






O polimorfismo intron 4 a/b do gene *NOS3* está associado à DRET em pacientes com doença renal policística autossômica dominante

NOS3 gene intron 4 a/b polymorphism is associated with ESRD in autosomal dominant polycystic kidney disease patients

Autores

Udit Narayan Padhi¹ 
 Madhubala Mulkalwar² 
 Lakkakula Saikrishna³ 
 Henu Kumar Verma⁴ 
 LVKS. Bhaskar¹ 

¹Guru Ghasidas Vishwavidyalaya, Department of Zoology, Bilaspur, India.

²Shri Shankaracharya Institute of Medical Sciences, Junwani, Bhilai, India.

³Nellore Municipal Corporation, Department of Public Health, Nellore, India.

⁴Comprehensive Pneumology Center, Institute of Lungs Biology and Disease, Department of Immunopathology, Helmholtz Zentrum, 85764 Neuherberg, Munich, Germany.

Data de submissão: 04/04/2021.

Data de aprovação: 24/11/2021.

Data de publicação: 31/01/2022.

Correspondência para:

LVKS. Bhaskar.
 E-mail: lvksbhaskar@gmail.com

DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2021-0089>

RESUMO

Introdução: Genes da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) têm sido implicados na hemodinâmica renal como potentes reguladores do tônus vascular e pressão arterial. Tem sido vinculado a uma redução nos níveis plasmáticos de óxido nítrico. Realizou-se recentemente vários estudos para investigar o papel de polimorfismos do gene *NOS3* e doença renal em estágio terminal (DRET). Entretanto, os resultados ainda não são claros e os mecanismos não estão totalmente definidos. Como resultado, realizamos meta-análise para examinar a relação entre polimorfismo do gene *NOS3* e DRET em pacientes com doença renal policística autossômica dominante (DRPAD). **Métodos:** Para avaliar a relação entre polimorfismo do gene *NOS3* e DRET, recuperou-se estudos relevantes publicados entre Setembro-2002 e Dezembro-2020 dos bancos de dados PubMed (Medline), EMBASE, Google Scholar, Web of Science. Calculamos odds ratio (OR) e intervalo de confiança (IC) de 95% utilizando modelo de efeitos fixos. Para avaliar a heterogeneidade dos estudos, utilizamos teste Q de Cochran e estatísticas I^2 de Higgins e Thompson. **Resultados:** Nossa meta-análise de 13 estudos mostrou que a presença dos dois polimorfismos do gene *NOS3* aumentou significativamente o risco de DRET em pacientes com DRPAD com polimorfismo do gene 4a/b (aa+ab vs. bb: OR=1,95; IC 95%=1,24-3,09; p=0,004). Ademais, não encontramos associação significativa entre polimorfismo 894G>T *NOS3* (Glu298Asp) e risco de DRET em pacientes com DRPAD (GT+TT vs. GG: OR=1,21; IC 95%=0,93-1,58; p=0,157). Não houve evidência de viés de publicação. **Conclusões:** Achados da meta-análise atual sugerem que o polimorfismo intron 4a/b do *NOS3* desempenha papel vital no aumento do risco de DRET em pacientes com DRPAD.

Descritores: Rim Policístico Autossômico Dominante; Polimorfismo Genético; Falência Renal Crônica.

ABSTRACT

Introduction: Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) genes have been implicated in renal hemodynamics as potent regulators of vascular tone and blood pressure. It has been linked to a reduction in plasma nitric oxide levels. Several studies have recently been conducted to investigate the role of *NOS3* gene polymorphisms and end-stage renal disease (ESRD). However, the results are still unclear and the mechanisms are not fully defined. As a result, we conducted a meta-analysis to examine the relationship between *NOS3* gene polymorphism and ESRD in autosomal polycystic kidney disease (ADPKD) patients. **Methods:** To assess the relationship between *NOS3* gene polymorphism and ESRD, relevant studies published between September 2002 and December 2020 were retrieved from the PubMed (Medline), EMBASE, Google Scholar, and Web of Science databases. The pooled odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) were calculated using a fixed-effect model. To assess the heterogeneity of studies, we used Cochran's Q test and the Higgins and Thompson I^2 statistics. **Results:** Our meta-analysis of 13 studies showed that the presence of the two *NOS3* gene polymorphisms significantly increased ESRD risk in ADPKD patients with 4a/b gene polymorphism (aa+ab vs. bb: OR=1.95, 95% CI=1.24-3.09, p=0.004). In addition, no significant association was found between the *NOS3* 894G>T (Glu298Asp) polymorphism and the risk of ESRD in ADPKD patients (GT+TT vs. GG: OR=1.21, 95% CI=0.93-1.58, p=0.157). There was no evidence of publication bias. **Conclusions:** The findings of the current meta-analysis suggest that *NOS3* intron 4a/b polymorphism plays a vital role in the increasing risk of ESRD in ADPKD patients.

Keywords: Polycystic Kidney, Autosomal Dominant; Polymorphism, Genetic; Kidney Failure, Chronic.



