

# Polimorfismos NOS3 e Insuficiência Renal Crônica

## NOS3 Polymorphisms and Chronic Kidney Disease

### Autores

Alejandro Marín Medina<sup>1</sup>  
 Eduardo Esteban Zubero<sup>2</sup>  
 Moisés Alejandro Alatorre Jiménez<sup>3,4,5</sup>  
 Sara Anabel Alonso Barragan<sup>3,4,5</sup>  
 Carlos Arturo López García<sup>6</sup>  
 José Juan Gómez Ramos<sup>7</sup>  
 Juan Francisco Santoscoy Gutierrez<sup>8</sup>  
 Zurisadai González Castillo<sup>9</sup>

<sup>1</sup> Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Departamento de Genética, Guadalajara, México.

<sup>2</sup> Universidad de Zaragoza, Departamento de Farmacología y Fisiología, Zaragoza, España.

<sup>3</sup> Asociación Mexicana de Atrofia Muscular Espinal, Guadalajara, México.

<sup>4</sup> Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Departamento de Neurociencias, Guadalajara, México.

<sup>5</sup> Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Guadalajara, México.

<sup>6</sup> University of Texas Health Science Center at San Antonio, Department of Cellular and Structural Biology, San Antonio, United States.

<sup>7</sup> Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Hospital General Regional No. 89, Guadalajara, México.

<sup>8</sup> Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Departamento de Neurociencia, Guadalajara, México.

<sup>9</sup> Asociación Mexicana de Atrofia Muscular Espinal (AMAME), Guadalajara, México.

Data de submissão: 09/06/2017.

Data de aprovação: 11/07/2017.

### Correspondência para:

Alejandro Marín Medina.  
 E-mail: stat5a@hotmail.com

DOI: 10.1590/2175-8239-JBN-3824

### RESUMO

A insuficiência renal crônica (IRA) é um processo fisiopatológico multifatorial e irreversível que frequentemente conduz a um estado terminal no qual o paciente passa a necessitar de tratamento por transplante renal. A maioria dos casos de IRA são devidos a doenças crônicas degenerativas; a disfunção endotelial é um dos fatores contribuintes na fisiopatologia. Um dos mecanismos mais importantes para o funcionamento adequado do endotélio é a regulação da síntese de óxido nítrico. Este composto é sintetizado por meio da enzima sintase do óxido nítrico, que tem três isoformas. Os polimorfismos no gene NOS3 tem sido implicados como fatores que alteram a homeostase desse mecanismo. Os polimorfismos *Glu298Asp* 4 b/a e -786T>C do gene NOS3 têm sido associados a uma deterioração mais rápida da função renal nos pacientes com IRA. Estes polimorfismos têm sido avaliados em pacientes com IRA de causas determinadas ou não-determinadas e relacionados a uma perda mais rápida da função renal.

**Palavras-chave:** Insuficiência Renal, Crônica; Sintase do Óxido Nítrico; Polimorfismo, Genética.

### ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) is a multifactorial pathophysiologic irreversible process that often leads to a terminal state in which the patient requires renal replacement therapy. Most cases of CKD are due to chronic-degenerative diseases and endothelial dysfunction is one of the factors that contribute to its pathophysiology. One of the most important mechanisms for proper functioning of the endothelium is the regulation of the synthesis of nitric oxide. This compound is synthesized by the enzyme nitric oxide synthase, which has 3 isoforms. Polymorphisms in the NOS3 gene have been implicated as factors that alter the homeostasis of this mechanism. The *Glu298Asp* polymorphisms 4 b/a and -786T>C of the NOS3 gene have been associated with a more rapid deterioration of kidney function in patients with CKD. These polymorphisms have been evaluated in patients with CKD of determined and undetermined etiology and related to a more rapid deterioration of kidney function.

