

Implicaciones Farmacogenéticas de Polimorfismos de la eNOS para Drogas de Acción Cardiovascular

Pâmela Souza Silva¹, Riccardo Lacchini¹, Valéria de Aguiar Gomes¹, José Eduardo Tanus-Santos²

Faculdade de Ciências Médicas - Departamento de Farmacologia - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)¹, Campinas, SP; Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Departamento de Farmacologia - Universidade de São Paulo (USP)², Ribeirão Preto, SP - Brasil

Resumen

La farmacogenética es uno de los campos más promisorios de la medicina. La conclusión del Proyecto Genoma permitió que ese campo comenzase a descubrir factores complejos modulando la respuesta a las drogas, y nuevas tecnologías están a pocos pasos de permitir una gran expansión del área. Las enfermedades cardiovasculares están actualmente entre las mayores causas de internaciones hospitalarias y muerte, y han sido objeto de gran parte de los estudios genéticos de enfermedades complejas. Paralelamente a la identificación de marcadores de susceptibilidad a la enfermedad, es necesaria la investigación sobre como perfiles genéticos diferentes pueden alterar respuestas a los fármacos actualmente empleados. El sistema biológico que controla la producción endotelial del óxido nítrico ha sido un de los grandes blancos en las respuestas farmacológicas a los fármacos usados en la terapia de enfermedades cardiovasculares. Esta revisión tiene como objetivo abordar los conocimientos corrientes de la interacción entre las variaciones genéticas de la eNOS y las respuestas farmacológicas a los fármacos empleados en el sistema cardiovascular.

Introducción

Los resultados iniciales del Proyecto Genoma fueron publicados en 2001¹ y, en estos últimos ocho años, hubo un gran avance en el entendimiento de los mecanismos moleculares que permean las influencias genéticas en el ser humano. Una de las principales implicaciones del conocimiento acumulado del genoma humano es la investigación de características genéticas y sus asociaciones a fenómenos hasta entonces no explicados.

Palabras clave

Farmacogenética, polimorfismo genético, óxido nítrico, enfermedades cardiovasculares.

Las características genéticas variables (polimorfismos) estudiadas se dividen en tres grandes grupos: polimorfismos de base única (*single nucleotide polymorphisms* – SNPs), variación en el número de repeticiones de secuencias específicas (microsatélites y *variable number of tandem repeats*) e inserciones/delecciones de secuencias génicas específicas. Para ser caracterizadas como polimorfismos, esas características deben tener una frecuencia estable en por lo menos 1% de la población y, por sí solas, no ser capaces de causar alguna enfermedad genética. Esos polimorfismos son responsables por las diferencias de características individuales en cada ser humano en nuestra población.

Recientemente fue disponibilizada la base de datos del International HapMap Project, que muestra los llamados “tagSNPs” (SNPs que señalan la presencia de un conjunto específico de alelos en otros polimorfismos próximos). Polimorfismos situados muy próximos entre sí tienden a segregar en conjunto de los padres a los hijos, formando haplotipos. La idea de los “tagSNPs” es genotipar apenas algunos polimorfismos representantes de esos haplotipos e inferir los demás por probabilidad. Cada población tiene su conjunto de “tagSNPs”, contempladas en gran parte por el HapMap Project².

Inherentes a todos los tratamientos farmacológicos existen situaciones de no respuesta y toxicidad a dosis usuales de fármacos, que no pueden ser explicados por comorbilidades, situaciones fisiológicas específicas o hábitos de los pacientes. La farmacogenética es el campo del conocimiento enfocado en el estudio de interacciones de polimorfismos genéticos con la farmacología, tratando tanto de alteraciones en la cinética de los fármacos (absorción, transporte, metabolización y eliminación) como en la dinámica de la interacción de los fármacos con sus receptores³.

La farmacogenética busca detectar previamente características individuales de los pacientes que puedan identificarlos como “buenos respondedores”, o “malos respondedores”, a cada tratamiento farmacológico. Millones de dólares son gastados anualmente en todo el mundo con tratamientos ineficaces (incapaces de sacar al paciente de una situación de riesgo), o con internaciones por intoxicaciones farmacológicas; situaciones que podrían ser evitadas optimizando la práctica de la “tentativa y error” usada en la clínica⁴. Los datos son de hecho alarmantes: alrededor de 7% del total de internaciones en los Estados Unidos en 2006 y de 6,5% en el Reino Unido en 2004 fueron decurrentes de reacciones adversas a medicamentos^{5,6}. Esos números

Correspondencia: José Eduardo Tanus-Santos •

Av. Bandeirantes 3900 - Monte Alegre - 14090-900 - Ribeirão Preto, SP - Brasil

E-mail: tanus@fmrp.usp.br, tanussantos@yahoo.com

Artículo recibido en 08/07/09; revisado recibido en 08/07/09; aceptado en 25/01/10.

muestran la gran importancia de la personalización y racionalización en el uso de los medicamentos.

Básicamente, el objetivo mayor de la farmacogenética es individualizar los tratamientos farmacológicos de manera racional, dirigida, y, sobre todo, con fuertes bases científicas para reducir los efectos colaterales, la ineficacia terapéutica y sus desdoblamientos.

Los avances en la biología molecular y en la bioquímica han evidenciado el real desafío de la farmacogenética: cada vía fisiológica tiene decenas de proteínas que interactúan entre sí; cada proteína, codificada por su gen (con polimorfismos), puede tener su transcripción regulada por diversas otras proteínas, cuyos genes también tienen polimorfismos. Adicionando complejidad a eso, las vías bioquímicas interactúan entre sí de maneras complejas (muchas de ellas aun desconocidas), de forma que a veces el real causante de una alteración en la respuesta al fármaco no es, de forma alguna, obvio.

Tal complejidad lleva a dos corrientes genéricas para el estudio de la farmacogenética: los estudios basados en *Genome Wide Association Studies* (GWAs), y los estudios basados en las vías fisiológicas y fisiopatológicas de los sistemas biológicos.

