



Endotélio e Genética

INTRODUÇÃO

Quando pensamos em doenças associadas à disfunção endotelial, é comum identificarmos pacientes que se comportam de forma diferente da maioria, ou seja, com um pequeno número de fatores de risco clínicos desenvolvem a doença (fenótipo), enquanto outros pacientes com maior número de fatores de risco clínicos apresentam certa resistência à doença. Da mesma forma, às vezes, a progressão da doença se dá de forma mais rápida em alguns indivíduos do que em outros, sem causa aparente. Um dos fatores que podem explicar isso é um conjunto de características genéticas (genótipos) que conferem maior risco ou maior resistência a determinado fenótipo.

Fenótipo é definido como um traço observável, seja ele diretamente visível, como a cor do cabelo ou a presença de uma doença, ou apenas mensurável, como a taxa de metabolismo de um fármaco, resposta a fármacos etc. Além disso, quando há bases genéticas que influenciam o risco para determinado fenótipo, é comum vermos casos em que a doença se repete ao longo das gerações de uma mesma família. Isso é bem claro em relação a doenças comuns como o câncer e a hipertensão, entre outras. De fato, estima-se que a herdabilidade da pressão arterial de consultório seja em torno de 15% a 30%, e até 60% da variabilidade da pressão arterial medida a longo prazo seria influenciada por traços hereditários.¹

Hoje, entende-se que a maior parte dos fenótipos comuns é de natureza multifatorial e, na grande maioria, multigênica.² Isso equivale a dizer que não há um determinismo genético em que um indivíduo que carrega um alelo (característica genética) será condenado, necessariamente, a apresentar uma doença associada àquele alelo.² Na verdade, esses fenótipos comuns sofrem influência de diversos fatores genéticos e ambientais que, em conjunto, compõem um risco quanti-

ficável para o desenvolvimento de determinado fenótipo (Figura 9.1). Esse conceito é aplicável às doenças cardiovasculares que envolvem disfunção endotelial: além de fatores clínicos como obesidade, tabagismo, etilismo, gênero e idade,^{3,4} variantes genéticas em componentes importantes da função endotelial podem predispor ou proteger contra o desenvolvimento da doença.³ Disso, obviamente, excluem-se os erros inatos do metabolismo ou outras doenças raras de característica monogênica, nas quais uma mutação leva à perda maciça da capacidade de uma via metabólica, por exemplo, e aí sim temos a associação de um alelo com um fenótipo de maneira clara e precisa.¹ Mutações desse tipo são raras, e provavelmente não explicam a maioria dos casos de doenças comuns, as quais são de maior relevância do ponto de vista da saúde pública.

Este capítulo propõe-se a gerar uma visão geral, voltada para o clínico, da atual conjuntura em relação à genética envolvendo genes expressos pelo endotélio. Não temos, portanto, o objetivo de exaurir o assunto, mas apenas comentar brevemente alguns resultados que temos no momento, bem como sua relevância clínica. A título de exemplo, entraremos de forma mais aprofundada no gene que poderíamos pensar como o “gene-candidato protótipo” do endotélio, obviamente, o *NOS3*, que codifica a sintase endotelial do óxido nítrico.

TREZE ANOS APÓS A CONCLUSÃO DO PROJETO GENOMA HUMANO: O QUE MUDOU?

Uma das grandes conquistas recentes em termos de genética humana foi a análise do genoma humano, que nos permitiu conhecer a nós mesmos de forma muito mais completa.^{5,6} Mais de uma década após a divulgação do primeiro rascunho do genoma humano, ainda não temos exames de DNA determinando a profissão, o salário e a expectativa de vida de nossos filhos, como

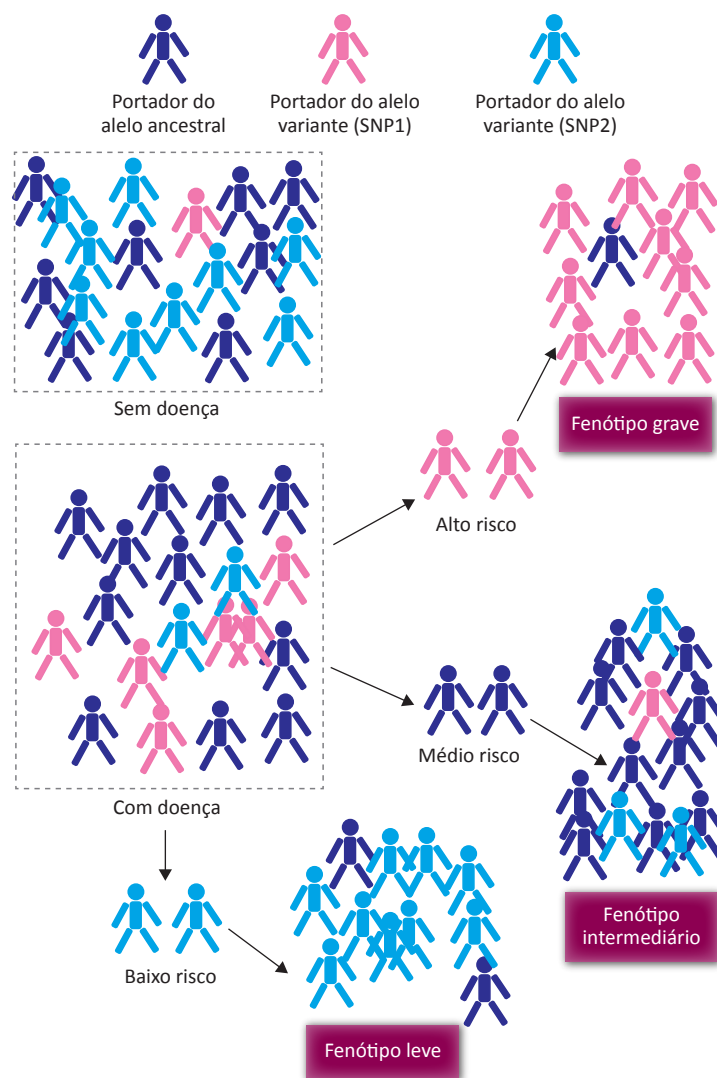


Figura 9.1 Associação de polimorfismos com grupos de indivíduos portadores de fenótipos.

Nessa figura estão exemplificados dois polimorfismos: o *single nucleotide polymorphism* (SNP) 1 e o SNP2. Temos como exemplo portadores de ambos os alelos ancestrais (sujeito azul-escuro), portadores do alelo variante do SNP1 (sujeito rosa) e portadores do alelo variante do SNP2 (sujeito azul-claro). Para simplificar a figura, não representamos os portadores de ambos os alelos variantes. Supondo que alelo variante do SNP1 tenha efeito maléfico, enquanto o alelo variante do SNP2 tenha efeito protetor, quando analisarmos populações caso-controle veremos uma frequência relativa maior de sujeitos azul-claro no grupo sem doença em relação ao grupo com doença. Da mesma forma, a proporção de sujeitos rosa é maior nos grupos com doença quando comparado ao grupo sem doença. A mesma análise pode ser feita em relação à progressão da doença ou outros subfenótipos mais específicos (resposta a fármacos, subclassificações de sintomas, entre outros). Ali também a ideia será a mesma: se há um efeito genético, espera-se maior proporção de portadores do alelo protetor (sujeito azul-claro) em populações de portadores de fenótipos mais brandos, ao passo que se espera proporção maior de portadores do alelo de risco (sujeito rosa) nos grupos de fenótipos mais intensos. A presença de todos os genótipos no grupo saudável ilustra a ideia de que não há um determinismo genético. Não é pelo fato de o indivíduo rosa ser portador de alelo de risco que ele desenvolverá a doença. Outro fato interessante é que a análise de cada subfenótipo é independente: alelos de genes não relacionados ao gatilho da doença, e que, portanto, não afetam o risco para ter ou não a doença podem alterar outros parâmetros como velocidade da progressão da doença ou resposta aos fármacos.

imaginado em 1997 pelo famoso filme *Gattaca*. De fato, a genética de doenças complexas e a farmacogenética, que eram as grandes promessas de desdobramentos do

projeto genoma humano, não se desenvolveram com a rapidez prevista (Figura 9.2). A grande expectativa que se sucedeu aos bilhões de dólares gastos no projeto Ge-