**Keywords:** Renal Insufficiency, Chronic; Nitric Oxide Synthase; Polymorphism, Genetic.

### INTRODUÇÃO

Em 2002, as diretrizes da Iniciativa de Qualidade em Resultados de Insuficiência Renal Crônica da Fundação Nacional do Rim (*National Kidney Foundation K/DOQI guidelines*) definiram insuficiência crônica renal (IRA) como sendo lesão renal com duração de três meses ou mais. Esse dano pode se manifestar com alterações estruturais do rim com ou sem redução da filtração glomerular. As modificações estruturais

podem ser evidenciadas histologicamente, radiologicamente ou por marcadores bioquímicos de dano renal em exames séricos ou de urina. Uma redução da função renal se apresenta como uma taxa de filtração glomerular inferior a 60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> com ou sem lesão renal (K/DOQI).<sup>1</sup>

A prevalência da insuficiência renal crônica vem aumentando mundialmente. Nos Estados Unidos da América, a prevalência aumentou em 10% entre

1988 e 1994 e em 13,1% entre 1999 e 2004. Em Taiwan, houve um aumento de 2% em 1996 e 9,3% em 2003. Um estudo no Japão mostrou um aumento da prevalência no sexo masculino (13,8% em 1974 e 22,1% em 2002) sem qualquer aumento significativo no sexo feminino.<sup>2</sup>

No México, como na maioria dos países, tem-se observado um aumento acentuado na prevalência e incidência de IRA. De acordo com os dados estatísticos mais recentes do Instituto Mexicano de Seguridade Social (*Instituto Mexicano del Seguro Social* ou *IMSS*), estima-se uma incidência de 377 casos por milhão de habitantes, com uma prevalência de 1.142 habitantes. Atualmente, há em torno de 52.000 pacientes sendo submetidos a tratamento de substituição renal, dos quais em torno de 80% são dependentes do IMSS. Houve um aumento de 92 pacientes por milhão de habitantes em 1999 e 400 pacientes por milhão de habitantes em 2008.<sup>3</sup>

O óxido nítrico é um dos fatores que regulam o tônus vascular e contribuem com a disfunção endotelial. Este composto é sintetizado no endotélio vascular pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS).<sup>4</sup>

### ÓXIDO NÍTRICO SINTASE

A enzima NOS tem 3 isoformas:

- nNOS ou NOS tipo I (óxido nítrico sintase neuronal)
- iNOS ou NOS tipo II (óxido nítrico sintase induzível)
- eNOS ou NOS tipo III (óxido nítrico sintase endotelial).<sup>5</sup>

O gene da nNOS está localizada em 12q24 e o gene da iNOS está localizada em 17q11.2. O gene NOS3 será descrito em detalhe na próxima seção. Cada uma destas enzimas exibe certas características que estão sumarizadas na Tabela 1.<sup>6</sup>

A isoforma mais importante para esta revisão é a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS).

### GENE NOS3

Estudos de associação genômica ampla (GWAS) abrem a possibilidade de encontrar possíveis genes de susceptibilidade a doença renal e à progressão da IRA (Staples et al, 2010 *Risk Factors for progression of chronic kidney disease* - Fatores de Risco na evolução da insuficiência renal crônica). Um desses genes é o NOS3 que contém 23.605 bases e está localizado em

**TABELA 1** CARACTERÍSTICAS DAS DIFERENTES ISOFORMAS DA ENZIMA NOS.<sup>6</sup>

Isoforma	Características
nNOS	150-160 KDa Ligada ao citosol e à membrana Expressão constitutiva Dependente do cálcio Baixa produção de NO (óxido nítrico)
	125-135 KDa Predominância no citosol Expressão indutível Não-dependente do cálcio Elevada produção de NO
iNOS	135 KDa Principalmente acoplada à membrana Expression constitutiva Dependente do cálcio Baixa produção de NO e miristoilação palmitoilação pós-translacional

7q36.1. Tem 26 exons e codifica eNOS, uma enzima composta por 1.203 amino ácido com um peso molecular de 133.289 Da.<sup>7,8</sup>