Genome Wide Association Studies son estudios grandes que usan técnicas de genotipaje en gran escala, capaces de caracterizar miles de polimorfismos en todo el genoma en un único experimento. Ese tipo de ensayo permite la generación de resultados sin hipótesis preconcebidas. La idea detrás de la utilización de esos estudios en la farmacogenética es que la respuesta a las drogas muchas veces envuelve vías aun desconocidas, dificultando la generación de hipótesis *a priori*⁷. De esa manera, se vuelven posibles, estudios clínicos en gran escala sin necesidad de escoger anteriormente polimorfismos candidatos para asociación con determinado fenotipo. GWAs tienen un enorme potencial de generar nuevas hipótesis, y probablemente serán capaces de estimular el desarrollo del conocimiento en la farmacogenética⁴ en el mediano plazo. Con todo, existen serias limitaciones en ese tipo de estudio: la necesidad de grandes números de pacientes o de un gran efecto clínico por parte de esos polimorfismos, para que el estudio tenga poder estadístico suficiente para detectar diferencias significativas. GWAs envuelven costos altísimos, del orden de millones de dólares cada uno⁸; además de eso, los grandes esfuerzos de reclutamiento de pacientes (los cuales no tienden a reducir costo como las tecnologías empleadas actualmente⁴) dan un indicativo de que GWAS probablemente se restringirán a grandes centros ricos en financiamientos⁷.

Por definición, GWAs testean apenas variantes comunes de los genes, ignorando completamente variantes raras (que pueden, potencialmente, ejercer grandes efectos en la respuesta a fármacos)^{9,10}; además de eso, los chips actuales se basan en los paneles del HapMap Project para cubrir prácticamente la totalidad de los SNPs comunes en el genoma, de modo que poblaciones no representadas en esos paneles pueden tener errores en las inferencias de los haplotipos, en razón de diferencias en los "tagSNPs", que no están siendo contempladas actualmente en ese tipo de estudio¹¹. Existen también limitaciones técnicas en los estudios por chips de

DNA. Para tener una idea, de 83 variantes génicas con gran importancia clínica estudiadas por Peters⁷, apenas 45 son contempladas en los paneles del HapMap Project por causa de dificultades técnicas (imposibilidad de determinar grandes inserciones/delecciones), mostrando que esa tecnología puede estar lejos de ser la herramienta definitiva para estudios en farmacogenética.

Otro desafío en los GWAs es la interpretación de los datos; en algunos casos, ocurren relaciones que se demuestran nítidamente artefactos por fluctuaciones estadísticas⁹. Hasta el momento, la mayoría de los GWAs se concentró en los polimorfismos para susceptibilidad a enfermedades, existiendo apenas pocos estudios en farmacogenética, de forma que aun existe un gran campo para la expansión de ese tipo de estudio en la respuesta diferenciada a los fármacos⁵.

Existe otro abordaje, talvez tan eficiente como los GWAS, para estudiar genes que participan de mecanismos fisiológicos ya conocidos⁸. Esa visión se basa en la sugestión de que si un gen está implicado en la causa de una enfermedad, o es capaz de influenciar la respuesta a un fármaco, probablemente otros genes en la misma vía también pueden estar envueltos⁸. Idealmente, estudios previos determinan el efecto de los polimorfismos por ensayos moleculares de expresión y/o actividad enzimática, y los resultados encontrados pueden entonces ser verificados en seres humanos en estudios clínicos¹⁰. En esos, el genotipaje es realizado por métodos comunes, y es controlado por el análisis de marcadores bioquímicos relacionados a la proteína afectada, y por la asociación con el fenotipo final (enfermedad o respuesta al tratamiento). Ese abordaje genotipo-bioquímica-fenotipo final es de gran valor, pues polimorfismos genéticos pueden causar alteración en la actividad o expresión de proteínas. Esas, a su vez, pueden alterar las concentraciones plasmáticas de algún producto bioquímico envuelto en un proceso fisiopatológico. De esa forma, tales polimorfismos pueden tener gran valor predictivo en la clínica médica. Dos ejemplos recientes de estudios que podemos citar son: (i) el estudio de polimorfismos en el gen de la aldosterona sintasa, con posterior cuantificación de la concentración de aldosterona circulante, y evaluación de la asociación con hipertensión resistente¹²; (ii) el estudio de polimorfismos en la eNOS, cuantificación de niveles plasmáticos de nitrito, e investigación de la asociación con preeclampsia¹³. Ese abordaje no necesita recursos humanos y financieros tan grandes y, por sus características, posee un gran potencial de generar resultados más enfocados en los problemas clínicos, con aplicabilidad a corto plazo.

Probablemente, lo ideal sería buscar la complementación de GWAs con estudios tradicionales, uniendo el gran alcance de los GWAS con las ventajas de tener el foco en hipótesis de gran interés. Esa combinación podría llevar a conclusiones más sólidas, sin descuidar hallazgos importantes⁷.

En fin, la farmacogenética es una ciencia nueva, que promete grandes impactos en la manera como las enfermedades serán tratadas. Esta revisión abordará los mecanismos de la interacción de polimorfismos en el gen de la sintasa endotelial de óxido nítrico con las respuestas farmacológicas a las drogas cardiovasculares en uso corriente.

Relevancia del óxido nítrico para el aparato cardiovascular

El endotelio tiene un papel importante en la regulación de la homeostasis vascular y en la manutención del tono vascular, estando envuelto con vías fisiológicas importantes en el control de la resistencia arterial al flujo sanguíneo. Entre diversos mediadores liberados por el endotelio, el óxido nítrico (NO) ejerce papel fundamental en la regulación del sistema cardiovascular. Después de su formación por el endotelio, el NO se difunde al músculo liso y interactúa con el grupo heme de la guanilato ciclasa soluble (sGC) volviéndola activa. Esa enzima sintetiza guanosina monofosfato cíclica (GMPc) a partir de la guanosina trifosfato (GTP), llevando a una acumulación de GMPc en esas células. Eso activa vías de señalización intracelulares que disminuyen el grado de contracción del músculo liso vascular, llevando al relajamiento del vaso¹⁴. Además de esos efectos vasculares, el NO también está envuelto en la inhibición de la agregación y adhesión plaquetaria.