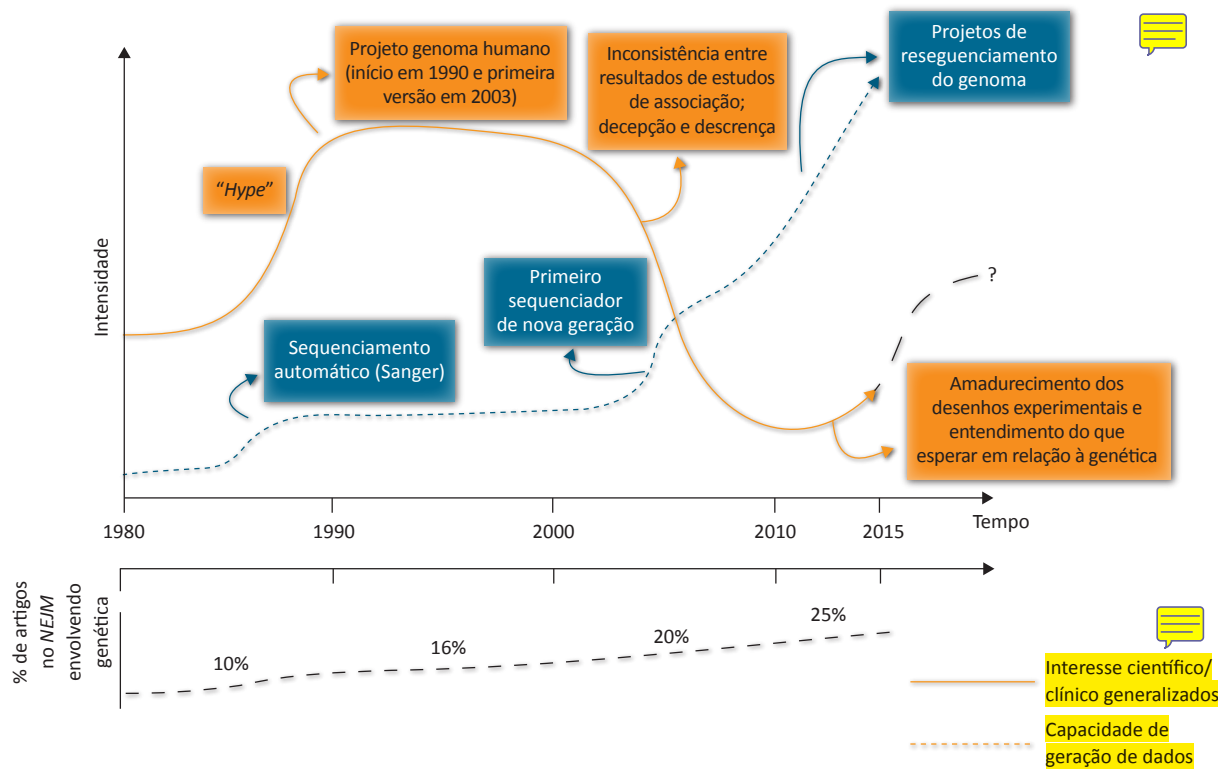


Figura 9.2 Linha do tempo ilustrando de forma aproximada a capacidade técnica, o interesse científico/clínico e a contribuição de real impacto da genética na medicina.

A linha azul representa o interesse científico e clínico na medicina genômica ao longo do tempo, ao passo que as linhas marrom e verde representam respectivamente a capacidade técnica (principalmente a velocidade) em gerar dados e o percentil de artigos da prestigiada revista clínica *New England Journal of Medicine* enfocando dados genéticos. A década de 1980 foi o grande *boom* da biologia molecular, e nessa época criou-se enorme expectativa sobre o impacto da biologia molecular na medicina. No ano de 1990 criou-se o projeto genoma humano que, num prazo de quinze anos, desvendaria o código genético humano. Ao longo da década de 1990 houve um gigantesco investimento em equipamentos de sequenciamento de DNA em todo o mundo, o que permitiu tanto a execução do genoma humano como de centenas de outros organismos em seguida. Ao passo que se obteve o genoma, passou-se a estudar como marcadores individuais se associariam a fenótipos clínicos. Salvo poucas exceções, demonstrou-se que polimorfismos comuns causam efeitos pequenos, muitas vezes irrisórios frente aos fatores ambientais, o que gerou grande decepção e descrença. Contribuíram, também, para essa descrença, o fato de milhares de artigos terem sido publicados trazendo resultados conflitantes, havendo associações genótipo-fenótipo obtidos por uns que não se reproduziram em estudos de outros grupos ou foram até mesmo refutados por outros. Apesar dessa descrença por grande parte da comunidade científica e clínica, ainda houve grande investimento em genotipagens por parte de projetos de ressequenciamento do genoma, o que criou uma demanda para o desenvolvimento de novas tecnologias de sequenciamento. Com isso, na década de 1990 e em meados do ano 2000 surgiram novas técnicas, como os microarranjos de DNA e o sequenciamento de nova geração, respectivamente. Essas técnicas demandaram algum tempo entre sua criação e seu amadurecimento. Portanto, o verdadeiro salto na capacidade técnica de geração de genótipos aparece do meio para o fim do ano 2000. Ao passo que, nos últimos cinco anos, o crescimento da capacidade de determinação de genótipos aumentou exponencialmente, tanto pelos chips de DNA (hoje chegando a mais de 1 milhão de polimorfismos por chip), quanto pelos sequenciadores de nova geração. Houve também um amadurecimento dos critérios científicos para criação desse tipo de estudo, o que deve reduzir paulatinamente as inconsistências entre os dados, tendo em vista que dificuldades técnicas vão sendo eliminadas. Esse amadurecimento, em conjunto com a redução do custo por base de DNA sequenciada, e com novas abordagens genômicas, estão reavivando o interesse clínico e científico pela medicina genômica. Em paralelo a todos esses acontecimentos, é visível que a genética vem paulatinamente se consolidando na área prática/clínica. Se nos anos de 1980 apenas 10% dos artigos publicados no *NEJM* envolviam genética, hoje em dia um a cada quatro artigos publicados na mesma revista envolve dados genéticos/genômicos.

noma Humano entre 1990 e 2003 não foi satisfeita de imediato, e muito do *hype* (o “dar o que falar”, o “estar na moda”) se perdeu. Apesar de pesquisadores de grande reputação na área terem visões otimistas (Tabela 9.1),² a verdade é que muito pouco em relação à aplicabilidade

clínica dessa enormidade de informações, de fato, foi alcançada, e muito tempo e esforço ainda são necessários para tornar real tal visão.² Houve um enorme “choque de realidade” em nós, cientistas: conseguimos decodificar o código bioquímico em letras. Muito bem, mas que

**Tabela 9.1** Citações de grandes cientistas sobre a genômica na medicina.

- “By 2015, we will see the beginnings of a real transformation in the therapeutics of medicine, which by 2020 will have touched virtually every disorder [...]. And the drugs that we give in 2020 will for the most part be those that were based on the understanding of the genome, and the things that we use today will be relegated to the dust bin¹³⁹”
- “[...] However, NIH will not fund any use of gene-editing technologies in human embryos. The concept of altering the human germline in embryos for clinical purposes has been debated over many years from many different perspectives, and has been viewed almost universally as a line that should not be crossed [...].” Declaração do NIH sobre financiamento de pesquisa utilizando tecnologias de edição gênica em embriões humanos.¹⁴⁰

Francis Collins**Contribuições**

- Identificação dos genes causadores de fibrose cística e doença de Huntington.
- Líder do projeto Genoma Humano e diretor do National Institute of Health.
- “The ever quickening advances of science made possible by the success of the Human Genome Project will also soon let us see the essences of mental disease. Only after we understand them at the genetic level can we rationally seek out appropriate therapies for such illnesses as schizophrenia and bipolar disease.” – The New York Times.¹⁴¹

James D. Watson**Contribuições**

- Watson e seu colega Crick reinterpretaram resultados de difração de raios X nos anos de 1950 e propuseram o modelo de dupla -hélice do DNA que conhecemos hoje.
- “Finally one should add that in spite of the great complexity of protein synthesis and in spite of the considerable technical difficulties in synthesizing polynucleotides with defined sequences it is not unreasonable to hope that all these points will be clarified in the near future, and that the genetic code will be completely established on a sound experimental basis within a few years.” Discurso de Francis Crick ao ganhar o prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina, em 1962.¹⁴²

Francis Crick


- Crick e seu colega Watson reinterpretaram resultados de difração de raios X nos anos de 1950 e propuseram o modelo de dupla hélice do DNA que conhecemos hoje.

palavras, parágrafos, capítulos e mensagens essas letras querem dizer?

A verdade é que a complexidade da genética humana é muito maior do que se previa. Os grandes gargalos de garrafa no avanço da genética de doenças complexas têm sido a interpretação dos resultados obtidos, as limitações experimentais, as conclusões baseadas em associações frágeis, e a própria natureza da genética de populações. Esta última nos mostra que não é possível extrapolar diretamente dados obtidos em uma população de origem étnica bem-definida diretamente para outras populações. Se um fenótipo é resultado da interação de centenas de variantes, ao analisarmos populações com diferentes conjuntos de características genéticas percebemos, por exemplo, que um resultado contundente em japoneses pode não ser relevante para caucasianos, e assim por diante. Pouco a pouco, essa área de investigação científica tem se adaptado, sendo atualmente difícil publicar um artigo simplesmente demonstrando um efeito biológico associado a um único polimorfismo, particularmente quando a amostra é pequena (cem controles e

cem pacientes, por exemplo). Poucos darão crédito a tal achado sem que números muito maiores de indivíduos sejam estudados e sem que haja replicação dos achados em outras populações. Por outro lado, estudos envolvendo milhares de casos e controles, com abordagens genômicas, são mais facilmente aceitos, apesar de até agora terem contribuído relativamente pouco frente ao seu alto custo de execução.

Entre diversos avanços que podemos citar na última década está o desenvolvimento dos *Genome Wide Association Studies* – GWAS, livremente traduzidos como estudos de associação genômica ampla.² Esses estudos amplos realizam centenas de milhares de testes independentes, examinando a possível associação de cada polimorfismo comum com o fenótipo estudado. É sabido em estatística que, se você fizer testes suficientes, em algum momento você encontrará uma associação (falsa), totalmente devida ao acaso. Esse é o chamado erro tipo I. Para compensarmos esse erro, precisamos ajustar o valor de alfa (convencionalmente menor do que 0.05 em análises estatísticas comuns), de tal forma a assegurarmos que associações falsas não

sejam detectadas em uma taxa muito alta. Nesse sentido, é comum nos GWAS ser utilizado um valor de $P < 10^{-7}$ ou $P < 10^{-10}$, por exemplo, para se considerar uma associação como significativa.⁷ Ainda, avaliar os genótipos de centenas de milhares de polimorfismos de cada voluntário não é uma tarefa ordinária. Para facilitar a execução desses estudos, o primeiro passo foi determinar as estruturas de haplótipos em diferentes populações (HapMap Project, <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). Haplótipos são conjuntos de alelos de diferentes polimorfismos que, por serem próximos entre si, acabam segregando conjuntamente, passando de geração a geração. Isso é explicado pelo fato de que a recombinação gênica (que ocorre durante a meiose na formação dos gametas) não é um evento completamente aleatório; há regiões do DNA mais propensas a serem clivadas durante esse processo. Dessa forma, há uma baixa taxa de recombinação dentro dos blocos haplotípicos, e uma alta recombinação entre os demais blocos. Uma vez sabendo quais são os blocos haplotípicos comuns, passou-se a usar a estratégia de avaliar os genótipos de determinado polimorfismo para representar qual seria o conjunto de alelos de um bloco haplotípico completo (os polimorfismos “etiqueta”, ou  *snp*). Isso permitiu que fosse mapeada de forma contundente e ampla a grande quantidade de polimorfismos frequentes, tendo-se que determinar experimentalmente apenas uma fração destes.