INTRODUÇÃO

Os cistos renais podem apresentar várias etiologias, amplamente classificadas em desordens genéticas e não genéticas. A causa genética mais comum e amplamente aceita de doença renal cística em humanos é a doença renal policística autossômica dominante (DRPAD), a doença renal policística autossômica recessiva (DRPAR) e a nefronoftise juvenil, para as quais foram identificados genes ou localizações cromossômicas¹. Entre todas as doenças renais císticas, a DRPAD é geneticamente heterogênea e afeta todos os grupos raciais ao redor do mundo, associada a anormalidades hepáticas, cardiovasculares, gastrointestinais e genitais, com uma frequência estimada entre 1:400 e 1:1.000². A DRPAD pode ser causada por mutações em um dos dois genes, a saber, a doença renal policística 1 (*DRP1*), mapeada para 16p13.3, e o gene da doença renal policística 2 (*DRP2*) no cromossomo 4q21³. A frequência de mutações do gene da *DRP1* é muito maior, e o gene é responsável por 85% dos casos de DRPAD, enquanto 15% é causado pelo gene da *DRP2*. Além disso, pacientes idosos apresentam mais casos de mutações da *DRP2* do que de mutações da *DRP1*. A doença renal envolve hipertensão, infecções do trato urinário (ITU), hematuria, dor renal e insuficiência renal, e a doença renal em estágio terminal (DRET) ocorre em aproximadamente 50% dos pacientes com DRPAD com mais de quarenta anos de idade⁴.

A DRET é uma doença multifatorial e tem se mostrado mais significativa em muitos aspectos deste fator genético. Evidências anteriores comprovaram que a deficiência da óxido nítrico sintase 3 (*NOS3*) contribui para a disfunção endotelial vascular, e sugere-se que as células endoteliais sanguíneas desempenhem um papel vital na patogênese da DRET⁵. A *NOS3* é uma molécula dimérica de sinalização celular com atividades regulatórias significativas, como a vasodilatação glomerular, essencial para o controle da taxa de filtração glomerular (TFG). Nesta perspectiva, a *NOS3* na DRPAD foi considerada um possível gene candidato para a DRET⁶. O gene da *NOS3* foi mapeado para um cromossomo de 7q36 composto por 26 exons. Diversas variantes polimórficas têm sido associadas à síntese do NO modificada, incluindo o promotor -786 T > C, 894 G > T, e os polimorfismos de número variável de repetições *in tandem* no intron 4 a/b (VNTR). Entre estes, o intron-4 (VNTR) de 27 pares de bases (pb) do *NOS3* é conhecido por alterar

a expressão da eNOS e prejudicar a síntese de NO⁷. Os genótipos e haplótipos dos tagSNPs da *NOS3* não foram associados à doença⁶.

Embora muitos pesquisadores tenham examinado a associação entre os polimorfismos do gene *NOS3* e a DRET na DRPAD, os achados foram inconsistentes⁷⁻¹². Em vista da heterogeneidade clínica da DRPAD, este estudo teve como objetivo resumir quantitativamente a associação entre os polimorfismos do *NOS3* (polimorfismo 894G>T e VNTR intron 4 a/b) e o risco de DRET na DRPAD, realizando uma meta-análise abrangente de todos os estudos de caso-controle elegíveis.

MATERIAIS E MÉTODOS

IDENTIFICAÇÃO DE ESTUDOS DE ELEGIBILIDADE

Foram identificados artigos publicados sobre as associações do polimorfismo do gene *NOS3* e a DRET entre Setembro de 2002 e Dezembro de 2020. Todos os estudos de caso-controle considerando a associação em pacientes com DRPAD publicados na língua inglesa foram selecionados e organizados de acordo com as diretrizes PRISMA¹³.

Foi realizada uma pesquisa abrangente em bancos de dados eletrônicos, incluindo PubMed (Medline), EMBASE, Google Scholar e Web of Science com a combinação das seguintes palavras-chave e subtítulos: “óxido nítrico sintase endotelial”, “eNOS”, “*NOS3*”, “DRET”, “VNTR intron 4”, “meta-análise”, “caso-controle”, “894G>T (Glu298Asp; rs1799983)”. A última pesquisa foi realizada em 30 de Fevereiro de 2021.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Para realizar uma meta-análise mais robusta, dois autores coletaram dados de todos os artigos relevantes de forma independente. Nossos critérios de seleção foram: (1) estudos de caso-controle sobre a associação entre os polimorfismos do *NOS3* e o risco de DRET na DRPAD, (2) artigos com o texto integral disponíveis, (3) escritos na língua inglesa, e (4) dados originais e contagem completa de alelos do genótipo para ambos os grupos de caso e controle disponíveis. Estudos foram excluídos se (1) tivessem dados sobrepostos/duplicados, (2) não tivessem grupo controle, (3) não apresentassem dados genotípicos claros, e (4) fossem relatos de casos e artigos de revisão. Todas as informações sobre a seleção de

estudos em pacientes com DRPAD com ou sem DRET foram providenciadas.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram registrados os dados genotípicos dos grupos de caso e controle. O grupo de comparação já incluía uma seleção, mas os genótipos do NOS3 não foram testados para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). A meta-análise foi realizada utilizando a ferramenta web MetaGenyo. Para cada estudo, a força de associação entre o risco de DRET na DRPAD e os polimorfismos do gene NOS3 (894G>T e VNTR intron 4) foi reportada com valores de odds ratio (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC) no modelo dominante. Para avaliar a heterogeneidade entre estudos, utilizamos as estatísticas Q e I² em todos os estudos. Para avaliar a robustez dos achados, a análise de sensibilidade foi realizada utilizando uma meta-análise “leave-one-out”. O teste de Egger e o gráfico de funil de Begg foram usados para avaliar o viés de publicação. Todas as análises estatísticas foram feitas com o software *Comprehensive Meta-analysis*.

