vasodilatadora al ejercicio en ese genotipo. En contraste, el L-NMMA redujo de forma significativa la respuesta vasodilatadora al ejercicio en el genotipo GG, para valores similares a los del genotipo TT. Además de eso, nuestro estudio demostró que la atenuada vasodilatación muscular observada en el genotipo TT no puede ser acreditada a un posible tono simpático vasoconstrictor aumentado. De hecho, la actividad nerviosa simpática muscular, medida directamente en el nervio fibular por la técnica de microneurografía, aumentó de forma semejante entre los genotipos durante el ejercicio. Aunque esos resultados no confirmen la funcionalidad del alelo T en la alteración de la actividad enzimática (esa variante puede estar en desequilibrio de ligazón con otra variante funcional en el mismo gen o en un gen próximo en el mismo cromosoma), pueden ser utilizados como un marcador de la disfunción observada del fenotipo de vasodilatación muscular. Esta es la primera demostración de que la variante G894T del gen de la eNOS está funcionalmente asociado a la reducida vasodilatación mediada por la eNOS. Además de eso, tales resultados sugieren que la reducida vasodilatación endotelio-dependiente pueda anticipar una disfunción vascular en individuos portadores del genotipo TT.

Conclusión

La verificación de que las sintasas de NO son constitutivamente expresadas (eNOS y nNOS) y que el NO desempeña importante función en la regulación de las actividades cardiovasculares aumentó el interés por el entendimiento de los mecanismos celulares y moleculares que rigen su funcionalidad. Aunque esos mecanismos sean complejos y de difícil acceso, una parte de ellos ya fue elucidada, permitiendo parcial comprensión de la biología del NO. En ese contexto, los avances en las técnicas de biología molecular posibilitaron la identificación de variantes en el código genético humano que pudiesen explicar, por lo menos en parte, la variación de respuesta fenotípica entre individuos. Los estudios de asociación en genética no son fáciles de comprender. Un único gen puede desempeñar de media a moderada participación en la regulación de un fenotipo multigénico, y, en esa situación, una determinada variante genética funcional en ese gen podría explicar apenas una pequeña parte de la variación de respuesta del fenotipo. El rastreo de genes candidatos, o sea, la identificación de múltiples genes y sus respectivos polimorfismos desencadenantes de variaciones en la función cardiovascular, camina hacia el momento en que parte del diagnóstico y de la conducta adoptados para el tratamiento será basada en la medicina genómica.

Potencial Conflicto de Intereses

Declaro no haber conflicto de intereses pertinentes.

Fuentes de Financiamiento

El presente estudio fue financiado por la FAPESP.

Vinculación Académica

Este artículo es parte de tesis de Doctorado de Rodrigo Gonçalves Dias por la Universidad Estadual de Campinas e Instituto do Coração - InCor (HCFMUSP) de São Paulo.

Referencias

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, Salices 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. Cao 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. Ferreira 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. Bucci M, Gratton JP, Rudic RD, Acevedo L, Roviozzo 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 HC, 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, Kalyanaram 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, Glatzer 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, Heinzel B, Werner ER, Wachter H, Schultz G, et al. Brain nitric oxide synthase is a bioprotein- 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. Karantzoulis-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 vasodilatation 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. Majmudar 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, Plantefeve 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. 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.
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 RC, 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.