Assim nasciam os primeiros GWAS utilizando chips de microarranjos de DNA (ou do inglês, *microarrays*). Estes, com apenas alguns milhares de genotipagens, proporcionam informações sobre a variabilidade genética comum do genoma como um todo. Essa abordagem, de certa forma, também é limitada devido às extrapolações feitas, assumindo-se haver homogeneidade nas populações estudadas e representatividade para os haplótipos atribuídos. Deve ser óbvio para o leitor que essa era uma abordagem que analisava o todo de forma grosseira, sem avaliar um universo de informações referentes às variantes mais raras do genoma, pois analisava-se somente um conjunto predefinido de polimorfismos. Seria como se um médico miope fizesse um exame de um paciente sem óculos, usando luvas de amianto, fazendo perguntas em português a um paciente que só entende alemão. De fato, alguns resultados contundentes foram encontrados, porém em quantidade muito pequena e a custos exorbitantemente altos, o que dificultou a popularização dessa abordagem experimental em escala mundial.

Mais recentemente foi desenvolvida a abordagem de sequenciamento de DNA de nova geração. Essa abordagem permite o sequenciamento direto de todo

um genoma em algumas semanas, determinando exatamente cada base em cada posição do DNA. Apesar de ainda ser muito cara, essa abordagem já tem sido utilizada para diagnóstico molecular de síndromes monogênicas sem diagnóstico fechado, em alguns tipos de câncer ou em pesquisa.²

O sequenciamento de nova geração representa um grande salto, que permitirá a investigação não apenas das variantes comuns, mas também das mutações raras sobre fenótipos comuns. Seja por sequenciamento ou por microarranjos, a grande vantagem dos GWAS frente à estratégia comum de análise de genes-candidatos é que, por ser uma análise não limitada por hipóteses formuladas *a priori*, não há limitação devida aos poucos conhecimentos fisiopatológicos existentes.

De fato, os GWAS têm auxiliado a ampliar a rede de genes e proteínas envolvidas em fenótipos macroscópicos e ajudam a entender processos fisiopatológicos.² Alguns “novos genes” identificados pelos GWAS têm sido de fato confirmados como protagonistas relevantes em doenças cardiovasculares. Por outro lado, grande parte do atual conjunto de dados oriundos desses estudos aponta para associações de polimorfismos em regiões intergênicas ou em genes cuja função até então é completamente desconhecida. Assim, voltamos à questão anterior: como interpretar essas associações? Se não conhecemos como o gene X se relaciona com a doença, como interpretar o resultado encontrado no GWAS? Seria apenas um artefato estatístico ou, de fato, estamos diante de uma nova via metabólica ou de sinalização celular até então desconhecida? O tempo dirá. Enquanto isso, fique claro para o leitor que, apesar de alguns dados contundentes, a grande maioria das informações relevantes da genética de doenças complexas não vem de GWAS, nem de polimorfismos em genes candidatos, mas sim da elucidação molecular de doenças monogênicas.¹ Ora, se uma mutação que gera um *stop códon* no gene X causa o fenótipo Y, fica óbvia a relevância de alterações menos contundentes nesse mesmo gene, alterando de forma mais sutil o mesmo fenótipo.

Um claro avanço, que está diretamente relacionado ao projeto genoma, porém muitas vezes não interpretado dessa forma, foi a enxurrada de modelos animais *knockout* para milhares de diferentes genes que surgiram na última década.² Uma vez que se criou uma capacidade instalada para gerar sequências de DNA, por que não desvendar o genoma dos ratos *Wistar* ou dos camundongos *BALB/C*, e assim por diante? Com o conhecimento da sequência de DNA é muito mais fácil utilizar as tecnologias de *knockout* ou de RNA de interferência para modular o gene e desco-

brir a relevância deste em modelos de doenças ou na resposta aos fármacos. O grande desdobramento disto, obviamente, não está no avanço do entendimento dos aspectos hereditários das doenças complexas, mas no maior entendimento das bases moleculares dos processos fisiopatológicos e respostas aos fármacos. Esta é, de fato, uma grande vitória dos projetos genômicos que, por si sós, já justificam diversos gastos feitos, desconsiderando-se os avanços que ainda ocorrerão em décadas por vir.

Outro avanço, extremamente recente, é o desenvolvimento de uma técnica relativamente de fácil execução para a criação de linhagens de culturas de células *knockout*,^{8,9} e para alterações de células embrionárias. Esse sistema é denominado CRISPR/Cas-9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), e tudo indica que trará uma revolução na geração de modelos *knockout*, já que simplifica muito o processo, tanto para a geração de animais *knockout* como para a geração de linhagens imortalizadas *knockout*, ou até mesmo para a manipulação gênica de células oriundas de pacientes.^{10,11} Essa técnica está gerando grande debate em relação ao seu uso em embriões humanos para cura de doenças monogênicas e possível melhoramento genético humano. Este assunto tem provocado reações negativas por haver um limite ético, que não pode ser ultrapassado sem uma decisão consciente da comunidade científica e da comunidade em geral (Tabela 9.2).¹²

Outra área do conhecimento que sofreu grande impulso nos últimos anos é a da epigenética. Esta trata de fatores que também podem ser herdados e que se relacionam ao DNA, porém não são informações contidas nos códigos de adeninas, timinas, citosinas e guaninas. Essa área do conhecimento trata, por exemplo, da metilação de citosinas no DNA (ilhas CpG), metilação e acetilação de histonas (ambos processos regulando quando um gene está ou não disponível para leitura), e a produção de RNAs de interferência que atuam sobre a expressão de um gene a nível pós-transcricional. Essa também é uma área em franca “ebulição” e que, certamente, trará muitos resultados animadores nos próximos anos. Uma belíssima revisão da epigenética relacionada ao endotélio foi publicada na *Circulation Research*¹³ e pode ser consultada pelo leitor interessado na área.

Por fim, ao refletirmos sobre o porquê de estudos tanto em genes- candidatos como em GWAS terem grande dificuldade em gerar resultados reprodutíveis, surgiu um certo questionamento sobre se, de fato, estamos determinando o fenótipo dos pacientes de forma precisa. Será que um hipertenso com excesso de aldosterona e alta atividade do sistema renina-angiotensina


deveria estar no mesmo grupo de outro hipertenso com hiperatividade do sistema nervoso simpático? Se entendemos que a fisiopatologia é diferente, por que imagináramos que as influências genéticas seriam iguais? Eis, talvez, o maior obstáculo aos estudos de associação: se definimos todos os pacientes como “hipertensos” para conseguir atingir um número na ordem de poucos milhares de participantes por grupo, como garantir que um estudo no Reino Unido tenha a mesma proporção de pacientes sal-sensíveis que um estudo no Brasil? Será que um resultado obtido no Reino Unido e não reproduzido no Brasil pode ser devido às diferenças populacionais ou poderia haver diferença na composição dos fenótipos? Essa é a maior limitação de todas que, de certa forma, vincula o avanço dos conhecimentos de bases genéticas de doenças complexas necessariamente ao avanço da medicina diagnóstica. Se no futuro separarmos esses diferentes subgrupos de doenças, talvez os estudos de associação genética que no passado falharam em mostrar evidências confiáveis, contundentes e reprodutíveis, passem a trazer resultados mais animadores.

Aqui nos encontramos em um certo dilema: a necessidade de melhorar cada vez mais a determinação do fenótipo dos pacientes, e com isso a estratificação destes em subgrupos (razões clínicas/biológicas). Por outro lado, precisamos manter um número de indivíduos robusto para termos poder amostral (razões estatísticas). Como determinar fenótipos e subfenótipos e como estratificá-los mantendo um enorme número de indivíduos em cada subgrupo? Esse problema é contornável com duas estratégias, que por sua vez também têm limitações: o uso de estudos multicêntricos ou a coleta progressiva de amostras de pacientes acompanhados por um determinado centro ao longo de várias décadas. Aceitar e apropriar-se dessa dificuldade pode parecer algo desanimador, mas é algo que pode nos levar à direção certa. Existem catalisadores que podem permitir o sucesso dessas empreitadas: políticas públicas que criem bases de dados integradas, que criem biobancos integrados e que tutelem e disponibilizem os dados, amostras e contatos dos pacientes para estudos presentes ou futuros, com números maiores, incorporando novas tecnologias que estão se popularizando. Hoje está absolutamente claro que o grande gargalo desse processo científico não é mais a capacidade técnica de gerar dados na escala de gigabases de DNA (que já existe, apesar de ter um alto custo), mas, sim, ter um enorme número de sujeitos portadores de um mesmo subfenótipo, altamente específico e bem escrutinado, disponíveis em um curto espaço de tempo.

Ao leitor que tem interesse em se aprofundar no assunto, sugerimos uma revisão¹⁴ e uma perspectiva de 2011 do National Institute of Health sobre a medicina genômica.² Informações sobre os polimorfismos e sobre as sequências dos genes podem ser encontradas nos sites do PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>), no site Ensembl (www.ensembl.org), e no site Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>). Informações sobre frequências alélicas de milhares de polimorfismos em populações de diferentes origens estão disponíveis nos sites do HapMap (www.hapmap.org), e Seattle SNPs (<http://pga.gs.washington.edu>). Informações sobre fatos e números relacionados à genética humana podem ser encontradas no site do National Human Genome Research Institute (<http://www.genome.gov/10000202>). Finalmente, informações sobre farmacogenética podem ser encontradas nos sites <www.pharmgkb.org e <http://www.drugbank.ca/>>.