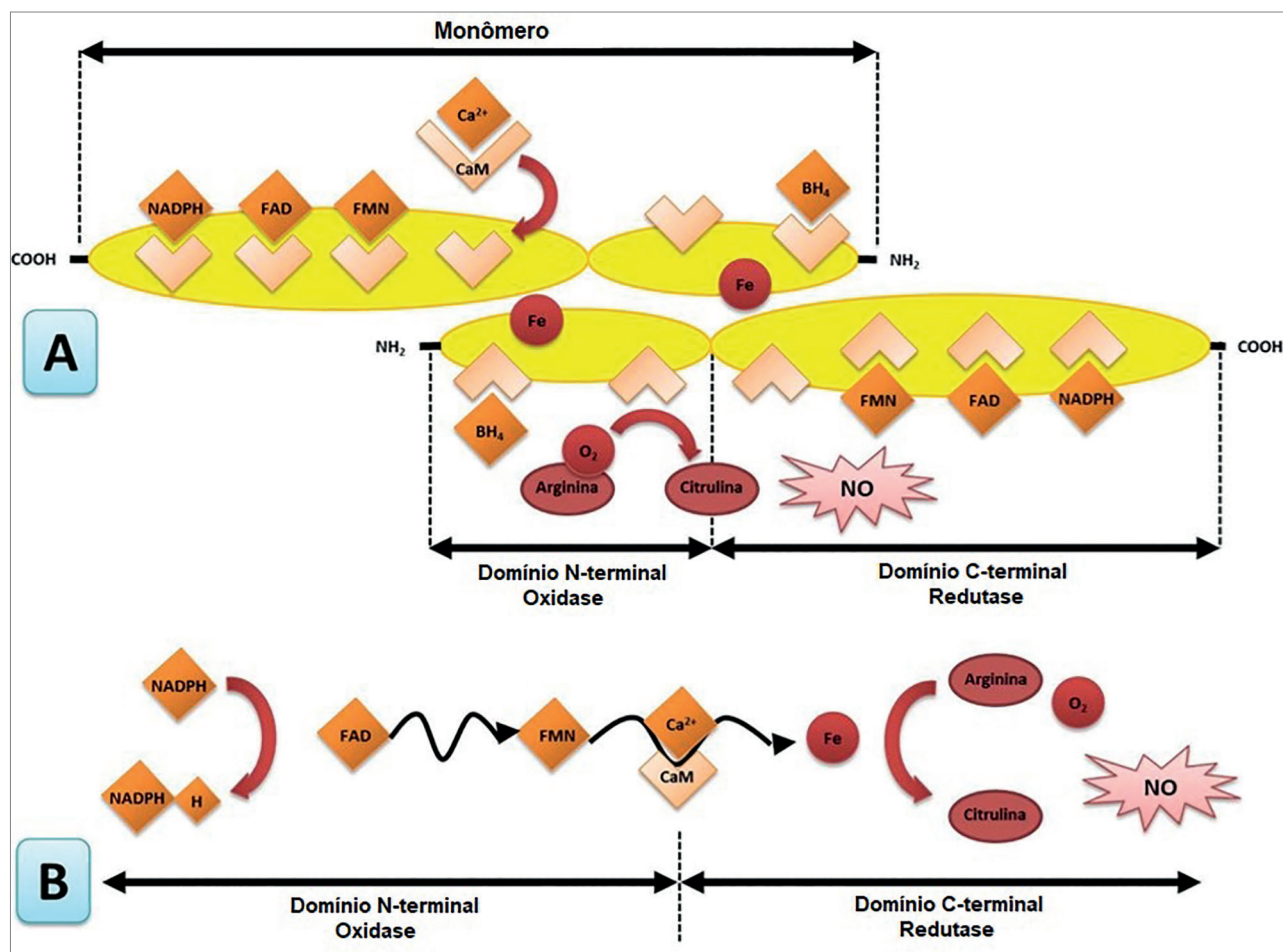
Esta enzima atua como um homodímero e encontra-se presente na membrana celular, no citoplasma e no aparelho de Golgi. A enzima usa 5 cofatores:

- Um heme
- FAD (dinucleotídeo da flavina-adenina)
- FMN (mononucleotídeo da flavina)
- BH4 (cofator da tetrahidrobiopterina)
- NADPH (fosfato de dinucleotídeo da nicotinamida e adenina).<sup>9</sup>

A enzima catalisa a conversão da L-arginina a óxido nítrico (Figura 1). Esta síntese é feita por meio de 2 reações. Em primeiro lugar, a enzima atua como uma hidroxilase da arginina. Na segunda reação, atua como uma mono-oxigenase da hidroxarginina. Nesta reação, há uma transferência líquida de cinco elétrons, quatro dos quais são necessários para reduzir O<sub>2</sub> do NADPH e da arginina. Na primeira reação, o NADPH atribui dois elétrons que oxidam o nitrogênio do grupo guanidina da arginina. No segundo passo, o NADPH fornece um elétron e a N-hidroxarginina sofre uma oxidação de três elétrons para formar citrulina e óxido nítrico.<sup>10,11</sup>

Na extremidade amina, a enzima tem um domínio de oxigenase que contém o sítio catalítico e os sítios de ligação do BH4, heme e L-arginina (Figura 1). Na extremidade carboxila, a enzima tem um domínio de reductase que contém sítios de ligação para o NADPH, FMN e FAD; os dois domínios estão ligados na porção central por um domínio que contém a calmodulina.<sup>12,13</sup>

Figura 1. A) Estrutura da enzima endotelial sintase do óxido nítrico. B) Mecanismo de transferência de elétrons. Modificado de Dias RG, et al.<sup>10</sup>



A atividade enzimática é regulada por cálcio livre e pela união subsequente do complexo cálcio-calmodulina. Fatores hormonais, tais como a gravidez e níveis aumentados de estrógenos, ampliam a expressão da enzima.<sup>6</sup>

O produto da reação enzimática é o óxido nítrico (NO), um gás que se dissemina facilmente das células endoteliais para as células da musculatura lisa da parede vascular. O NO tem uma meia-vida muito curta, de 0,5 a 5 segundos, sendo rapidamente metabolizado a nitritos, os quais podem ser medidos indiretamente.<sup>14</sup>

#### ÓXIDO NÍTRICO E INSUFICIÊNCIA RENAL

O óxido nítrico renal tem várias funções hemodinâmicas nos glomérulos renais. Entretanto, sem efeito mais importante é promover diurese e a natriurese, bem como regular a secreção de renina. O eNOS é expressado em grande quantidade no endotélio vascular renal (inclusive nas arteríolas aferentes e eferentes). Também é expressado nos túbulos proximais, na parte espessa da porção

ascendente da alça de Henle e nos túbulos coletores. Não se conhece o papel preciso do óxido nítrico nos túbulos proximais; entretanto, um estudo em camundongos onde a expressão desta enzima foi abolida, observou-se um aumento da reabsorção de NaCl, resultando num aumento da taxa de filtração glomerular (TFG), o que favoreceu o surgimento de hipertensão.<sup>15</sup>

Na insuficiência renal, a produção do óxido nítrico está reduzida, seja por uma diminuição no substrato enzimático (L-arginina), seja por um aumento na biodisponibilidade do inibidor enzimático dimetilarginina assimétrica (ADMA), o que por sua vez reduz a síntese de óxido nítrico por um mecanismo de retroalimentação. Observou-se que este mecanismo está acelerado na evolução de uma doença renal pré-existente.<sup>16</sup>

#### POLIMORFISMOS NO GENE *NOS3*

Um polimorfismo é definido como sendo uma variante genética presente em pelo menos 1% da população. Três principais polimorfismos do gene *NOS3* têm

sido estudados em doenças sabidamente associadas com a nefropatia diabética, em estudos diversos:<sup>16,17</sup> 894G > T ou Glu298Asp (rs1799983), variantes 27-bp de repetições no intron 4 (VNTR) 4b/a, e -786 T > C.