Considerou-se como estatisticamente significativo um valor de P<0,05.

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS

Com base na estratégia de busca acima mencionada, foram identificados 82 artigos. Destes, foram excluídos 22 artigos duplicados e irrelevantes. Após a leitura dos resumos e títulos, 31 artigos que não avaliaram a associação entre os polimorfismos 894G>T e intron 4a/b do NOS3 e o risco de DRET foram excluídos. Vinte e nove artigos foram completamente revisados, dos quais 9 trabalhos com 520 pacientes com DRPAD com DRET e 563 pacientes com DRPAD sem DRET para o polimorfismo 894G>T do NOS3^{8,10-12,14-18} e 5 artigos com 185 pacientes com DRPAD com DRET e 223 pacientes com DRPAD sem DRET para o polimorfismo intron 4a/b do NOS3^{7,9,11,19,20} que apresentavam dados suficientes, foram incluídos na presente meta-análise. O processo de seleção de artigos está representado na Figura 1. As características de todos os estudos incluídos estão listadas na Tabela 1.

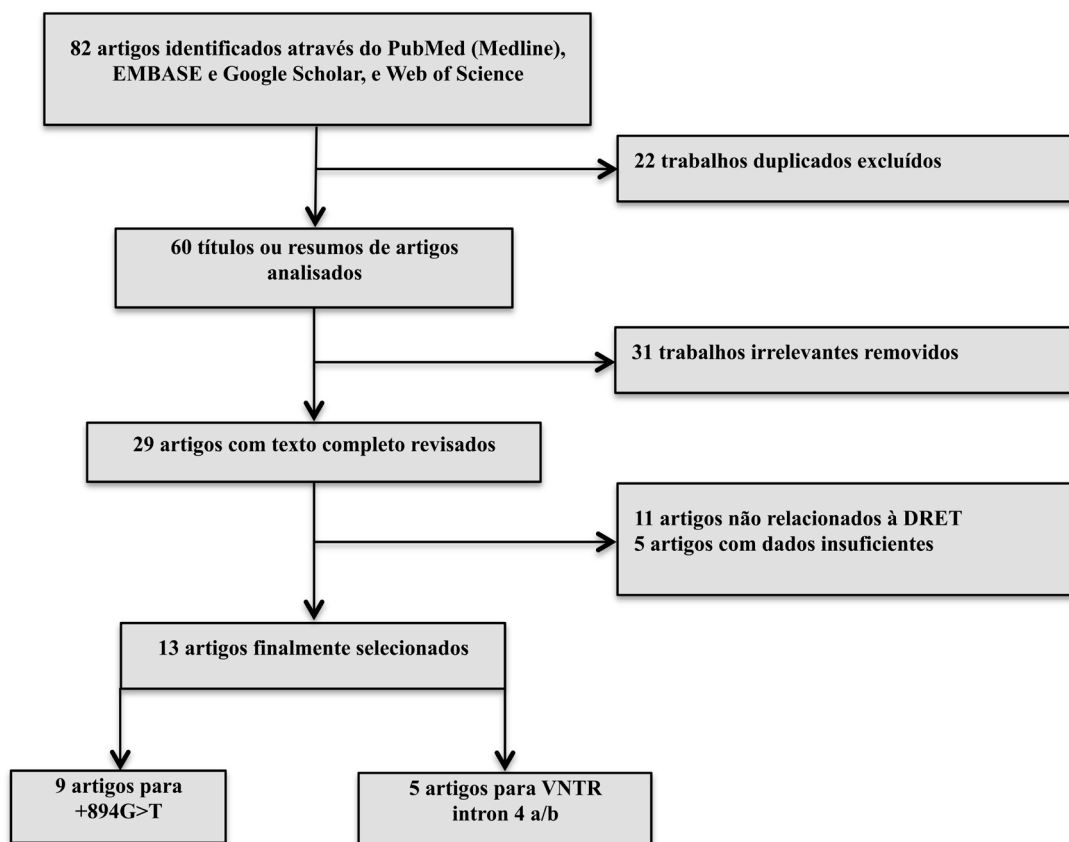


Figura 1. Diagrama de fluxo descrevendo o processo detalhado de pesquisa bibliográfica.