Nas sessões a seguir abordaremos algumas das associações de polimorfismos genéticos em genes expressos pelo endotélio com doenças cardiovasculares. Para não gerarmos um texto demasiadamente longo, limitamo-nos a apenas alguns casos dos genes mais importantes relacionados ao controle do tônus vascular pelo endotélio. Não abordaremos, portanto, as funções do endotélio sobre a hemostasia ou sobre a migração de leucócitos durante processos inflamatórios, ou outros. Além disso, não abordaremos em maior detalhe a epigenética do endotélio e técnicas de manipulação gênica, pois apesar de serem muito excitantes do ponto de vista científico, ainda são incipientes em relação à sua aplicação clínica.

PRINCIPAIS GENES ENVOLVIDOS NAS FUNÇÕES ENDOTELIAIS

Um dos principais genes envolvidos na regulação da função endotelial é o **NOS3**, que ifica a sintase endotelial do óxido nítrico. Além disso, existem genes que não necessariamente são expressos no endotélio, mas podem gerar produtos cujos receptores estão lá. É interessante expor ao clínico a visão crítica de que, das associações a seguir, poucos exemplos de fato estão sólidos na literatura. A maioria dos dados apresentados configura evidências de envolvimento dos genes que ainda necessitam de validações em populações maiores ou diferentes das estudadas originalmente para considerar-se a utilização dessas informações na prática clínica. Além disso, são necessárias análises sobre o custo/benefício que potenciais informações genéticas podem adicionar à prática clínica antes que essa possa ser utilizada, por exemplo, pelo Sistema Único de Saú-

de (SUS). Para o leitor que se interessar em uma leitura mais aprofundada sobre fatores genéticos relacionados à pressão arterial, uma elegante revisão está disponível na revista *Circulation research*.¹

Sistema do óxido nítrico

Sintase endotelial do óxido nítrico  **NOS3**

A sintase endotelial do óxido nítrico (eNOS) é a principal enzima responsável pela síntese de óxido nítrico (NO) no endotélio vascular. Essa enzima é codificada pelo gene *NOS3*, mapeado na região 7q36 nos seres humanos.¹⁵ Desde sua caracterização, no início da década de 1990, um número considerável de polimorfismos tem sido descrito nesse gene, incluindo polimorfismos de base única (SNPs), repetições em tandem de número variável (VNTRs), microssatélites e inserções/deleções (indel).¹⁶ Dentre esses polimorfismos, destacam-se aqueles com implicações funcionais e clínicas.

Implicações funcionais de polimorfismos no gene *NOS3*

De maneira geral, os polimorfismos no gene *NOS3* considerados funcionais são aqueles que afetam a expressão ou a atividade da eNOS. Dentre eles, dois SNPs na região promotora, um VNTR no intron 4, e um SNP no exon 7 têm sido amplamente estudados.^{17,18,19} A Figura 9.3 ilustra os mecanismos funcionais desses polimorfismos.

O SNP g.-786T>C (rs2070744) é caracterizado pela substituição de uma timina por uma citosina na posição -786 na região promotora do gene *NOS3*. As implicações funcionais desse polimorfismo estão provavelmente relacionadas à proteína de replicação A1 (RPA1), que atua como repressor gênico.²⁰ Estudos *in vitro* demonstraram que essa proteína repressora se liga com maior afinidade à região promotora do gene *NOS3* quando o alelo C está presente, resultando em uma drástica redução da atividade transcricional e, conseqüentemente, menor expressão da eNOS em comparação ao alelo T.^{20,21} Consistentes com esses achados, estudos *in vivo* revelaram menor biodisponibilidade de NO em indivíduos portadores do alelo C em relação aos portadores do alelo T,²² corroborando o papel funcional desse polimorfismo.

Outro importante SNP localizado na região promotora do gene *NOS3* é o g.-665C>T (rs3918226), cujo aspecto funcional foi demonstrado recentemente.¹⁹ Apesar da ausência de associação entre esse polimorfismo e níveis plasmáticos de nitrito²³ (um importante marcador da produção endógena de NO), estudos *in*

vitro mostraram que a troca de citosina por timina na posição -665 do promotor resulta em uma redução da expressão da eNOS. Esse efeito estaria possivelmente

relacionado à modificação da afinidade por determinados fatores de transcrição,¹⁸ os quais regulam a atividade do promotor, afetando, assim, a transcrição gênica.

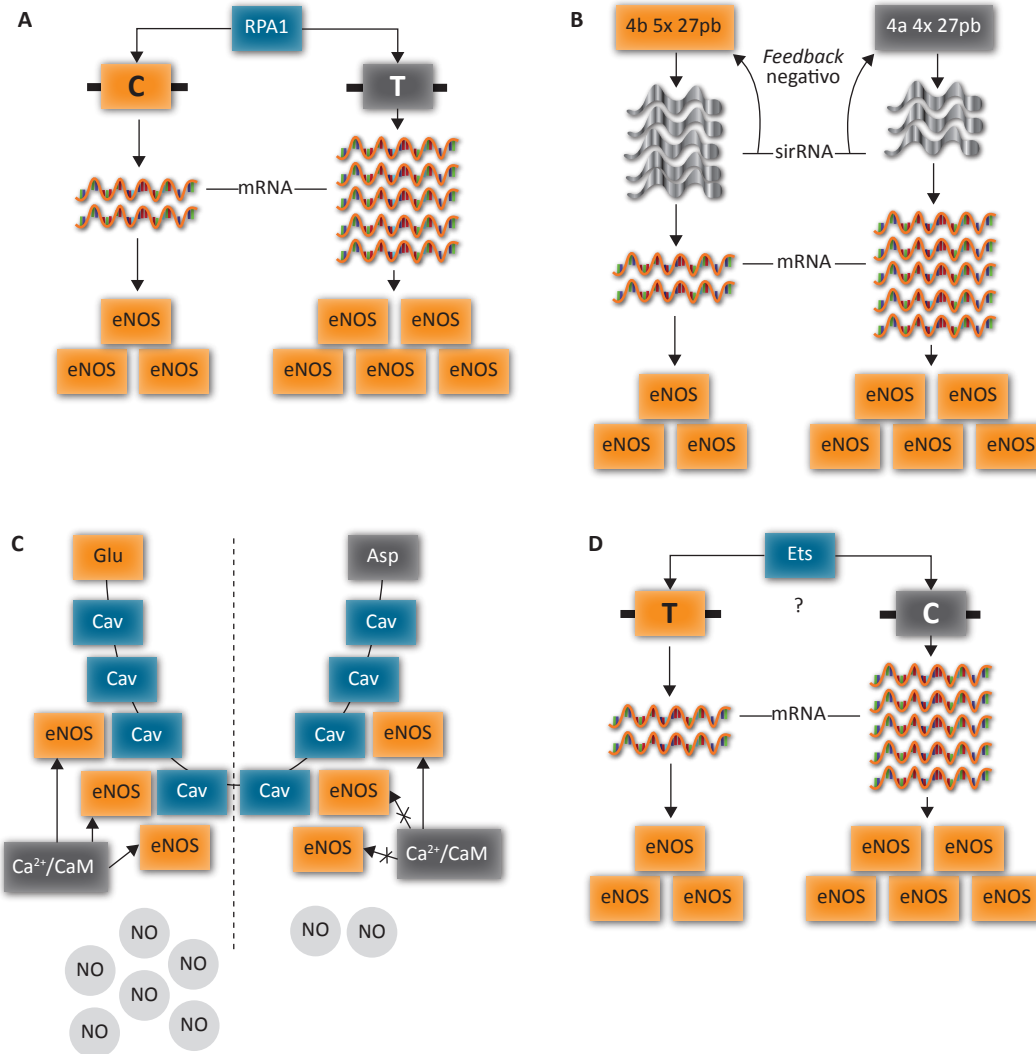


Figura 9.3 Polimorfismos funcionais do gene *NOS3*: mecanismos pelos quais a expressão ou atividade da proteína é modificada.

Nos quadros A, B, C e D estão representados os mecanismos dos polimorfismos g-786T>C, *Variable Number of Tandem Repeats* no intron 4, g.894G>T (ou Glu298Asp) e g-665C>T, respectivamente. **(A)** O polimorfismo situa-se em uma região que, quando possui o alelo T, se configura em uma sequência reconhecida pelo RPA1, reprimindo a transcrição do gene, portanto, levando a uma queda na expressão da eNOS quando comparado ao alelo C. **(B)** Cada porção de 27 pares de base, que pode ser repetida cinco (alelo 4b) ou quatro vezes (alelo 4a) codifica um siRNA que reduz a expressão do próprio gene da eNOS. Uma vez que o alelo 4b tem maior número de repetições, gera mais siRNA que, por sua vez, reduz o rRNA do gene *NOS3* e, portanto, temos menor expressão da enzima. **(C)** O alelo Glu gera uma proteína com alta afinidade pela caveolina 1. Ao passo que a caveolina 1 inativa a eNOS, essa interação serve para localizar a eNOS na caveola, onde estará disponível para os fatores que ativam a enzima. O alelo Asp gera uma enzima com baixa afinidade pela caveolina 1 e, portanto, a eNOS não se acumula de forma tão eficiente na caveola, não estando disponível, portanto, aos fatores de ativação da eNOS. **D.** Foi demonstrado que o polimorfismo g-665C>T é funcional, de tal forma que o alelo T está associado a maior expressão da eNOS em relação ao alelo C. Apesar de funcional, ainda não se sabe ao certo o mecanismo, mas análises computacionais sugerem que a mudança de alelos poderia alterar a afinidade por fatores de transcrição da família ETS que poderiam reconhecer essa região, porém isso ainda não está definitivamente demonstrado. RPA1: Proteína de Replicação A 1; mRNA: ácido ribonucleico (RNA) mensageiro; eNOS: sintase endotelial do óxido nítrico; Cav: caveolina; Ca^{2+}/CaM : cálcio-calmodulina; NO: óxido nítrico; siRNA: *small interference RNA*; Ets: E26 *transformation specific* (família de fatores de transcrição).