#### POLIMORFISMOS 894G > T OU GLU298ASP (RS1799983)

O polimorfismo 894G > T, localizado no exon 7, consiste de uma conversão do ácido glutâmico a ácido aspártico (Glu298Asp).<sup>18</sup> A mudança do glutamato (E) pelo ácido aspártico (D) afeta o domínio da enzima oxidase, que é o sítio de ligação do BH4 e do amino ácido L-arginina. Esta mudança causa uma variação na enzima, tornando-a mais susceptível à clivagem proteolítica na posição D238-P239. Isso gera uma forma mais curta da enzima com consequente redução da produção de NO.<sup>9</sup>

Este polimorfismo tem sido associado principalmente a várias patologias cardiovasculares, tais como a doença arterial coronariana, a aterosclerose, o espasmo coronariano induzido pela acetilcolina e a hipertensão arterial. Outras condições associadas a este polimorfismo são a doença de Alzheimer, a hipertensão induzida pela gravidez, o câncer vesical e da próstata e a nefropatia diabética, dentre muitas outras.<sup>17</sup>

Estudos em populações africanas, caucasianas e afro-americanas têm mostrado que a frequência do alelo polimórfico (T) nestas populações em geral é de 14.3%, 40.4% e 66.1%, respectivamente.<sup>19</sup> Em um estudo de 126 pacientes de uma população mestiça mexicana, Rosas-Vargas et al.<sup>20</sup> relataram uma frequência de 23% deste polimorfismo.

Diversos estudos têm descrito uma associação entre este polimorfismo e a insuficiência renal crônica.<sup>21</sup> Num estudo de 37 pacientes mexicanos diagnosticados com uma variante renal da doença de Fabry, os autores encontraram uma associação entre os alelos Asp298 e 4a do gene NOS3. Observou-se que os pacientes com esses alelos apresentavam níveis mais elevados de ureia e creatinina, bem com uma redução na taxa de filtração glomerular. Esta associação se comporta na forma de um modelo de herança codominante.<sup>22</sup>

Outros estudos têm mostrado uma associação entre a presença do alelo T (ácido aspártico) e a susceptibilidade ao desenvolvimento de IRA em várias populações, especialmente populações asiáticas.<sup>23</sup> Este achado também foi observado em um estudo indiano de pacientes com IRA secundária à nefropatia

diabética, onde um aumento nos níveis de creatinina foram encontrados em pacientes com o alelo asp298. Adicionalmente, notou-se uma associação estatisticamente significativa com marcadores de estresse oxidativo tais como SOD2 e GST.<sup>24</sup>

Entretanto, não houve associação entre estes marcadores genéticos e IRA em um estudo conduzido na Malásia.<sup>25</sup>

#### 4 B/A (VNTR NO INTRON 4)

Este polimorfismo consiste de 27 pares de bases caracterizados por um alelo "a" contendo 4 modificações repetidas (deleção/polimórfica) e um alelo "b" que consiste de 5 modificações (*push/wild*). Estudos recentes sugerem que este polimorfismo regule a expressão desse gene através da produção de pequenas moléculas de RNA interferente (iRNA) com 27 nucleotídeos, que reduzem a expressão do gene *eI* ou a síntese da proteína.<sup>26</sup>

Estudos realizados em populações africanas, caucasianas e afro-americanas mostram que a frequência desse polimorfismo nestas populações em geral é de 36%, 29,7% e 36,1%, respectivamente.<sup>27</sup>

Em um estudo brasileiro sobre IRA, encontrou-se um aumento significativo na frequência do alelo "a" nestes pacientes comparado aos controles, tendo sido observada uma robusta associação estatística entre este alelo e a doença.<sup>28</sup>