TABELA 1 CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS SOBRE OS POLIMORFISMOS 894G>T E VNTR INTRON 4 A/B INCLUÍDOS NA META-ANÁLISE

Polimorfismo 894G>T (Glu298Asp)			DRET			Sem DRET		
Autor	Etnia	Genotipagem	GG	GT	TT	GG	GT	TT
Lee et al. (2002) ¹⁴	Asiática	PCR-RFLP	20	8	0	65	19	0
Walker et al. (2003) ¹⁵	Caucasiana	PCR-RFLP	39	50	7	47	56	16
Reiterová et al. (2004) ¹⁶	Caucasiana	PCR-RFLP	37	29	7	61	22	8
Stefanakis et al. (2008) ⁸	Caucasiana	PCR-RFLP	39	32	9	9	6	5
Dasar et al. (2012) ¹⁰	Caucasiana	PCR-RFLP	28	14	0	33	8	1
Ramanathan et al. (2014) ⁶	Caucasiana	FRET	34	13	1	39	14	1
Pandita et al. (2017) ¹²	Asiática	ARMS-PCR	27	14	1	63	17	1
Kocyigit et al. (2018) ¹⁷	Caucasiana	PCR-RFLP	43	30	5	12	12	6
Malakoutian et al. (2020) ¹⁸	Caucasiana	PCR-RFLP	18	10	5	24	16	2

VNTR Intron 4 a/b			bb	aa+ab	bb	aa+ab
Reiterová et al. (2002) ²⁰	Caucasiana	PCR-RFLP	30	20	72	33
Merta et al. (2002) ¹⁹	Caucasiana	PCR- Eletroforese	21	9	22	8
Lamniou et al. (2004) ⁹	Caucasiana	PCR- Eletroforese	10	11	21	7
Ramanathan et al. (2014) ¹¹	Asiática	PCR- Eletroforese	31	17	45	9
Elumalai et al. (2014) ⁷	Asiática	PCR- Eletroforese	25	12	16	0

META-ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DO GENE NOS3 E RISCO DE DRET NA DRPAD

A associação entre as variantes de polimorfismo do NOS3 e o risco de DRET na DRPAD foi avaliada em um modelo dominante (Figura 2). No geral, as análises combinadas mostraram que o polimorfismo 4a/b da eNOS está significativamente associado ao aumento do risco de DRET no modelo de efeitos fixos (aa+ab vs. bb: OR=1,95; IC 95%=1,24-3,09; p=0,004) (Figura 2B). Entretanto, não houve associação significativa entre o polimorfismo 894G>T do NOS3 e o risco de DRET em pacientes com DRPAD (GT+TT vs. GG: OR=1,21; IC 95%=0,93-1,58; p=0,157; modelo de efeitos fixos) (Figura 2A).

TESTE DE HETEROGENEIDADE, SENSIBILIDADE E VIÉS DE PUBLICAÇÃO

O tamanho do efeito estimado para ambos os polimorfismos do gene NOS3 (894G>T: I² = 11,3 %; p_{heterogeneidade} =0,341; e polimorfismo intron 4a/b: I² = 15,6 %; p_{heterogeneidade} =0,315) demonstrou uma heterogeneidade significativa. As análises de sensibilidade foram realizadas através da exclusão de estudos, um de cada vez, e conduzidas após cada omissão. Não houve diferenças estatisticamente significativas nos dados de polimorfismo, indicando

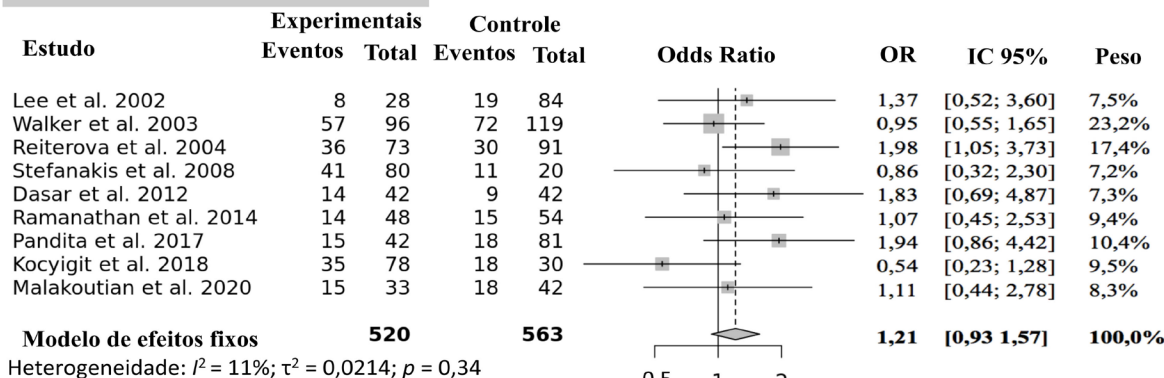
que a análise foi estatisticamente confiável e consistente (Figura 3A).

A análise do polimorfismo intron 4a/b em dois estudos^{19,20} demonstrou que os ORs agrupados aumentaram quando cada estudo foi omitido (Figura 3B). Foram utilizados o gráfico de funil de Begg e o teste de Egger para avaliar o viés de publicação da literatura. A forma do gráfico de funil foi assimétrica tanto para o polimorfismo 894G>T quanto para o intron 4a/b. Como apoio a isto, o teste de Egger não revelou nenhuma evidência de viés de publicação significativo (Figuras 4A e 4B). Além disso, o teste de regressão linear de Egger também não revelou nenhum viés de publicação para estudos sobre os polimorfismos 894G>T (P = 0,915) e intron 4 a/b (P = 0,159).