Diferente dos SNPs localizados na região promotora, que modificam a transcrição gênica, o VNTR, conhecido como 4b/4a afeta a eNOS no âmbito pós-transcricional.^{24,25} Esse VNTR é caracterizado pela repetição de 27 pares de bases no intron 4 do gene *NOS3*; os alelos mais comuns desse polimorfismo são aqueles com cinco (variante 4b) e quatro (variante 4a) cópias dos 27 pares de bases supracitados, embora outros alelos mais raros tenham sido relatados.²⁶ O papel funcional do VNTR 4b/4a está relacionado à formação de pequenos RNAs de interferência, conhecidos como *small interference RNAs* (siRNA). Estudos moleculares revelaram que células endoteliais contendo o alelo 4b apresentam maior quantidade de siRNA, resultando em níveis reduzidos de RNA mensageiro da eNOS em relação às células contendo o alelo 4a.^{24,25}

Finalmente, o SNP Glu298Asp (rs1799983) tem sua funcionalidade atribuída à modificação da atividade da eNOS.²⁷ Esse polimorfismo está localizado no exon 7 e corresponde à troca de uma guanina por uma timina na posição 894 do gene *NOS3*, resultando na substituição do aminoácido glutamina por aspartato na posição 298 da proteína.¹⁵ Estudos em cultura de células revelaram que o alelo 'Asp' reduz a ligação da eNOS à caveolina-1, diminuindo assim a disponibilidade da enzima na sua fração caveolar nas células endoteliais.²⁷ Deste modo, uma reduzida quantidade de eNOS fica disponível para ativação mediada pelo complexo cálcio-calmodulina, resultando em menor atividade enzimática em relação ao alelo 'Glu'.²⁷ Esses achados parecem ser de fato relevantes *in vivo*, uma vez que indivíduos portadores do alelo 'Asp' apresentaram reduzida formação plaquetária de NO comparados aos carreadores do alelo 'Glu'.^{28,29}

Implicações clínicas de polimorfismos no gene NOS3

Hipertensão arterial, doenças hipertensivas da gravidez, disfunção erétil, enxaqueca e distúrbios metabólicos são exemplos de doenças altamente prevalentes que envolvem a redução da formação endógena de NO como mecanismo fisiopatológico relevante. Considerando o papel fundamental desempenhado pelo NO no sistema cardiovascular e os efeitos de polimorfismos no gene *NOS3* sobre a expressão e atividade da eNOS, bem como sobre os níveis de marcadores da produção endógena de NO, grande número de estudos tem avaliado a influência de polimorfismos no gene *NOS3* nas doenças mencionadas acima. Os achados desses estudos serão brevemente discutidos a seguir.

Hipertensão arterial

Em decorrência do grande número de evidências demonstrando que distúrbios na regulação da eNOS podem levar à deficiência de NO e causar hipertensão arterial,³⁰ diversos estudos têm avaliado se polimorfismos no gene *NOS3* influenciam a suscetibilidade a esta condição clínica. De fato, um risco aumentado para o desenvolvimento de hipertensão arterial com os alelos variantes para os polimorfismos g.-786T>C, g.-665C>T, 4b/4a VNTR e Glu298Asp foram observados em alguns estudos.^{19,31,32,33,34} Porém, diversos outros estudos têm relatado ausência de associação entre esses polimorfismos e hipertensão arterial.^{35,36,37} Tais discrepâncias podem estar relacionadas à análise de polimorfismos individualmente ao invés da análise da combinação de polimorfismos em haplótipos, além dos aspectos comentados anteriormente.

A abordagem haplotípica é altamente recomendada para o estudo de genes candidatos a suscetibilidade à hipertensão arterial.³⁸ Nesse sentido, estudos têm avaliado associações entre haplótipos envolvendo os polimorfismos g.-786T>C, 4b/4a VNTR e Glu298Asp e o risco de desenvolvimento de hipertensão arterial.^{36,37,39,40} Particularmente, o haplótipo C-4b-Glu foi apontado como protetor contra o desenvolvimento da hipertensão arterial, enquanto o haplótipo C-4b-Asp aumentou o risco para a suscetibilidade a essa doença, tanto para indivíduos negros quanto para brancos.³⁶

Doenças hipertensivas da gravidez

As doenças hipertensivas da gravidez representam as principais causas de morbidade e mortalidade materna e neonatal, afetando de 3% a 5% das gestações.^{41,42} Nesse contexto, estudos indicam que a deficiência na formação de NO pode contribuir para o aumento da pressão arterial em importantes doenças hipertensivas da gravidez, como a hipertensão gestacional e a pré-eclâmpsia.⁴¹ Com base nessas evidências, uma série de estudos tem se dedicado a investigar os efeitos de polimorfismos no gene *NOS3* sobre a suscetibilidade a doenças hipertensivas da gravidez. Alguns desses estudos observaram associações entre os alelos variantes dos polimorfismos g.-786T>C, 4b/4a VNTR e Glu298Asp e o risco de desenvolvimento de pré-eclâmpsia ou hipertensão gestacional.^{43,44,45} Outros estudos, porém, falharam em demonstrar essas associações.^{42,46} Para esclarecer essas inconsistências, uma recente meta-análise avaliou estudos envolvendo polimorfismos no gene *NOS3* em pré-eclâmpsia e encontrou que o alelo C do SNP g.-786T>C e o alelo 4a do VNTR 4b/4a aumentam a suscetibilidade a essa doença hipertensiva.⁴⁷ O poli-

morfismo Glu298Asp, por sua vez, não afetou o risco para pré-eclâmpsia nesta meta-análise.⁴⁷

Além de analisar os polimorfismos individualmente, alguns estudos utilizaram, também, a abordagem haplotípica. Um dos estudos, avaliando haplótipos que incluíam os polimorfismos g.-786T>C, 4b/4a VNTR e Glu298Asp, observou associação entre o haplótipo C-4b-Asp e pré-eclâmpsia.⁴⁴ Outro estudo, por sua vez, observou maior frequência do haplótipo C-4b-Glu entre grávidas saudáveis do que nas portadoras de pré-eclâmpsia.⁴² Curiosamente, esse mesmo haplótipo foi associado ao aumento da biodisponibilidade de NO em grávidas saudáveis, o que sugere que o haplótipo C-4b-Glu pode proteger contra a pré-eclâmpsia por aumentar a formação de NO.⁴²

Migrânea

A migrânea é uma importante doença neurovascular, de etiologia multifatorial e fisiopatologia complexa. Por ser um importante mediador do controle do fluxo sanguíneo cerebral e contribuir para ativação de nociceptores, o NO desempenha um importante papel na gênese da migrânea.⁴⁸ Nesse contexto, polimorfismos no gene NOS3 parecem contribuir para a suscetibilidade a esta doença.

Os alelos variantes para os polimorfismos g.-786T>C e Glu298Asp foram associados a um risco aumentado para o desenvolvimento de migrânea.^{49,50} Além disso, o genótipo 'AspAsp' para o polimorfismo Glu298Asp foi associado a um risco três vezes maior de ocorrência de aura⁵⁰ (sintomas neurológicos transitórios que precedem um ataque de migrânea). Esse mesmo polimorfismo também parece influenciar a intensidade da dor e a idade em que a migrânea inicia.⁴⁹ Por outro lado, outros estudos relataram ausência de associação entre polimorfismos no gene NOS3 e migrânea,^{51,52} o que reforça a ideia de que a análise individual dos polimorfismos pode não ser tão eficaz para evidenciar efeitos genéticos quanto a abordagem haplotípica. De fato, um estudo envolvendo haplótipos que incluíam os polimorfismos g.-786T>C, g.-665C>T, 4b/4a VNTR, e Glu298Asp e o tagSNP rs743506, observou que indivíduos portadores dos haplótipos C-C-4a-Glu-G e C-C-4b-Glu-G possuíam risco aumentado para a ocorrência de aura,⁵² o que sugere que haplótipos no gene NOS3 podem afetar a suscetibilidade à ocorrência desses sintomas em pacientes com migrânea.

Doenças metabólicas

Doenças metabólicas tais como *diabetes mellitus* e obesidade são altamente prevalentes e têm atingido

um número cada vez maior de indivíduos ao redor do mundo.⁵³ Tendo em vista que a fisiopatologia de ambas as doenças envolve uma redução da biodisponibilidade de NO, estudos têm avaliado a contribuição de polimorfismos no gene NOS3 para a suscetibilidade a essas doenças.

Nesse sentido, fortes evidências sugerem que o alelo 4a para o VNTR 4b/4a está associado à suscetibilidade ao *diabetes mellitus*, tanto do tipo 1 quanto do tipo 2^{54,55,56} e esse efeito estaria provavelmente relacionado à disfunção endotelial associada a esse alelo em pacientes diabéticos.⁵⁷ O alelo 'Asp' para o polimorfismo Glu298Asp também parece estar associado a risco aumentado para o desenvolvimento de *diabetes mellitus*,^{56,58} e essa associação é particularmente importante em indivíduos obesos.⁵⁹ Já uma análise haplotípica envolvendo os polimorfismos g.-786T>C, 4b/4a VNTR e Glu298Asp evidenciou o haplótipo C-4b-Glu como protetor contra o desenvolvimento do *diabetes mellitus*,⁶⁰ indicando que a combinação de polimorfismos no gene NOS3 pode também prever a suscetibilidade a essa doença.