El NO es formado por las enzimas NO-sintasas (NOS), que catalizan la conversión de L-arginina en L-citrulina y NO. Existen tres isoformas de esa enzima: neuronal (nNOS o NOSI), inducida (iNOS o NOSII) y endotelial (eNOS o NOSIII)¹⁵. La nNOS es encontrada en una variedad de células que incluyen las neuronas y células endoteliales. Tanto la nNOS como la eNOS son isoformas constitutivas y son calcio-dependientes, necesitando el aumento de los niveles de calcio intracelular y consecuente ligazón de éste con la calmodulina (CaM) para la activación de esas enzimas. La iNOS no es constitutiva y es expresada en procesos inflamatorios.

En el sistema cardiovascular, la eNOS es la principal responsable por la síntesis de NO^{14,16}. La eNOS se ubica en las invaginaciones de la membrana plasmática de células endoteliales, denominadas caveolas. La interacción de la eNOS con una proteína llamada caveolina resulta en la inactividad de la eNOS que se debe, en parte, a la ocupación del sitio de ligazón de la calmodulina¹⁷.

La reducción de la expresión o de la actividad de la eNOS puede resultar en menor producción de NO. Diversos estudios han sugerido que el desequilibrio en la biodisponibilidad del NO ejerce papel significativo en la disfunción endotelial. Varias enfermedades están asociadas a disfunción endotelial y reducción de la biodisponibilidad del NO, entre ellas, hipertensión¹⁸, preeclampsia¹⁹ y síndrome metabólico²⁰.

El estrés oxidativo está envuelto en procesos fisiopatológicos de inúmeras enfermedades cardiovasculares, y existen evidencias que demuestran su contribución en la disfunción endotelial. Las especies reactivas del oxígeno (ROS), como el anión superóxido, reaccionan con el NO resultando en la formación de peroxinitrito. El aumento en la producción de ROS lleva, por lo tanto, a una reducción de la biodisponibilidad del NO²¹, pudiendo favorecer el surgimiento de diversas enfermedades cardiovasculares. El aumento de las ROS también puede llevar a la oxidación del cofactor BH4 de la eNOS, llevando a un desacoplamiento de esa enzima. De esa forma, la eNOS pasa a producir anión superóxido en vez de NO²², llevando a un ciclo vicioso que aumenta cada vez más el estrés oxidativo y reduce cada vez más la disponibilidad de NO.

Relevancia del óxido nítrico para las respuestas a las drogas de acción cardiovascular

Diversos grupos de drogas usadas en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares aumentan la biodisponibilidad de NO. Entre ellas, tenemos los inhibidores de la enzima convertidora de Angiotensina (iECA), antagonistas de los receptores de Angiotensina II (Ang II) y los bloqueadores de canales de calcio (BCC)²³. Además de esos antihipertensivos, diversos estudios han evidenciado el aumento del NO causado por inhibidores de la 3-metilglutaril coenzima A reductasa (estatinas), probablemente de forma independiente de la reducción de los niveles de lípidos^{24,25}.

Inhibidores de la ECA actúan reduciendo las concentraciones de Ang II, un potente vasoconstrictor endógeno. Paralelamente, ocurre un aumento de las concentraciones de cininas (cuyo efecto predominante es opuesto a la AngII), y eso contribuye a los efectos cardiovasculares de esas drogas²⁶. Los iECA parecen también estimular la expresión y actividad de la eNOS^{27,28}, probablemente envolviendo la ligazón de las cininas a sus receptores^{29,31}. Esos efectos son inhibidos por el tratamiento concomitante con HOE-140, un antagonista del receptor B₂ de cinina^{27,32}.

Los inhibidores de los receptores de Ang II son utilizados por inhibir competitivamente la ligazón de la Ang II al receptor AT1, atenuando los efectos vasoconstrictores de la Ang II. Esas drogas también actúan aumentando la biodisponibilidad de NO, probablemente por el aumento de la expresión proteína eNOS o activación de otros receptores que llevan a la activación de la eNOS^{23,33}.

Los bloqueadores de canales de calcio (BCC) inhiben la entrada de calcio en las células musculares lisas, y de esa forma llevan a una menor contractibilidad y débito cardíaco. Existen evidencias de que esa clase también aumenta la biodisponibilidad del NO^{23,34}. Estudios clínicos evidenciaron significativa mejora de la vasodilatación endotelio-dependiente en pacientes hipertensos e hipercolesterolémicos tratados con BCC, mostrando reversión de la disfunción endotelial²³. Probablemente el aumento del NO es consecuencia del aumento de la actividad y expresión de la eNOS asociado a esas drogas³⁵.

Las estatinas están entre las drogas más ampliamente usadas y efectivas para prevención de enfermedades cardiovasculares³⁶, especialmente cuando se consideran sus acciones sobre las concentraciones circulantes de lipoproteínas y sus efectos cardioprotectores de largo plazo. Algunos de los efectos pleiotrópicos observados parecen estar asociados al aumento de la producción endógena de NO^{37,38}, posiblemente atribuidos al aumento expresión y actividad de la eNOS^{39,40}.

La disfunción eréctil es un desorden de origen neuronal y vascular, y está siendo vista como un factor de riesgo precoz para otras enfermedades cardiovasculares⁴¹. Los inhibidores de la fosfodiesterasa 5 (IPDE-5) son fármacos empleados en la disfunción eréctil y en la hipertensión pulmonar por actuar por medio de la inhibición de la degradación de GMPc, llevando a un relajamiento de la musculatura lisa de los vasos. En el caso de la hipertensión pulmonar eso

llevaría a una normalización de la presión, y en la disfunción eréctil facilitaría el entumecimiento del pene a consecuencia del estímulo neurogénico⁴¹. Síndromes en que la síntesis de NO está comprometida, como diabetes e insuficiencia cardíaca, reducen la eficacia de los IPDE-5 actuales en inducir vasodilatación^{42,43} y alterar la función cardíaca⁴⁴.

Polimorfismos genéticos de la eNOS

El gen de la eNOS (ubicado en la región 7q35-7q36) contiene 26 exones, 25 intrones y aproximadamente 21 a 22 Kb^{45,46}. Desde su caracterización en el comienzo de los años 1990, gran número de sitios polimórficos fue identificado, incluyendo VNTRs, repeticiones de dinucleótidos (CA)_n y SNPs⁴⁷. Varios de esos polimorfismos han sido asociados a enfermedades cardiovasculares, tales como hipertensión, preeclampsia, entre otras⁴⁷⁻⁴⁹.