DISCUSSÃO

Incluímos nesta meta-análise 13 estudos publicados que revelaram que os polimorfismos 4a/b do NOS3 foram significativamente associados a diversas complicações vasculares, as quais são uma causa de DRET em pacientes com DRPAD. Nosso estudo também demonstrou que não há heterogeneidade ou viés de publicação nos estudos incluídos. No entanto, os resultados da análise de sensibilidade em cada grupo de estudo indicaram que as estimativas

2A. +894 GT+TT vs. GG do NOS3



2B: NOS3 intron 4 VNTR aa+ab vs. bb

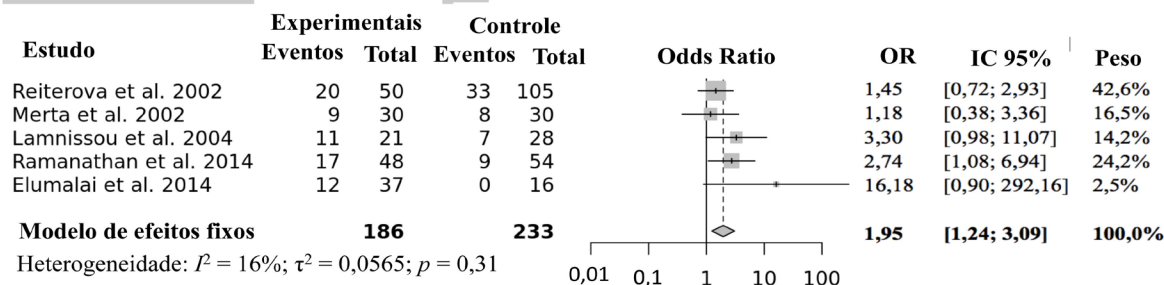
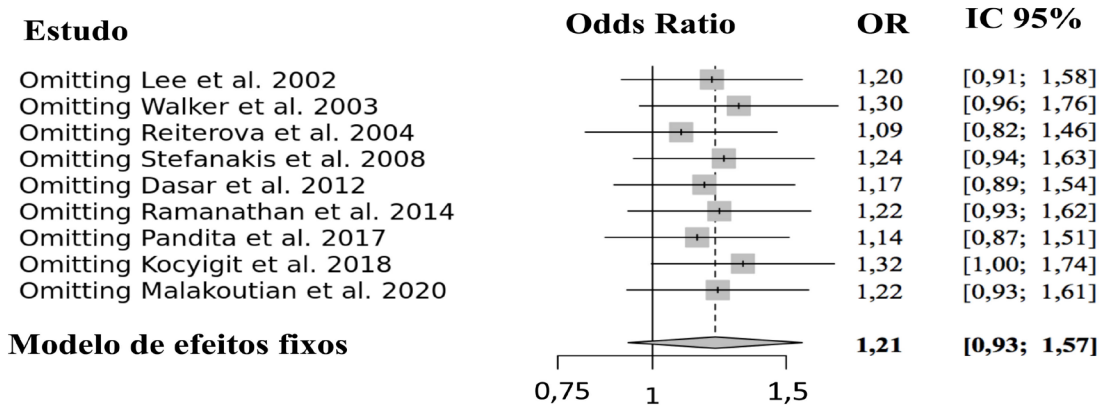


Figura 2. Forest plot da meta-análise para a associação entre polimorfismos do gene NOS3 e o risco de DRET em pacientes com DRPAD.

3A. +894 GT+TT vs. GG do NOS3



3B. VNTR intron 4 aa+ab vs. bb do NOS3

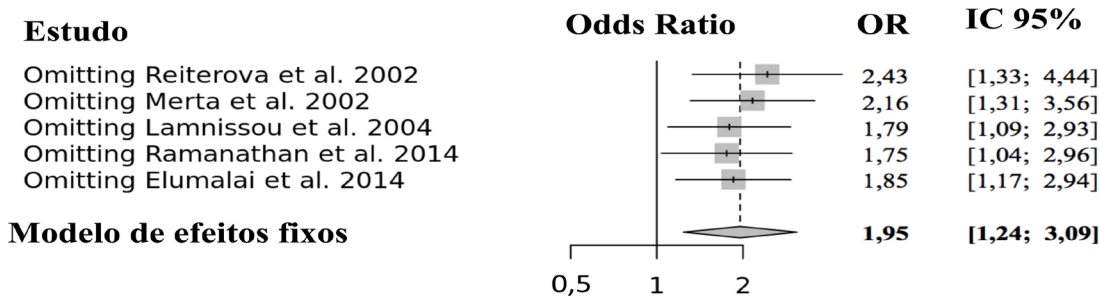


Figura 3. Análise de sensibilidade da associação entre os polimorfismos do gene NOS3 e o risco de DRET em pacientes com DRPAD.