Polimorfismos no gene NOS3 também têm sido associados à obesidade e a fatores associados. De fato, portadores do alelo 'Asp' no polimorfismo Glu298Asp apresentaram maiores índices de massa corporal e maiores valores de circunferência abdominal,⁶¹ o que sugere que esse polimorfismo pode influenciar a suscetibilidade genética à obesidade. Além disso, o genótipo 4a/4a no VNTR 4b/4a foi associado à obesidade em crianças e adolescentes.⁶² Nesse contexto, considerando-se que a obesidade frequentemente se desenvolve durante a infância, é fundamental a avaliação da suscetibilidade genética a essa doença em crianças e adolescentes.

Disfunção erétil

A redução da biodisponibilidade de NO é um importante fator que contribui para a disfunção erétil, uma desordem caracterizada pela incapacidade de adquirir e manter uma ereção que permita a relação sexual.⁶³ Por isso, diversos estudos têm se dedicado a avaliar o efeito de polimorfismos no gene NOS3 sobre a suscetibilidade a essa desordem. O alelo 'Asp' referente ao SNP Glu298Asp tem sido consistentemente associado a risco aumentado para disfunção erétil em diversos estudos.^{64,65,66} Além disso, o genótipo CC referente ao SNP g.-786T>C também foi associado à suscetibilidade à disfunção erétil, sendo inclusive considerado um fator de risco independente na ausência de outros fatores.⁶⁷ Embora até o momento não existam estudos avaliando a influência de haplótipos no

gene *NOS3* sobre a suscetibilidade à disfunção erétil, um estudo recente demonstrou que haplótipos neste gene podem afetar a resposta ao sildenafil,⁶⁸ um fármaco frequentemente prescrito para tratar essa desordem. Esses achados sugerem importantes implicações farmacogenéticas de polimorfismos no gene *NOS3*, como será discutido a seguir.

Implicações farmacogenéticas de polimorfismos no gene NOS3

Polimorfismos no gene *NOS3* são os principais candidatos a afetar as respostas a fármacos que atuam na via de sinalização mediada pelo NO, como por exemplo, as estatinas. Além de atuar inibindo a síntese de colesterol, as estatinas têm como efeitos pleiotrópicos a ativação da eNOS e o aumento de sua expressão, resultando na elevação da biodisponibilidade de NO.¹⁷ Nesse contexto, células endoteliais com o genótipo CC para o polimorfismo g.-786T>C tratadas com estatinas apresentaram maiores níveis de mRNA para eNOS do que células portadoras do genótipo TT.⁶⁹ Esse efeito é provavelmente decorrente do aumento da taxa transcricional, da estabilidade do mRNA para eNOS e da diminuição da expressão da proteína repressora RPA1 promovida pela estatina de forma mais significativa nas células portadoras do genótipo CC.⁶⁹ Além disso, voluntários saudáveis portadores do alelo raro tratados com atorvastatina tiveram maior aumento da biodisponibilidade de NO²², corroborando os achados *in vitro*. Juntos, esses dados sugerem que as estatinas podem restaurar uma produção NO endógeno prejudicada, possivelmente associada com o genótipo CC.

Os inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA) também interferem na produção de NO pela eNOS, o que suporta a ideia de que as respostas a esses fármacos podem ser influenciadas por polimorfismos no gene *NOS3*. De fato, pacientes hipertensos portadores dos genótipos TC ou CC, e do alelo C para o polimorfismo g.-786T>C apresentaram melhor resposta anti-hipertensiva ao iECA enalapril.⁷⁰ O sildenafil é um fármaco que tem seu efeito modulado pela biodisponibilidade de NO, com respostas terapêuticas modificadas por polimorfismos no gene *NOS3*.⁷¹ Desta forma, indivíduos com disfunção erétil, portadores do alelo C para o SNP g.-786T>C, e do alelo 4a para o VNTR 4b/4a demonstraram melhor resposta ao tratamento com sildenafil em comparação aos portadores dos alelos T e 4b.^{68,72} Esses achados são consistentes, com um recente estudo que observou que uma menor biodisponibilidade de NO em pacientes com disfunção erétil está associada a melhor resposta terapêutica ao sildenafil.⁷³ Finalmente, haplótipos incluindo os polimor-

fismos g.-786T>C, 4b/4a VNTR e Glu298Asp também influenciaram as respostas ao sildenafil,⁶⁸ sugerindo que a análise de haplótipos pode ajudar a definir melhor as contribuições genéticas para as respostas a drogas.

Arginase I (*ARG1*) e Arginase II (*ARG2*)

As arginases I e II são enzimas homólogas que transformam a L-arginina em ureia e L-ornitina.^{74,75} Apesar de serem expressas por todo o corpo, essas enzimas são mais expressas no fígado, no endotélio, na musculatura lisa vascular (arginase I), e nas mitocôndrias de células do rim, próstata, trato gastrointestinal e vasos (arginase II).⁷⁵ O principal papel da arginase I no fígado é a eliminação de nitrogênio gerado pelo metabolismo de aminoácidos e nucleotídeos pelo ciclo da ureia.^{75,76} O papel da arginase II ainda não é bem conhecido, apesar de seu envolvimento na regulação da homeostase da L-arginina.⁷⁵

O interessante em relação às arginases é que são enzimas que competem com a eNOS pelo mesmo substrato, a L-arginina, e em alguns tecidos são colocalizadas com a eNOS. De fato, acredita-se que um desbalanço entre a expressão e a atividade das arginases e da eNOS possa ser uma das causas para a disfunção endotelial.⁷⁵ Diversos fatores afetam a regulação da expressão da arginase, incluindo fatores inflamatórios (lipopolissacarídeos, fator de necrose tumoral (TNF- α), interferon- γ ,^{75,77} interleucinas 4, 10, 13,⁷⁸ dentre outros), subprodutos do estresse oxidativo (H₂O₂,⁷⁹ peroxinitrito^{80,81}), hipóxia,^{82,83} angiotensina II,⁸⁴ entre outros.⁷⁵ A interação entre as arginases e a eNOS parece ser importante, principalmente em doenças cardiovasculares^{75,85,86} e no diabetes.^{75,87,88}

Aparentemente há uma redução na produção de NO devido à deficiência do substrato L-arginina. De fato, foi demonstrado que um aumento na atividade da arginase está associado à disfunção endotelial em diversos contextos, como hipertensão, aterosclerose,⁸⁹ diabetes,^{90,91} e no envelhecimento. Polimorfismos nas arginases I e II foram bastante estudados em relação às respostas alérgicas e à asma,⁹²⁻⁹⁴ com poucos resultados mostrando associação de polimorfismos nesses genes com pressão arterial,⁹⁵ risco para infarto do miocárdio⁹⁶ e espessura da íntima-média da carótida.⁹⁶ Esse é um gene que necessita maior atenção em futuros estudos, devido ao grande potencial em afetar a função endotelial.

Fator de crescimento vascular endotelial (*vascular endothelial growth factor*; VEGF)

O VEGF é uma das principais citocinas envolvidas no estímulo à angiogênese.⁹⁷⁻⁹⁹ Essa citocina também

está relacionada a outros efeitos, como por exemplo à sobreexpressão da eNOS endotelial e ao aumento da produção de óxido nítrico pelo endotélio.¹⁰⁰⁻¹⁰⁵ Pelo menos três polimorfismos foram amplamente estudados, por terem um aspecto funcional, ou seja, eles são capazes de alterar a expressão do VEGF: g.-2578C>A (rs699947), g.-1154G>A (rs1570360), e g.-634G>C (rs2010963). Esses polimorfismos foram associados a diversas doenças cardiovasculares, como por exemplo: pré-eclâmpsia,¹⁰⁸ enxaqueca,¹⁰⁹ hipertrofia cardíaca,¹¹⁰ obesidade infantil,¹¹¹ aterosclerose,¹¹² doença coronariana.¹¹³ Apesar de interessantes, a maioria dos estudos citados teve limitações, por exemplo, pequeno número de sujeitos incluídos ou população miscigenada. Isso não desqualifica os achados, porém é necessário validar esses resultados em populações maiores para podermos extrapolar os dados para a prática clínica.

Dimetilarginina assimétrica (*Asymmetrical dimethylarginine* – ADMA) e sua enzima de metabolismo, a dimetilarginina dimetilamino-hidrolase (DDAH1)

ADMA é uma forma natural de L-arginina, que deriva da proteólise de proteínas metiladas.¹¹⁴ A ADMA age como um inibidor endógeno dos três subtipos de NO sintases (eNOS, nNOS e iNOS). Dessa forma, quando estão presentes concentrações maiores de ADMA ocorre uma redução na produção de NO por essas enzimas. De fato, a ADMA foi implicada na patogênese de doenças cardiovasculares pela redução da síntese de NO.¹¹⁵ Além disso, há claro aumento dos níveis plasmáticos de ADMA em pacientes com falência cardíaca,¹¹⁶ doença cardíaca congênita,¹¹⁷ arritmias,¹¹⁸ hipertensão arterial,¹¹⁹ entre outros. Diversos estudos mostram que os níveis plasmáticos de ADMA podem prever eventos deletérios e mortalidade cardiovascular.¹¹⁴ Existem enzimas que metabolizam a ADMA, sendo as principais as dimetilarginina dimetilamino-hidrolases tipo 1 e 2. Essas enzimas são codificadas pelos genes *DDAH1* e *DDAH2*, sendo responsáveis pelo metabolismo de 80% do ADMA gerado pelo meio intracelular.¹²⁰ Estudos clínicos recentes têm mostrado que polimorfismos no gene *DDAH1* são capazes de modular os níveis plasmáticos de ADMA,¹²¹⁻¹²³ e que esses níveis, quando aumentados, também aumentam o risco para desfechos cardiovasculares.¹²⁴⁻¹²⁶ A associação direta entre polimorfismos no *DDAH1* e desfechos cardiovasculares já foi demonstrada em chineses com respeito a infarto e doença coronariana,¹²⁷ porém necessita de ampliação e validação em outras populações.