Uno de los polimorfismos clínicamente relevantes más estudiados es un SNP en la región promotora (T^{-786C}), frecuentemente asociado al desarrollo de enfermedad coronaria^{50,51}. Estudios *in vitro* indican que la sustitución de la timina por la citosina en la posición -786 reduce en cerca de 50% la actividad transcripcional^{51,52} (fig. 1A y 1B). Probablemente, ese efecto ocurra por una mayor ligazón de

la RPA1 (replication protein A1), que actúa como una proteína represora génica⁵¹ en individuos con el alelo raro (fig. 1B).

Otro polimorfismo en el gen de la eNOS ampliamente estudiado es un VNTR ubicado en el intrón 4 (repetición de 27pb). Los alelos más encontrados presentan cuatro copias (variante a, más rara) o cinco copias (variante b, más común). Los estudios de funcionalidad y de asociación de ese polimorfismo con eventos cardiovasculares han demostrado resultados conflictivos^{47,53,54}. Recientemente ha sido propuesto que ese polimorfismo regularía la expresión de la eNOS por la formación de pequeños RNAs (sirRNA). Células endoteliales conteniendo cinco copias presentan cantidades mayores de sirRNA y menores niveles de mRNA de la eNOS que células conteniendo cuatro copias^{55,56} (Fig. 1C y 1D), lo que podría explicar la asociación de ese polimorfismo con riesgo cardiovascular.

Un tercer polimorfismo, un SNP ubicado en el exón 7 del gen de la eNOS ha sido asociado a riesgo cardiovascular^{47,57}. Ese polimorfismo es caracterizado por una conversión de la guanina por la timina en la posición 894 del gen, y consecuente sustitución de la glutamina (alelo más común) por el aspartato (alelo más raro) en el residuo 298 de la eNOS (Glu298Asp)⁴⁵. Evidencias apuntan a menores formaciones

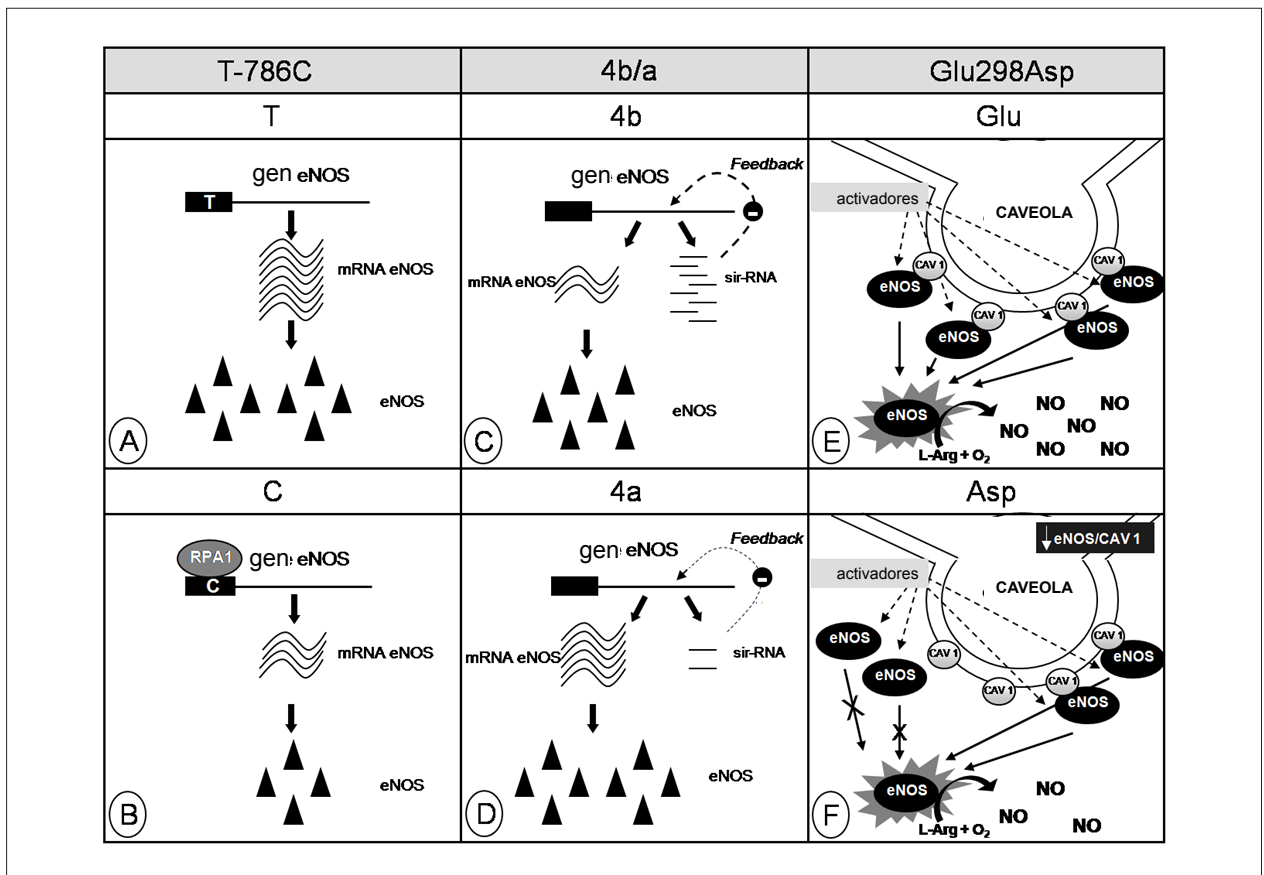


Figura 1 - Representación de los posibles mecanismos explicando las asociaciones de los polimorfismos en el gen de la sintasa endotelial del óxido nítrico (eNOS) con variaciones en la su acción. A y B: polimorfismo en la región promotora (T-786C); C y D: polimorfismo en el intrón 4 (4b/a); E y F: polimorfismo en el exón 7 (Glu298Asp). RPA1 (Replication Protein A1), MP (Membrana Plasmática), CAV 1 (Caveolina 1) y sir-RNA (short intronic repeat RNA). Ver detalles en el texto.

de NO en individuos portadores del alelo Asp, llevando a posibles alteraciones funcionales^{58,59}. Células endoteliales portadoras de ese alelo parecen producir menos NO, por una disminución en la disponibilidad de la eNOS en la caveola de esas células⁶⁰ (fig. 1E y 1F). La ubicación celular de la eNOS y su ligazón a la caveolina 1 desempeñan papel fundamental para actividad de la enzima.