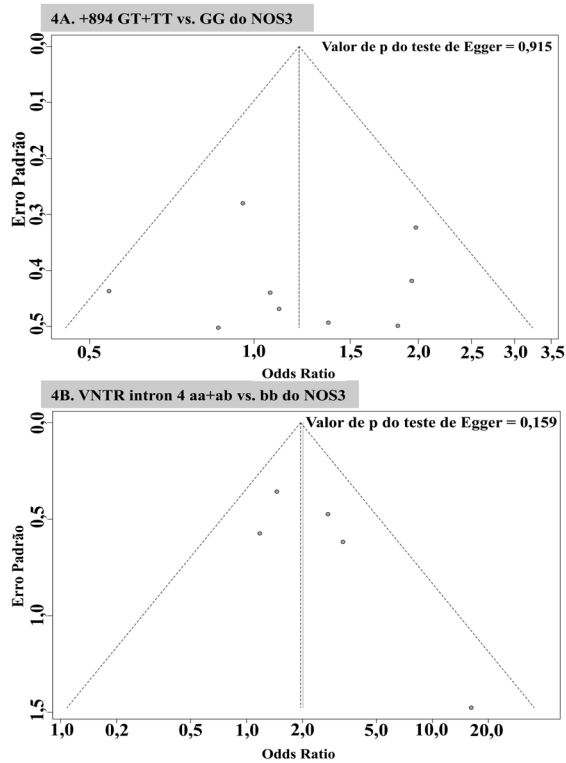


Figura 4. Gráfico de funil de Egger do viés de publicação para os polimorfismos do gene *NOS3* e o risco de DRET em pacientes com DRPAD.

agrupadas do OR não mudaram quantitativamente após cada omissão. Embora o estudo sugira que o óxido nítrico possa desempenhar um papel na fisiopatologia da DRPAD, o polimorfismo 894G>T do *NOS3* falhou em demonstrar uma associação com a suscetibilidade à DRET em pacientes com DRPAD. Os achados são consistentes com uma meta-análise anterior que constatou que o polimorfismo intron 4a/b do *NOS3* aumentou o risco de DRET em pacientes com DRPAD²¹.

As NO sintases (NOS) são uma família de enzimas que catalisam a produção de óxido nítrico (NO) a partir da L-arginina em células endoteliais vasculares²². É bem sabido que o NO é altamente reativo devido a sua curta meia-vida e um potente regulador do tônus vascular e hemorreologia por meio da ativação da via dependente da guanosina monofosfato cíclica (cGMP)²³. Além disso, tem envolvimento direto no endotélio vascular, em interações celulares complexas e na ativação global de células mediadas por inflamação²⁴. Geralmente, o NO inibe a absorção de NaCl ao longo do néfron. Diversos estudos têm demonstrado que os inibidores

de NOS como nitro-L-arginina e NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) têm uma influência tônica, especialmente na circulação medular²⁵. Apesar disso, a síntese renal de NO está envolvida na regulação aguda e crônica do equilíbrio sódico.

A hipertensão é a complicação mais frequente em pacientes com DRPAD, ocorrendo em aproximadamente 60% deles. Miyamoto et al. (1998)²⁶ descobriram que a variante missense 894G>T (Glu298Asp) estava significativamente associada à hipertensão essencial, sugerindo uma suscetibilidade genética para a hipertensão essencial. Outro estudo constatou que a expressão da eNOS e a TFG ϵ foram significativamente maiores em pacientes com DRPAD sem hipertensão do que naqueles com hipertensão. Isto demonstra que a expressão do gene eNOS é independentemente preditiva de hipertensão na população com DRPAD²⁷.

Na doença renal, a produção de NO é reduzida por uma diminuição no substrato enzimático (L-arginina) ou por um aumento na biodisponibilidade do inibidor enzimático dimetilarginina assimétrica (ADMA), o qual, por sua vez, reduz a síntese de NO por meio de um mecanismo de feedback²⁸. Este mecanismo tem se mostrado capaz de acelerar a progressão de doença renal pré-existente. Vários estudos demonstraram que o NO regula negativamente o sistema renina-angiotensina inibindo a atividade da ECA e os receptores AT1²⁹. A liberação de NO por células endoteliais desempenha um papel importante na regulação da hemodinâmica local e da pressão arterial sistêmica³⁰. A diminuição da produção de NO desempenha um papel importante na progressão da doença renal²⁸. Foi observada uma diminuição significativa em diferentes isoformas de NOS no epitélio cístico durante o crescimento de um cisto renal em ratos policísticos *Han: Sprague-Dawley* (SPRD)³¹. Diversas linhas de evidência sugerem que a DRPAD é caracterizada por disfunção endotelial causada por liberação deficiente de NO^{32,33}.

Modelos animais e ensaios clínicos demonstraram a importância da NOS na doença renal policística³⁴. Pacientes com DRPAD com o alelo 4a progrediram para DRET mais lentamente na Bélgica e na França, enquanto os pacientes de Hellen da Grécia e Chipre progrediram mais rapidamente^{35,36}. No entanto, alguns estudos sugeriram que este locus não estava associado à DRET de diferentes etiologias^{36,37}. A substituição de

ácido aspártico por glutamato afeta o domínio da enzima oxidase que serve como sítio de ligação para o BH4 e o aminoácido L-arginina. A alteração causa uma variação enzimática, tornando-a mais suscetível à clivagem proteolítica na posição D238-P239. Além disso, produz uma forma mais curta da enzima, resultando em menor produção de NO³⁸. No entanto, a relação entre o polimorfismo 894G>T e a idade de início da DRET em pacientes com DRPAD também produziu resultados inconsistentes^{15,16,37}. Embora o polimorfismo -786T>C (rs2070744) tenha um efeito funcional, ele está ligado à proteína de replicação A1 (RPA1), que se liga ao promotor NOS3 com alta afinidade quando o alelo C está presente, resultando na transcrição reduzida de NOS3³⁹.