Sistema da endotelina

O sistema da endotelina envolve pelo menos seis principais genes: *EDN1* e *EDN2*, que codificam respectivamente a endotelina 1 e 2; e os genes *EDNRA* e *EDNRB* que codificam os receptores A e B das endotelinas e os genes das enzimas conversoras de endotelina, *ECE1* e *ECE2*. As endotelinas 1 e 2 são sintetizadas como formas maiores e inativas, que são subsequentemente clivadas para as formas ativas. Quando esses peptídeos atuam sobre receptores ET_a e ET_b em células de musculatura lisa dos vasos, levam a intensa vasoconstrição através do aumento do cálcio citoplasmático dessas células.¹²⁸ O receptor ET_b expresso nas células endoteliais, por outro lado, leva à formação de óxido nítrico pelo endotélio e também funciona como um sistema de sequestro e internalização da endotelina circulante. A importância desse sistema é ilustrada pela eficácia dos fármacos Bosentan e Darusentan, antagonistas principalmente do receptor ET_a em reduzir a pressão arterial.^{129,130} Alterações no sistema da endotelina parecem ser particularmente importantes na função renal e na gênese da hipertensão sal sensível.¹²⁸ Alguns estudos na literatura mostram associações de polimorfismos em genes do sistema endotelina com fenótipos cardiovasculares. Polimorfismos no gene do receptor, *EDNRA* foram associados à hipertensão pulmonar idiopática¹³¹ e piores fenótipos correlatos. Polimorfismos nos genes de ambos os receptores (*EDNRA* e *EDNRB*) foram associados a alterações na velocidade da onda de pulso e espessura da íntima média da carótida de hipertensos.¹³² Polimorfismos no gene *EDN1* foram associados à disfunção endotelial em crianças.¹³³ Polimorfismo no gene da enzima conversora de endotelina 1, o *ECE1* foi associado a maiores valores de pressão arterial de mulheres hipertensas japonesas.¹³⁴ Finalmente, um polimorfismo próximo ao gene *EDN3* e ao gene *GNAS* (codifica a subunidade alfa da proteína G, presente em conjunto com diversos receptores de membrana, inclusive os adrenérgicos), foi associado a diferenças na queda de pressão arterial em resposta ao diurético hidroclorotiazida em um grande GWAS.¹³⁵ Não está claro se esse último estudo, de fato, tem relação com o sistema da endotelina necessitando, portanto, de estudos de aprofundamento e validação dessa associação.

Mediadores inflamatórios

Selectina E (*SELE*)

Essa proteína tem sua expressão aumentada na membrana endotelial após estímulos proinflamatório-

rios.¹³⁶ Uma vez expressa, a selectina E tem como função promover a adesão leucocitária, permitindo que essas células realizem suas respostas inflamatórias e/ou imunes. A relação disso com a hipertensão é que essas respostas imunológicas podem causar um dano endotelial que, por sua vez, pode levar à hipertensão e a outras doenças cardiovasculares. Um grande estudo em asiáticos acompanhou 1.768 pacientes ao longo de nove anos (2003 a 2012) para verificar o aumento da pressão arterial. Entre vários genes candidatos testados, quatro TAGSNPs no gene *SELE* foram associados a diferenças na progressão da pressão arterial e ao risco de desenvolvimento de hipertensão nessa amostra.¹³⁷ Esses resultados são consistentes com outro trabalho em caucasianos, também com número de pacientes bastante robusto e acompanhamento de 11 anos, no qual polimorfismos do *SELE* também foram associados a mudanças na pressão arterial.¹³⁸ Alguns fatores tornam esses estudos bastante robustos: primeiro, grande o número amostral; segundo, o fenótipo não foi acompanhado em apenas um momento, mas na realidade foi avaliado repetidas vezes ao longo do tempo, e um padrão consistente de aumento foi observado. Isso reduz as chances de que flutuações aleatórias tenham influenciado os resultados reportados. Esse mesmo estudo em asiáticos também encontrou associações (menos contundentes) em relação aos genes *DDAH1* e *EDNRA* (abordados em outras sessões deste capítulo).

O QUE A MEDICINA GENÔMICA RESERVA PARA O FUTURO DO TRATAMENTO DAS DOENÇAS ENDOTELIAIS?

Atualmente, em termos de aplicabilidade da medicina genômica no tratamento das doenças cardiovasculares, ainda temos dados e evidências relativamente incipientes. Por outro lado, há muito ainda a ser estudado e descoberto, o que nos faz ter a ideia de que é possível extrapolar toda a empolgação vista em outras áreas da medicina (especialmente na oncologia), com os avanços da genômica. O entendimento de como fa-

tores genéticos afetam as doenças pode nos permitir selecionar pacientes que se beneficiem de abordagens personalizadas de tratamentos farmacológicos. Por exemplo, um portador de determinado painel de alelos de polimorfismos em genes importantes pode se beneficiar de um tratamento precoce, ou de metas de controle de pressão arterial mais rígidas. Valendo-se dos dados genéticos, o médico poderá decidir pelo uso do melhor fármaco na melhor dose para aquele determinado paciente, minimizando a necessidade da abordagem de tentativa e erro. A genômica trará avanços no entendimento da biologia e da patologia cardiovascular que poderão resultar em novos alvos terapêuticos e novos fármacos. O próprio uso de ácidos nucleicos na forma de terapia gênica, RNAs de interferência ou, quem sabe, até mesmo o sistema CRISPR/Cas9 e outras abordagens poderão ser empregados no tratamento farmacológico dessas doenças. Estamos, hoje, em uma situação análoga àquela do início dos anos de 1970, quando se pensava em como seria fantástico usar um anticorpo para tratar uma doença (hoje é uma realidade, apesar dos custos). Obviamente, há uma série de barreiras a serem superadas além da aquisição do conhecimento que ainda não temos, mas a principal delas ainda é o custo por base analisada (genotipada). Este vem caindo ao longo dos anos (<http://genome.gov/sequencingcosts>), partindo de 10 dólares por base (em 1990), e situando-se pouco abaixo dos 10 mil dólares por genoma hoje. É claro que apenas o ganho de escala com as tecnologias atuais não será capaz de viabilizar o sequenciamento de um genoma a custos suficientemente baixos. Ainda temos um bom caminho até ser desenvolvida alguma técnica cujo custo seja realmente baixo e que permita o sequenciamento de genomas, por exemplo, em neonatos, a título de triagem preditiva (eventualmente, substituindo o teste do pezinho). Não há como negar as inúmeras vantagens e os benefícios que podem advir dos avanços da genômica na medicina. Só não sabemos se estaremos ainda por aqui para vivenciar o pleno uso desses potenciais, e se eles de fato irão revolucionar o tratamento das doenças cardiovasculares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Padmanabhan S, Caulfield M, Dominiczak AE. Genetic and molecular aspects of hypertension. *Circ Res.* 2015;116(6):937-59.
2. Green ED, Guyer MS. Charting a course for genomic medicine from base pairs to bedside. *Nature.* 2011;470(7333):204-13.
3. Rosendorff C, Lackland DT, Allison M, Aronow WS, Black HR, Blumenthal RS, et al. Treatment of hypertension in patients with coronary artery disease: a scientific statement from the American Heart Association, American College of Cardiology, and American Society of Hypertension. *Circulation.* 2015;131(19):e435-70.

4. [VI Brazilian Guidelines on Hypertension]. *Arq Bras Cardiol.* 2010;95(1 Suppl):1-51.
5. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001;409(6822):860-921.
6. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science.* 2001;291(5507):1304-51.
7. Link E, Parish S, Armitage J, Bowman L, Health S, Matsuda F, et al. SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy--a genomewide study. *N Engl J Med.* 2008;359(8):789-99.
8. Hendel A, Bak RO, Clark JT, Kennedy AB, Ryan DE, Roy S, et al. Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nat Biotechnol.* 2015;33(9):985-9.
9. Hale CR, Majumdar S, Elmore J, Pfister N, Compton M, Olson S, et al. Essential features and rational design of CRISPR RNAs that function with the Cas RAMP module complex to cleave RNAs. *Mol Cell.* 2012;45(3):292-302.
10. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol.* 2014;32(4):347-55.
11. Shalem O, Sanjana NE, Zhang F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nat Rev Genet.* 2015;16(5):299-311.
12. Baltimore D, Berg P, Botchan M, Carroll D, Charo RA, Church G, et al. Biotechnology. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science.* 2015;348(6230):36-8.
13. Matouk CC, Marsden PA. Epigenetic regulation of vascular endothelial gene expression. *Circ Res.* 2008;102(8):873-87.
14. Lander ES. Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature.* 2011;470(7333):187-97.
15. 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.
16. Cooke GE, Doshi A, Binkley PF. Endothelial nitric oxide synthase gene: prospects for treatment of heart disease. *Pharmacogenomics.* 2007;8(12):1723-34.
17. Lacchini R, Silva PS, Tanus-Santos JE. A pharmacogenetics-based approach to reduce cardiovascular mortality with the prophylactic use of statins. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2010;106(5):357-61.
18. Salvi E, Kutalik Z, Glorioso N, Benaglio P, Frau F, Kuznetsova T, et al. Genomewide association study using a high-density single nucleotide polymorphism array and case-control design identifies a novel essential hypertension susceptibility locus in the promoter region of endothelial NO synthase. *Hypertension.* 2012;59(2):248-55.
19. Salvi E, Kuznetsova T, Thijs L, Lupoli S, Stolarz-Skrzypek K, D'Avila F, et al. Target sequencing, cell experiments, and a population study establish endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene as hypertension susceptibility gene. *Hypertension.* 2013;62(5):844-52.
20. Miyamoto Y, Saito Y, Nakayama M, Shimasaki Y, Yoshimura T, Harada 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. *Human Mol Gen.* 2000;9(18):2629-37.
21. 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.
22. Nagasaki S, Sertório 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.
23. Luizon MR, Metzger IF, Lacchini R, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism rs3918226 associated with hypertension does not affect plasma nitrite levels in healthy subjects. *Hypertension.* 2012;59(6):e52; author reply e53.
24. 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.
25. 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.
26. Tanus-Santos JE, Desai M, Flockhart DA. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. *Pharmacogenetics.* 2001;11(8):719-25.
27. 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.
28. Tanus-Santos JE, Desai M, Deak LR, Pezullo 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.
29. 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.
30. Thomas GD, Zhang W, Victor RG. Nitric oxide deficiency as a cause of clinical hypertension: promising new drug targets for refractory hypertension. *JAMA.* 2001;285(16):2055-7.
31. Uwabo J, Soma M, Nakayama T, Kanmatsuse K. Association of a variable number of tandem repeats in the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with essential hypertension in Japanese. *Am J Hypertens.* 1998;11(1 Pt 1):125-8.