A pesar de las evidencias discutidas anteriormente, existe cierta controversia en la influencia genética de la eNOS sobre las enfermedades cardiovasculares⁴⁷. Una posible explicación para esos resultados discrepantes puede ser que simples asociaciones clínicas hechas a partir del análisis de un único marcador genético (genotipo) con un fenotipo clínico no tengan un poder suficiente para detección de sus efectos pequeños. Un abordaje alternativo sería el análisis de la combinación de varios marcadores genéticos en paralelo (haplotipo)^{48,61}. Por ejemplo, Sandrim et al.⁶² evaluaron la influencia de los genotipos/haplotipos de la eNOS en la elevación de la presión arterial utilizando los tres polimorfismos más comunes (T^{-786C}; Glu298Asp y 4b/la). El análisis de genotipos no evidenció que haya diferencias significativas entre normotensos e hipertensos. Entre tanto, el análisis haplotípico mostró claramente la existencia de diferencias significativas entre los dos grupos experimentales. Aun, otros estudios mostraron asociación de haplotipos de la eNOS con diferentes concentraciones circulantes de nitrito, lo que sugiere que esos haplotipos puedan tener implicaciones funcionales que propicien riesgo variado de desarrollo de enfermedades cardiovasculares^{63,64}. Ese abordaje haplotípico parece ser más promisorio que el análisis de apenas un polimorfismo por vez, especialmente en el estudio de enfermedades complejas.

Estudios de respuestas a drogas de acción cardiovascular siendo afectadas por polimorfismos de la eNOS

Estudios han mostrado relaciones entre polimorfismos del gen de la eNOS con respuestas diferenciadas a diversas clases de drogas utilizadas en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

Evidencias recientes sugieren una modulación de los efectos de las estatinas por polimorfismos genéticos de la eNOS. Curiosamente, un estudio con células endoteliales en cultivo, tratadas con estatinas, mostró que esos fármacos inducen mayores aumentos de los niveles de mRNA de la eNOS en células endoteliales con genotipo CC cuando son comparadas a células TT para el polimorfismo T^{-786C}⁶⁵. Eso se debe, probablemente, a la mayor actividad transcripcional, aumento de la estabilidad del mRNA y disminución de la expresión de RPA1⁶⁵. Confirmando esos hallazgos en cultivos de células endoteliales, un estudio clínico mostró efectos similares con la atorvastatina⁶⁶. En ese estudio, se demostró que el tratamiento con estatina aumentó la biodisponibilidad del NO y disminuyó el estrés oxidativo apenas en individuos homocigotos CC para el polimorfismo T^{-786C}⁶⁶. Nótese que fueron estudiados individuos sanos, haciendo que la droga tuviese mucho menos posibilidad de producir efectos significativos⁶⁶. Posteriormente, fue observado que los efectos

antiinflamatorios de la atorvastatina son modulados por el mismo polimorfismo, llevando a una reducción significativa en las concentraciones de citocinas inflamatorias (CD40L, VCAM-1, P-selectina y MMP-9) en individuos con genotipo CC, pero no en los individuos TT⁶⁷. Estudios funcionales demostraron subsecuentemente que el tratamiento a corto plazo con estatinas es capaz de reducir la fluidez de la membrana plasmática de hematíes en individuos con genotipo CC, pero no con genotipo TT, durante tratamiento con atorvastatina⁶⁸. Juntos, esos hallazgos indican que la atorvastatina podría ser más útil para la prevención de eventos cardiovasculares en individuos con el genotipo CC (cuyo riesgo cardiovascular se ha demostrado aumentado) que en individuos con genotipo TT.

De cualquier forma, los resultados de los estudios con atorvastatina mencionados deben ser interpretados con cautela, pues no fueron evaluados eventos clínicamente relevantes y la simple medida de marcadores bioquímicos puede no ser efectiva para indicar nuevos usos de drogas. Estudios clínicos enfocando eventos clínicamente relevantes deberían ser hechos para comprobar los resultados discutidos antes.

Aunque la mayoría de los estudios farmacogenéticos de las estatinas relacionados a eNOS se centre en el polimorfismo en la región promotora de la eNOS, el polimorfismo en el intrón 4 también parece modular la respuesta a las estatinas. Kunnas et al.⁶⁹ evaluaron la vasodilatación coronaria inducida por adenosina en individuos sanos después de seis meses de tratamiento con pravastatina. Los individuos portadores del alelo "a" mostraron significativa mejora de la vasodilatación cuando fueron comparados a los individuos con genotipo "bb", posiblemente por el mayor aumento de la producción endotelial de NO en los individuos con el alelo raro⁶⁹.

Otro polimorfismo en el gen de la eNOS, Glu298Asp en el exón 7, parece modular los efectos del estradiol en la función plaquetaria. El pretratamiento con 17 β -estradiol aumentó de forma significativa la tasa de agregación plaquetaria, acompañada por la elevación de la liberación de iones superóxido por las plaquetas apenas en individuos homocigotos para el alelo Asp298. La liberación de NO derivado de las plaquetas no fue alterada por los polimorfismos Glu298Asp, T^{-786C} y 4b/la después de tratamiento. Adicionalmente, el efecto del hormona en la función plaquetaria no fue afectado por los polimorfismos en la región promotora e intrón 4⁵⁸.

Una de las clases de fármacos más importantes en el control de la hipertensión, especialmente en el caso de exceso de volumen, es la de los diuréticos tiazídicos. La hidroclorotiazida (HCTZ) es su representante más utilizado en la clínica médica. Fue demostrado que el polimorfismo Glu298Asp en el gen de la eNOS es capaz de modular la respuesta a la HCTZ, de manera que individuos homocigotos para el alelo Glu tienen una reducción en los niveles de presión arterial significativamente mayor que individuos poseedores del alelo Asp⁷⁰. A pesar de que el efecto es significativo, es pequeño, lo que evidencia que difícilmente un único polimorfismo será capaz de explicar todo el *background* genético por detrás de variaciones en las respuestas farmacológicas de una clase de medicamentos.