Não foram observados achados significativos em relação ao polimorfismo do promotor -786 T>C com progressão da DRET em pacientes com DRPAD tipo 1^{35,40}. Nossos achados foram inconclusivos em termos de associações específicas de etnia entre polimorfismos do gene NOS3 e DRET em pacientes com DRPAD. Isto se deve possivelmente às diferenças nas frequências dos alelos do gene NOS3 entre as populações. Também foram realizados estudos individuais investigando a ligação entre os polimorfismos do NOS3 e as complicações da DRET. Ainda assim, estes estudos podem ter sido desequilibrados devido à incapacidade de componentes individuais de identificar o impacto desejado destes polimorfismos.

Certas limitações e vieses do estudo devem ser considerados e os resultados devem ser interpretados com cautela. Nossa meta-análise indicou que o polimorfismo intron 4a/b do NOS3, mas não o polimorfismo G894T, parece aumentar o risco de DRET em pacientes com DRPAD. São necessários mais estudos de alta qualidade para investigar as complexidades das associações entre os polimorfismos do gene NOS3 e as implicações terapêuticas da DRET em pacientes com DRPAD.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

UNP, MM, LS, HKV e LVKSB contribuíram substancialmente para a concepção ou desenho do estudo; coleta, análise ou interpretação de dados; redação ou revisão crítica do manuscrito; e aprovação final da versão a ser publicada.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declararam não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

- Bergmann C. Genetics of autosomal recessive polycystic kidney disease and its differential diagnoses. *Front Pediatr*. 2018 Feb;5:221.
- Bergmann C, Guay-Woodford LM, Harris PC, Horie S, Peters DJM, Torres VE. Polycystic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 Dec;4(1):50.
- Bitarafan F, Garshasbi M. Molecular genetic analysis of polycystic kidney disease 1 and polycystic kidney disease 2 mutations in pedigrees with autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Res Med Sci*. 2019 May;24:44.
- Lanktree MB, Haghghi A, Di Bari I, Song X, Pei Y. Insights into autosomal dominant polycystic kidney disease from genetic studies. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2021 May;16(5):790-9.
- Kuricová K, Tanhäuserová V, Pácal L, Bartáková V, Brožová L, Jarkovský J, et al. NOS3 894G>T polymorphism is associated with progression of kidney disease and cardiovascular morbidity in type 2 diabetic patients: NOS3 as a modifier gene for diabetic nephropathy? *Kidney Blood Press Res*. 2013;38(1):92-8.
- Ramanathan G, Elumalai R, Periyasamy S, Lakkakula B. Role of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms and hypertension-induced end-stage renal disease in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Iran J Kidney Dis*. 2014 Jul;8(4):265-77.
- Elumalai R, Periyasamy S, Ramanathan G, Lakkakula BVKS. Role of endothelial nitric oxide synthase VNTR (intron 4 a/b) polymorphism on the progression of renal disease in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Renal Inj Prev*. 2014;3(3):69-73.
- Stefanakis N, Ziroyiannis P, Trygonis S, Lamnissou K. Modifier effect of the Glu298Asp polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Nephron Clin Pract*. 2008;110(2):c101-6.
- Lamnissou K, Ziroyiannis P, Trygonis S, Demetriou K, Pierides A, Koptides M, et al. Evidence for association of endothelial cell nitric oxide synthase gene polymorphism with earlier progression to end-stage renal disease in a cohort of Hellens from Greece and Cyprus. *Genet Test*. 2004;8(3):319-24.
- Dasar N, Ghaderian SMH, Azargashb E. Human evaluation of the Glu298Asp polymorphism in NOS3 gene and its relationship with onset age of ESRD in Iranian patients suffering from ADPKD. *Int J Mol Cell Med*. 2012;1(2):105-12.
- Ramanathan G, Periyasamy S, Lakkakula BV. NOS3 tagSNPs does not modify the chronic kidney disease progression in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nephrology (Carlton)*. 2014 Sep;19(9):537-41.
- Pandita S, Ramachandran V, Verma J, Kohli S, Saxena R, Verma IC. NOS3 gene Glu298Asp polymorphism and severity of disease in patients of ADPKD from North India. *Meta Gene*. 2017;11:75-80.
- Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gøtzsche PC, Ioannidis JPA, et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. *BMJ*. 2009 Jul;339:b2700.
- Lee JG, Ahn C, Yoon SC, Park JH, No JJ, Moon CS, et al. The Glu/Asp polymorphism of eNOS gene and the renal progression in Korean autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) patients. *Korean J Genet*. 2002 Sep;24(3):241-6.
- Walker D, Consugar M, Slezak J, Rossetti S, Torres VE, Winearls CG, et al. The ENOS polymorphism is not associated with severity of renal disease in polycystic kidney disease 1. *Am J Kidney Dis*. 2003 Jan;41(1):90-4.
- Reiterová J, Miroslav M, Stekrová J, Kohoutová M, Tesar V, Kmentová D, et al. The influence of G-protein beta3-subunit gene and endothelial nitric oxide synthase gene in exon 7 polymorphisms on progression of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Ren Fail*. 2004;26(2):119-25.