Entretanto, outro estudo conduzido na Suécia e na Finlândia numa população com insuficiência renal crônica secundária à nefropatia diabética mostrou uma baixa frequência do alelo 4<sup>a</sup>, sem associação estatística entre o polimorfismo e a doença.<sup>29</sup>

#### -786 T > C (RS2070744)

Este polimorfismo, situado na região flanqueadora 5', tem sido associado a uma diminuição na expressão do gene NOS3, reduzindo a taxa de transcrição do gene em 50%. Acredita-se que este polimorfismo pode se ligar à proteína replicadora A1; esta proteína está envolvida em vários processos celulares, dentre eles a transcrição.<sup>30,31</sup>

Estudos realizados em populações africanas, caucasianas e afro-americanas mostram que a frequência desse polimorfismo nestas populações em geral é de 3,2%, 14,5% e 1,8%, respectivamente.<sup>26</sup>

Um estudo realizado numa população indiana com IRA mostrou uma frequência elevada dos polimorfismos asp298, -T786C e alelos 4a, sendo que seus níveis de nitrito estavam diminuídos comparado ao grupo controle. Assim, considerou-se haver uma

associação entre estes polimorfismos e insuficiência renal crônica.<sup>32</sup>

Entretanto, um outro estudo realizado numa população caucasiana brasileira não mostrou associação entre estes polimorfismos e IRA.<sup>33</sup>

## CONCLUSÕES

A integridade funcional do endotélio permite um equilíbrio preciso entre os agentes vasoconstritores e vasodilatadores. Em condições normais, há uma predominância dos agentes vasodilatadores, anticoagulantes e antiproliferativos (principalmente NO) sobre os agentes vasoconstritores, procoagulantes e proliferativos. Os polimorfismos descritos no gene NOS3 têm sido associados à disfunção endotelial em diversas populações. Entretanto, alguns estudos não encontraram tais associações; portanto, os resultados continuam sendo controversos. Estudos adicionais são necessários em populações diferentes visando identificar potenciais fatores genéticos de risco para a IRA.