Otras clases de antihipertensivos de gran importancia son los betabloqueantes y los inhibidores del receptor AT-1 de angiotensina 2. Un estudio usando técnicas análogas

a los GWAS mostró resultados promisorios asociando polimorfismos menos estudiados de la eNOS a variaciones en las respuestas farmacológicas de propanolol y irbesartan (betabloqueante e inhibidor del receptor AT-1 de angiotensina 2, respectivamente). El alelo G del polimorfismo A²⁹⁹⁶G fue asociado con una mayor disminución de la presión arterial consecuencia del efecto del betabloqueante atenolol en relación al alelo A⁷¹. El alelo A del polimorfismo G⁴⁹⁸A fue asociado a una mejor respuesta tanto ante el betabloqueante como ante el irbesartan⁷¹. La presencia de los alelos 2996G y del alelo 498A podría incurrir en un beneficio mayor a los portadores de esos alelos tratados con esos antihipertensivos. Esos resultados, a pesar de promisorios, aun deben ser confirmados en estudios con mayor número de pacientes, de diferentes poblaciones.

La hipertensión normalmente es tratada con la adición de diferentes clases de antihipertensivos hasta la reducción de la presión arterial a los niveles preconizados⁷². Hipertensos resistentes son individuos que mantienen sus niveles de presión arterial encima de 140/90 mmHg a pesar del uso de tres clases diferentes de antihipertensivos, incluyendo un diurético. En ese contexto, fue demostrada una tendencia no significativa de asociación entre el alelo Asp (Glu298Asp) e hipertensión resistente⁷³. Estudios posteriores analizando haplotipos de la eNOS no confirmaron ninguna asociación con la resistencia a la terapia antihipertensiva⁶².

La disponibilidad de NO afecta la predisposición a la disfunción eréctil de forma análoga a la hipertensión. La clase de los fármacos utilizados en el tratamiento de la disfunción eréctil, los IPE-5, también sufre influencia de polimorfismos en su respuesta terapéutica. Como fue comentado anteriormente, la disponibilidad de NO es un factor determinante para la actividad de los IPDE-5⁴². Fue demostrado que hombres homocigoto para el alelo Asp (asociado a la menor producción de NO) obtuvieron menor respuesta al sildenafil cuando comparados a los individuos con genotipo Glu/Glu⁷⁴.

Conclusiones generales

La farmacogenética es un área de la farmacología bastante reciente, y aun tiene mucho para crecer. Los resultados del

proyecto genoma causaron una promoción y popularización del área, y estamos viviendo actualmente un momento previo a una gran expansión, gracias a los *Genome Wide Association Studies*. A pesar de eso, la mayoría de los estudios aun se enfoca en las bases genéticas de enfermedades complejas, sin gran atención a las respuestas farmacológicas. En relación a los sistemas de producción del óxido nítrico, importantes pasos iniciales fueron dados, y hoy existen fuertes indicios de que estatinas y estradiol de hecho pueden sufrir modulación por el *background* genético del gen de la eNOS en sus funciones farmacológicas. Aun son necesarios estudios más profundos en relación a los antihipertensivos, y demás medicamentos que actúan sobre el sistema cardiovascular.

Es importante destacar que los avances prometidos por la farmacogenética, infelizmente, aun están lejos de la práctica clínica y del paciente.

Perspectivas

El futuro de la medicina camina cada vez más hacia la personalización de las terapias, y hacia el uso racional de tratamientos farmacológicos. La farmacogenética tiene un gran espacio en ese escenario hipotético. La idea, llevada a un extremo utópico, sería identificar los polimorfismos genéticos importantes en el nacimiento, de modo de escoger *a priori* todos los posibles futuros tratamientos del individuo, adecuando las dosis al perfil metabólico predicho por su DNA.

La hipertensión, un de los mayores males del mundo moderno, podría ser tratada de manera más eficaz, posiblemente hasta prevenida, mediante la identificación precoz de marcadores de riesgo, y del tratamiento profiláctico.

De manera general, los avances genéticos prometen revolucionar la medicina en las próximas décadas; resta evaluar cuales de las grandes promesas del fin del siglo XX (terapia génica, células tronco, farmacogenética) van realmente a dar frutos, y en que proporción.

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo financiero de la Fapesp, del CNPq y de la Capes.