17. Kocyyigit I, Eroglu E, Gungor O. Clinical problems in hemodialysis patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Semin Dial.* 2018 May;31(3):268-77.
18. Malakoutian T, Madadi B, Ebrahimi A. Evaluation of common polymorphisms of eNOS gene and ACE gene in autosomal dominant polycystic kidney disease patients and their association with HTN and renal failure. *J Renal Inj Prev.* 2021;10(1):e04.
19. Merta M, Reiterová J, Tesař V, Štekrová J, Viklický O. Influence of the endothelial nitric oxide synthase polymorphism on the progression of autosomal dominant polycystic kidney disease and IgA nephropathy. *Ren Fail.* 2002 Jul;24(4):467-75.
20. Reiterová J, Merta M, Tesař V, Štekrová J. Endothelial nitric oxide synthase affects the progression of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Blood Press Res.* 2002;25(2):87-90.
21. Xue C, Zhou CC, Sun LJ, He LL, Xu CG, Dai B, et al. Effects of endothelial nitric oxide synthase gene on end stage renal disease progression in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nephrology.* 2014 Oct;19(10):630-7.
22. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012 Apr;33(7):829-37d.
23. Ghanta M, Panchanathan E, Lakkakula BV. Cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase i stimulators and activators are therapeutic alternatives for sickle cell disease. *Turk J Haematol.* 2018 Mar;35(1):77-8.
24. Verma H, Mishra H, Khodiar PK, Patra PK, Bhaskar LV. NOS3 27-bp and IL4 70-bp VNTR polymorphisms do not contribute to the risk of sickle cell crisis. *Turk J Haematol.* 2016 Dec;33(4):365-6.
25. Rath M, Müller I, Kropf P, Closs EI, Munder M. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Front Immunol.* 2014 Oct;5:532.
26. 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 Jul;32(1):3-8.
27. Kocyyigit I, Taheri S, Sener EF, Unal A, Eroglu E, Öztürk F, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene expression is associated with hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Cardiorenal Med.* 2014 Dec;4(3-4):269-79.
28. Amador-Martínez I, Pérez-Villalva R, Uribe N, Cortés-González C, Bobadilla NA, Barrera-Chimal J. Reduced endothelial nitric oxide synthase activation contributes to cardiovascular injury during chronic kidney disease progression. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2019 Aug;317(2):F275-F85.
29. Neubauer B, Schrankl J, Steppan D, Neubauer K, Sequeira-Lopez ML, Pan L, et al. Angiotensin II short-loop feedback: is there a role of ang ii for the regulation of the renin system in vivo? *Hypertension.* 2018 Jun;71(6):1075-82.
30. Ahmad A, Dempsey SK, Daneva Z, Azam M, Li N, Li PL, et al. Role of nitric oxide in the cardiovascular and renal systems. *Int J Mol Sci.* 2018 Sep;19(9):2605.
31. Kahveci AS, Barnatan TT, Kahveci A, Adrian AE, Arroyo J, Eirin A, et al. Oxidative stress and mitochondrial abnormalities contribute to decreased endothelial nitric oxide synthase expression and renal disease progression in early experimental polycystic kidney disease. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar;21(6):1994.
32. Ratnam S, Nauli SM. Hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease: a clinical and basic science perspective. *Int J Nephrol Urol.* 2010;2(2):294-308.
33. Klawitter J, Reed-Gitomer BY, McFann K, Pennington A, Klawitter J, Abebe KZ, et al. Endothelial dysfunction and oxidative stress in polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014 Dec;307(11):F1198-F206.
34. Wiwanitkit V. Nitric oxide synthase and polycystic kidney disease. *J Nephropharmacol.* 2015;4(2):85-7.
35. Persu A, Stoenoiu MS, Messiaen T, Davila S, Robino C, El-Khattabi O, et al. Modifier effect of ENOS in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet.* 2002 Feb;11(3):229-41.
36. Lamnissou K, Ziropiannis P, Trygonis S, Demetriou K, Pierides A, Koptydes M, et al. Evidence for association of endothelial cell nitric oxide synthase gene polymorphism with earlier progression to end-stage renal disease in a cohort of Hellens from Greece and Cyprus. *Genet Test.* 2004;8(3):319-24.
37. Noiri E, Satoh H, Taguchi J, Brodsky SV, Nakao A, Ogawa Y, et al. Association of eNOS Glu298Asp polymorphism with end-stage renal disease. *Hypertension.* 2002 Oct;40(4):535-40.
38. Dias RG, Negrão CE, Krieger MH. Nitric oxide and the cardiovascular system: cell activation, vascular reactivity and genetic variant. *Arq Bras Cardiol.* 2011 Jan;96(1):68-75.
39. 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 Nov;9(18):2629-37.
40. Tazón-Vega B, Vilardell M, Perez-Oller L, Ars E, Ruiz P, Devuyt O, et al. Study of candidate genes affecting the progression of renal disease in autosomal dominant polycystic kidney disease type 1. *Nephrol Dial Transplant.* 2007 Jun;22(6):1567-77.