## REFERÊNCIAS

- National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002;39:S1-266.
- Stenvinkel P. Chronic kidney disease: a public health priority and harbinger of premature cardiovascular disease. *J Intern Med* 2010;268:456-67.
- Ávila-Saldivar MN. Enfermedad renal crónica: prevención y detección temprana en el primer nivel de atención. *Med Int Mex* 2013;29:148-53.
- Li Q, Youn JY, Cai H. Mechanisms and consequences of endothelial nitric oxide synthase dysfunction in hypertension. *J Hypertens* 2015;33:1128-36.
- Nagpal L, Panda K. Characterization of calmodulin-free murine inducible nitric-oxide synthase. *PLoS One* 2015;10:e0121782.
- Schulz R, Triggle CR. Role of NO in vascular smooth muscle and cardiac muscle function. *Trends Pharmacol Sci* 1994;15:255-9.
- Tsutsui M, Shimokawa H, Otsuji Y, Ueta Y, Sasaguri Y, Yanagihara N. Nitric oxide synthases and cardiovascular diseases: insights from genetically modified mice. *Circ J* 2009;73:986-93.
- Marangoni K, Araújo TG, Neves AF, Goulart LR. The -786T>C promoter polymorphism of the NOS3 gene is associated with prostate cancer progression. *BMC Cancer* 2008;8:273.
- Dias RG, Negrão CE, Krieger MH. Nitric oxide and the cardiovascular system: cell activation, vascular reactivity and genetic variant. *Arq Bras Cardiol* 2011;96:68-75.
- Hickok JR, Thomas DD. Nitric oxide and cancer therapy: the emperor has NO clothes. *Curr Pharm Des* 2010;16:381-91.
- Kuo PC, Schroeder RA. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Ann Surg* 1995;221:220-35.
- Wink DA, Vodovotz Y, Laval J, Laval F, Dewhirst MW, Mitchell JB. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis* 1998;19:711-21.
- Moncada S, Higgs EA. Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol* 2006;213-54.
- Stefano GB, Kream RM. Reciprocal regulation of cellular nitric oxide formation by nitric oxide synthase and nitrite reductases. *Med Sci Monit* 2011;17:RA221-6.
- Ortiz PA, Garvin JL. Cardiovascular and renal control in NOS-deficient mouse models. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;284:R628-38.
- Dellamea BS, Leitão CB, Friedman R, Canani LH. Nitric oxide system and diabetic nephropathy. *Diabetol Metab Syndr* 2014;6:17.
- Szabó GV. The role and importance of gene polymorphisms in the development of atherosclerosis. *Interv Med Appl Sci* 2013;5:46-51.
- Heltianu C, Costache G, Azibi K, Poenaru L, Simionescu M. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Fabry's disease. *Clin Genet* 2002;61:423-9.
- Thomas BN, Thakur TJ, Yi L, Guindo A, Diallo DA, Ott J. Extensive ethnogenomic diversity of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) polymorphisms. *Gene Regul Syst Bio* 2013;7:1-10.
- Rosas-Vargas H, Flores-Segura A, Guizada-Claire B, Vargas-Alarcón G, Granados J, Salamanca F, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in the Indian and Mestizo populations of Mexico. *Hum Biol* 2003;75:91-6.
- He Y, Fan Z, Zhang J, Zhang Q, Zheng M, Li Y, et al. Polymorphisms of eNOS gene are associated with diabetic nephropathy: a meta-analysis. *Mutagenesis* 2011;26:339-49.
- Marin-Medina A, Brambila-Tapia AJ, Picos-Cárdenas VJ, Gallegos-Arreola MP, Figueroa LE. eNOS gene Glu298Asp and 4b/a polymorphisms are associated with renal function parameters in Mexican patients with Fabry disease. *Genet Mol Res* 2016;15.
- Zhou TB, Yin SS. Association of endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp gene polymorphism with the risk of end-stage renal disease. *Ren Fail* 2013;35:573-8.
- Tiwari AK, Prasad P, B K T, Kumar KM, Ammini AC, Gupta A, et al. Oxidative stress pathway genes and chronic renal insufficiency in Asian Indians with Type 2 diabetes. *J Diabetes Complications* 2009;23:102-11.
- Vasudevan R, Ismail P, Jaafar N, Mohamad N, Etemad E, Wan Aliaa W, et al. Analysis of human bradykinin receptor gene and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in end-stage renal disease among Malaysians. *Balkan J Med Genet* 2014;17:37-40.
- 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;19:3997-4005.
- Thomas BN, Thakur TJ, Yi L, Guindo A, Diallo DA, Ott J. Extensive ethnogenomic diversity of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) polymorphisms. *Gene Regul Syst Bio* 2013;7:1-10.
- Bellini MH, Figueira MN, Piccoli MF, Marumo JT, Cendoroglo MS, Neto MC, et al. Association of endothelial nitric oxide synthase gene intron 4 polymorphism with end-stage renal disease. *Nephrology (Carlton)* 2007;12:289-93.
- Möllsten A, Wessman M, Svensson M, Forsblom C, Parkkonen M, Brismar K, et al. Glu298Asp and NOS4ab polymorphisms in diabetic nephropathy. *Ann Med* 2006;38:522-8.
- Casas JP, Cavalleri GL, Bautista LE, Smeeth L, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2006;164:921-35.
- 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;9:2629-37.
- Ahluwalia TS, Ahuja M, Rai TS, Kohli HS, Sud K, Bhansali A, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes and diabetic nephropathy among Asian Indians. *Mol Cell Biochem* 2008;314:9-17.
- Santos KG, Crispim D, Canani LH, Ferrugem PT, Gross JL, Roisenberg I. Association of eNOS gene polymorphisms with renal disease in Caucasians with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2011;91:353-62.