Referencias

1. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nussbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001; 409 (6822): 860-921.
2. The International HapMap Project. *Nature*. 2003; 426 (6968): 789-96.
3. Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med*. 2003; 348 (6): 538-49.
4. Gurwitz D, McLeod HL. Genome-wide association studies: powerful tools for improving drug safety and efficacy. *Pharmacogenomics*. 2009; 10 (2): 157-9.
5. Budnitz DS, Pollock DA, Weidenbach KN, Mendelsohn AB, Schroeder TJ, Annet JL. National surveillance of emergency department visits for outpatient adverse drug events. *JAMA*. 2006; 296 (15): 1858-66.
6. Pirmohamed M, James S, Meakin S, Green C, Scott AK, Walley TJ, et al. Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: prospective analysis of 18 820 patients. *BMJ*. 2004; 329 (7456): 15-9.
7. Peters EJ, McLeod HL. Ability of whole-genome SNP arrays to capture 'must have' pharmacogenomic variants. *Pharmacogenomics*. 2008; 9 (11): 1573-7.
8. Bader JS. Systems approaches for pharmacogenetics and pharmacogenomics. *Pharmacogenomics*. 2008; 9 (3): 257-62.
9. Topol EJ, Frazer KA. The resequencing imperative. *Nat Genet*. 2007; 39 (4): 439-40.
10. Dorn GW 2nd, Cresci S. The mechanistic imperative for pharmacogenomics. *Pharmacogenomics*. 2008; 9 (7): 801-3.
11. Marsh S. Pharmacogenetics: global clinical markers. *Pharmacogenomics*. 2008; 9 (4): 371-3.
12. Lacchini R, Sabha M, Coeli FB, Favero FF, Yugar-Toledo J, Izidoro-Toledo TC, et al. T allele of -344C/T polymorphism in aldosterone synthase gene is not associated with resistant hypertension. *Hypertens Res*. 2009; 32 (2): 159-62.
13. Sandrim VC, Palei AC, Cavalli RC, Araujo FM, Ramos ES, Duarte G, et al. eNOS haplotypes associated with gestational hypertension or preeclampsia. *Pharmacogenomics*. 2008; 9 (10): 1467-73.
14. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993; 329 (27): 2002-12.
15. Kiechle FL, Malinski T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology, and detection. *Am J Clin Pathol*. 1993; 100 (5): 567-75.
16. Cooke JP, Dzau VJ. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med*. 1997; 48: 489-509.
17. Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2006; 46: 235-76.
18. Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, et al. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation*. 2001; 104 (2): 191-6.
19. Sandrim VC, Palei AC, Metzger IF, Gomes VA, Cavalli RC, Tanus-Santos JE. Nitric oxide formation is inversely related to serum levels of antiangiogenic factors soluble fms-like tyrosine kinase-1 and soluble endogline in preeclampsia. *Hypertension*. 2008; 52 (2): 402-7.
20. Gomes VA, Casella-Filho A, Chagas AC, Tanus-Santos JE. Enhanced concentrations of relevant markers of nitric oxide formation after exercise training in patients with metabolic syndrome. *Nitric Oxide*. 2008; 19 (4): 345-50.
21. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*. 1986; 320 (6061): 454-6.
22. 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 U S A*. 1998; 95 (16): 9220-5.
23. Mason RP, Cockcroft JR. Targeting nitric oxide with drug therapy. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2006; 8 (12 Suppl 4): 40-52.
24. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005; 45: 89-118.
25. Palinski W. New evidence for beneficial effects of statins unrelated to lipid lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21 (1): 3-5.
26. Sharma JN, Abbas SA. Effect of captopril in the presence of kinin B2 receptor antagonist on duration of survival after prolonged coronary artery ligation in hypertensive rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2006; 28 (4): 217-21.
27. Cargnoni A, Comini L, Bernocchi P, Bachetti T, Ceconi C, Curello S, et al. Role of bradykinin and eNOS in the anti-ischaemic effect of trandolapril. *Br J Pharmacol*. 2001; 133 (1): 145-53.
28. Wiemer G, Linz W, Hatrik S, Scholkens BA, Malinski T. Angiotensin-converting enzyme inhibition alters nitric oxide and superoxide release in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*. 1997; 30 (5): 1183-90.
29. Zhuo JL, Mendelsohn FA, Ohishi M. Perindopril alters vascular angiotensin-converting enzyme, AT(1) receptor, and nitric oxide synthase expression in patients with coronary heart disease. *Hypertension*. 2002; 39 (2 Pt 2): 634-8.
30. Silvestre JS, Bergaya S, Tamarat R, Duriez M, Boulanger CM, Levy BI. Proangiogenic effect of angiotensin-converting enzyme inhibition is mediated by the bradykinin B(2) receptor pathway. *Circ Res*. 2001; 89 (8): 678-83.
31. Veeravalli KK, Akula A. Involvement of nitric oxide and prostaglandin pathways in the cardioprotective actions of bradykinin in rats with experimental myocardial infarction. *Pharmacol Res*. 2004; 49 (1): 23-9.
32. Bachetti T, Comini L, Pasini E, Cargnoni A, Curello S, Ferrari R. ACE-inhibition with quinapril modulates the nitric oxide pathway in normotensive rats. *J Mol Cell Cardiol*. 2001; 33 (3): 395-403.
33. Thai H, Wollmuth J, Goldman S, Gaballa M. Angiotensin subtype 1 receptor (AT1) blockade improves vasorelaxation in heart failure by up-regulation of endothelial nitric-oxide synthase via activation of the AT2 receptor. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 307 (3): 1171-8.
34. Mason RP, Marche P, Hintze TH. Novel vascular biology of third-generation L-type calcium channel antagonists: ancillary actions of amlodipine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23 (12): 2155-63.
35. Kobayashi N, Yanaka H, Tojo A, Kobayashi K, Matsuoka H. Effects of amlodipine on nitric oxide synthase mRNA expression and coronary microcirculation in prolonged nitric oxide blockade-induced hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999; 34 (2): 173-81.
36. Zineh I. Pharmacogenetics of response to statins. *Curr Atheroscler Rep*. 2007; 9 (3): 187-94.
37. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004; 109 (23 Suppl 1): III27-32.
38. Wolfrum S, Jensen KS, Liao JK. Endothelium-dependent effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23 (5): 729-36.
39. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation*. 1998; 97 (12): 1129-35.
40. Sumi D, Hayashi T, Thakur NK, Jayachandran M, Asai Y, Kano H, et al. A HMG-CoA reductase inhibitor possesses a potent anti-atherosclerotic effect other than serum lipid lowering effects--the relevance of endothelial nitric oxide synthase and superoxide anion scavenging action. *Atherosclerosis*. 2001; 155 (2): 347-57.
41. Jackson G. Treatment of erectile dysfunction in patients with cardiovascular disease: guide to drug selection. *Drugs*. 2004; 64 (14): 1533-45.
42. Bivalacqua TJ, Usta MF, Champion HC, Leungwattanakij S, Dabisch PA, McNamara DB, et al. Effect of combination endothelial nitric oxide synthase gene therapy and sildenafil on erectile function in diabetic rats. *Int J Impot Res*. 2004; 16 (1): 21-9.
43. Nagayama T, Zhang M, Hsu S, Takimoto E, Kass DA. Sustained soluble guanylate cyclase stimulation offsets nitric-oxide synthase inhibition to restore acute cardiac modulation by sildenafil. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008; 326 (2): 380-7.

44. Senzaki H, Smith CJ, Juang GJ, Isoda T, Mayer SP, Ohler A, et al. Cardiac phosphodiesterase 5 (cGMP-specific) modulates beta-adrenergic signaling in vivo and is down-regulated in heart failure. *FASEB J*. 2001; 15 (10): 1718-26.
45. 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 (23): 17478-88.
46. 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 (3): 719-26.
47. Cooke GE, Doshi A, Binkley PF. Endothelial nitric oxide synthase gene: prospects for treatment of heart disease. *Pharmacogenomics*. 2007; 8 (12): 1723-34.
48. Pereira TV, Rudnicki M, Cheung BM, Baum L, Yamada Y, Oliveira PS, et al. Three endothelial nitric oxide (NOS3) gene polymorphisms in hypertensive and normotensive individuals: meta-analysis of 53 studies reveals evidence of publication bias. *J Hypertens*. 2007; 25 (9): 1763-74.
49. Sandrim VC, Palei AC, Cavalli RC, Araujo FM, Ramos ES, Duarte G, et al. Vascular endothelial growth factor genotypes and haplotypes are associated with pre-eclampsia but not with gestational hypertension. *Mol Hum Reprod*. 2009; 15 (2): 115-20.
50. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Ogawa H, Kugiyama K, et al. T(-786)-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with myocardial infarction, especially without coronary organic stenosis. *Am J Cardiol*. 2000; 86 (6): 628-34.
51. Miyamoto Y, Saito Y, Nakayama M, Shimasaki Y, Yoshimura T, Yoshimura M, et al. Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T-->C mutation associated with coronary spastic angina. *Hum Mol Genet*. 2000; 9 (18): 2629-37.
52. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, et al. T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation*. 1999; 99 (22): 2864-70.
53. Wang XL, Mahaney MC, Sim AS, Wang J, Wang J, Blangero J, et al. Genetic contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17 (11): 3147-53.
54. Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, Takemoto F, Hara S, Yamada A, et al. Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 245 (1): 190-3.
55. Zhang MX, Zhang C, Shen YH, Wang J, Li XN, Chen L, et al. Effect of 27nt small RNA on endothelial nitric-oxide synthase expression. *Mol Biol Cell*. 2008; 19 (9): 3997-4005.
56. Zhang MX, Zhang C, Shen YH, Wang J, Li XN, Zhang Y, et al. Biogenesis of short intronic repeat 27-nucleotide small RNA from endothelial nitric-oxide synthase gene. *J Biol Chem*. 2008; 283 (21): 14685-93.
57. Casas JP, Bautista LE, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation*. 2004; 109 (11): 1359-65.
58. Tanus-Santos JE, Desai M, Deak LR, Pezzullo JC, Abernethy DR, Flockhart DA, et al. Effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on platelet function, nitric oxide release, and interactions with estradiol. *Pharmacogenetics*. 2002; 12 (5): 407-13.
59. Godfrey V, Chan SL, Cassidy A, Butler R, Choy A, Fardon T, et al. The functional consequence of the Glu298Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene in young healthy volunteers. *Cardiovasc Drug Rev*. 2007; 25 (3): 280-8.
60. Joshi MS, Mineo C, Shaul PW, Bauer JA. Biochemical consequences of the NOS3 Glu298Asp variation in human endothelium: altered caveolar localization and impaired response to shear. *Faseb J*. 2007; 21 (11): 2655-63.
61. Crawford DC, Nickerson DA. Definition and clinical importance of haplotypes. *Annu Rev Med*. 2005; 56:303-20.
62. Sandrim VC, Yugar-Toledo JC, Desta Z, Flockhart DA, Moreno H Jr, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase haplotypes are related to blood pressure elevation, but not to resistance to antihypertensive drug therapy. *J Hypertens*. 2006; 24 (12): 2393-7.
63. Metzger IF, Sertorio JT, Tanus-Santos JE. Modulation of nitric oxide formation by endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes. *Free Radic Biol Med*. 2007; 43 (6): 987-92.
64. Metzger IF, Souza-Costa DC, Marroni AS, Nagassaki S, Desta Z, Flockhart DA, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes associated with circulating concentrations of nitric oxide products in healthy men. *Pharmacogenet Genomics*. 2005; 15 (8): 565-70.
65. Abe K, Nakayama M, Yoshimura M, Nakamura S, Ito T, Yamamuro M, et al. Increase in the transcriptional activity of the endothelial nitric oxide synthase gene with fluvastatin: a relation with the -786T>C polymorphism. *Pharmacogenet Genomics*. 2005; 15 (5): 329-36.
66. Nagassaki S, Sertorio JT, Metzger IF, Bem AF, Rocha JB, Tanus-Santos JE. eNOS gene T-786C polymorphism modulates atorvastatin-induced increase in blood nitrite. *Free Radic Biol Med*. 2006; 41 (7): 1044-9.
67. Souza-Costa DC, Sandrim VC, Lopes LF, Gerlach RF, Rego EM, Tanus-Santos JE. Anti-inflammatory effects of atorvastatin: modulation by the T-786C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene. *Atherosclerosis*. 2007; 193 (2): 438-44.
68. Nagassaki S, Herculano RD, Graeff CF, Tanus-Santos JE. eNOS T-786C polymorphism affects atorvastatin-induced changes in erythrocyte membrane fluidity. *Eur J Clin Pharmacol*. 2009; 65 (4): 385-92.
69. Kunnas TA, Lehtimäki T, Laaksonen R, Ilveskoski E, Janatuinen T, Vesalainen R, et al. Endothelial nitric oxide synthase genotype modulates the improvement of coronary blood flow by pravastatin: a placebo-controlled PET study. *J Mol Med*. 2002; 80 (12): 802-7.
70. Turner ST, Chapman AB, Schwartz GL, Boerwinkle E. Effects of endothelial nitric oxide synthase, alpha-adducin, and other candidate gene polymorphisms on blood pressure response to hydrochlorothiazide. *Am J Hypertens*. 2003; 16 (10): 834-9.
71. Liljedahl U, Karlsson J, Melhus H, Kurland L, Lindersson M, Kahan T, et al. A microarray minisequencing system for pharmacogenetic profiling of antihypertensive drug response. *Pharmacogenetics*. 2003; 13 (1): 7-17.
72. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA*. 2003; 289 (19): 2560-72.
73. Jachymova M, Horky K, Bultas J, Kozich V, Jindra A, Peleska J, et al. Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension resistant to conventional therapy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 284 (2): 426-30.
74. Eisenhardt A, Sperling H, Hauck E, Porst H, Stief C, Rubben H, et al. ACE gene I/D and NOS3 G894T polymorphisms and response to sildenafil in men with erectile dysfunction. *Urology*. 2003; 62 (1): 152-7.