32. Hyndman ME, Parsons HG, Verma S, Bridge PJ, Edworthy S, Jones C, et al. The T-786-->C mutation in endothelial nitric oxide synthase is associated with hypertension. *Hypertension*. 2002;39(4):919-22.
33. Pereira TV, Rudnicki M, Cheung BM, Baum L, Yamada Y, Oliveira OS, 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.
34. De Miranda JA, Lacchini R, Belo VA, Lanna CM, Sertorio JT, Luizon MR, et al. The effects of endothelial nitric oxide synthase tagSNPs on nitrite levels and risk of hypertension and obesity in children and adolescents. *J Hum Hypertens*. 2015;29(2):109-14.
35. Kato N, Sugiyama T, Morita H, Nabika T, Kurihara H, Yamoti Y, et al. Lack of evidence for association between the endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension. *Hypertension*. 1999;33(4):933-6.
36. Sandrim VC, Coelho EB, Nobre F, Arado GM, Lanchote VL, Tanus-Santos JE. Susceptible and protective eNOS haplotypes in hypertensive black and white subjects. *Atherosclerosis*. 2006;186(2):428-32.
37. 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.
38. Yagil Y, Yagil C. Candidate genes, association studies and haplotype analysis in the search for the genetic basis of hypertension. *J Hypertens*. 2004;22(7):1255-8.
39. Sandrim VC, de Syllos RW, Lisboa HR, Tres GS, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase haplotypes affect the susceptibility to hypertension in patients with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 2006;189(1):241-6.
40. Vasconcellos V, Lacchini R, Jacob-Ferreira AL, Sales ML, Ferreira-Sae MC, Schreiber R, et al. Endothelial nitric oxide synthase haplotypes associated with hypertension do not predispose to cardiac hypertrophy. *DNA Cell Biol*. 2010;29(4):171-6.
41. 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.
42. Sandrim VC, Palei AC, Sertorio JT, Cavalli RC, Duarte G, Tanus-Santos JE. Effects of eNOS polymorphisms on nitric oxide formation in healthy pregnancy and in pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod*. 2010;16(7):506-10.
43. Tempfer CB, Dorman K, Deter RL, O'Brien WE, Gregg AR. An endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2001;20(1):107-18.
44. Serrano NC, Casas JP, Díaz LA, Páez C, Mesa CM, Cifuentes R, et al. Endothelial NO synthase genotype and risk of preeclampsia: a multicenter case-control study. *Hypertension*. 2004;44(5):702-7.
45. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Barlik M, Sieroszewski P, Grzeskowiak E, Mrozikiewicz P. The significance of -786T > C polymorphism of endothelial NO synthase (eNOS) gene in severe preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2011;24(3):432-6.
46. Landau R, Xie HG, Dishy V, Wood AJ, Stein CM, Smiley RM. No association of the Asp298 variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with preeclampsia. *Am J Hypertens*. 2004;17(5 Pt 1):391-4.
47. Dai B, Liu T, Zhang B, Zhang X, Wang Z. The polymorphism for endothelial nitric oxide synthase gene, the level of nitric oxide and the risk for pre-eclampsia: a meta-analysis. *Gene*. 2013;519(1):187-93.
48. Olesen J. Nitric oxide-related drug targets in headache. *Neurotherapeutics*. 2010;7(2):183-90.
49. Eröz R, Bahadır A, Dikici S, Tasdemir S. Association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (894G/T, -786T/C, G10T) and clinical findings in patients with migraine. *Neuromolecular Med*. 2014;16(3):587-93.
50. Borroni B, Rao R, Liberini P, Venturelli E, Cossandi M, Archetti S, et al. Endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) polymorphism is an independent risk factor for migraine with aura. *Headache*. 2006;46(10):1575-9.
51. Toriello M, Oterino A, Pascual J, Castillo J, Colás R, Alonso-Arranz A, et al. Lack of association of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and migraine. *Headache*. 2008;48(7):1115-9.
52. Goncalves FM, Martins-Oliveira A, Speciali JG, Luizon MR, Izidoro-Toledo TC, Silva PS, et al. Endothelial nitric oxide synthase haplotypes associated with aura in patients with migraine. *DNA Cell Biol*. 2011;30(6):363-9.
53. Golden SH, Robinson KA, Saldanha I, Anton B, Ladenson PW. Clinical review: Prevalence and incidence of endocrine and metabolic disorders in the United States: a comprehensive review. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(6):1853-78.
54. Galanakis E, Kofteridis D, Stratigi K, Petraki E, Vazgiourakis V, Fragouli E, et al. Intron 4 a/b polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with both type 1 and type 2 diabetes in a genetically homogeneous population. *Hum Immunol*. 2008;69(4-5):279-83.
55. Mehrab-Mohseni M, Tabatabaei-Malazy O, Hasani-Ranjbar S, Amiri P, Kouroshnia A, Bazzaz JT, et al. Endothelial nitric oxide synthase VNTR (intron 4 a/b) polymorphism association with type 2 diabetes and its chronic complications. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011;91(3):348-52.
56. Jia Z, Zhang X, Kang S, Wu Y. Association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *Endocr J*. 2013;60(7):893-901.

57. Komatsu M, Kawagishi T, Emoto M, Shoji T, Yamada A, Sato K, et al. eNOS gene polymorphism is associated with endothelium-dependent vasodilation in Type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(2):H557-61.
58. Monti LD, Barlassina C, Citterio L, Galluccio E, Berzuini C, Setola E, et al. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms are associated with type 2 diabetes and the insulin resistance syndrome. *Diabetes*. 2003;52(5):1270-5.
59. Bressler J, Pankow JS, Coresh J, Boerwinkle E. Interaction between the NOS3 gene and obesity as a determinant of risk of type 2 diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities study. *PLoS One*. 2013;8(11):e79466.
60. De Syllos RW, Sandrim VC, Lisboa HR, Tres GS, Tanis-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase genotype and haplotype are not associated with diabetic retinopathy in diabetes type 2 patients. *Nitric Oxide*. 2006;15(4):417-22.
61. Podolsky RH, Barbeau P, Kang HS, Zhu H, Treiber FA, Snieder H. Candidate genes and growth curves for adiposity in African- and European-American youth. *Int J Obes*. 2007;31(10):1491-9.
62. Souza-Costa DC, Belo VA, Silva OS, Sertorio JT, Metzger IF, Lanna CM, et al. eNOS haplotype associated with hypertension in obese children and adolescents. *Int J Obes*. 2011;35(3):387-92.
63. Hatzimouratidis K, Amar E, Eardley I, Giuliano F, Hatzichristou D, Montorsi F, et al. Guidelines on male sexual dysfunction: erectile dysfunction and premature ejaculation. *Eur Urol*. 2010;57(5):804-14.
64. Hermans MP, Ahn SA, Rousseau MF. eNOS [Glu298Asp] polymorphism, erectile function and ocular pressure in type 2 diabetes. *Eur J Clin Invest*. 2012;42(7):729-37.
65. Lee YC, Huang SP, Liu CC, Yang YH, Yeh HC, Li WN, et al. The association of eNOS G894T polymorphism with metabolic syndrome and erectile dysfunction. *J Sex Med*. 2012;9(3):837-43.
66. Wang JL, Wang HG, Gao HQ, Zhai GX, Chang P, Chen YG. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and erectile dysfunction: a meta-analysis. *J Sex Med*. 2010;7(12):3889-98.
67. Sinici I, Güven EO, Serefoglu E, Hayran M. T-786C polymorphism in promoter of eNOS gene as genetic risk factor in patients with erectile dysfunction in Turkish population. *Urology*. 2010;75(4):955-60.
68. Muniz JJ, Lacchini R, Rinaldi TO, Nobre YT, Cologna AJ, Martins AC, et al. Endothelial nitric oxide synthase genotypes and haplotypes modify the responses to sildenafil in patients with erectile dysfunction. *Pharmacogenomics J*. 2013;13(2):189-96.
69. 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.
70. Silva PS, Fontana V, Luizoz MR, Lacchini R, Silva WA Jr, Biagi C, et al. eNOS and BDKRB2 genotypes affect the antihypertensive responses to enalapril. *Eur J Clin Pharmacol*. 2013;69(2):167-77.
71. Lacchini R, Tanus-Santos JE. Pharmacogenetics of erectile dysfunction: navigating into uncharted waters. *Pharmacogenomics*. 2014;15(11):1519-38.
72. Peskircioglu L, Atac FB, Erdem SR, Deveci S, Verdi H, Ozkardes H. The association between intron 4 VNTR, E298A and IVF 23+10 G/T polymorphisms of eNOS gene and sildenafil responsiveness in patients with erectile dysfunction. *Int J Impot Res*. 2007;19(2):149-53.
73. Muniz JJ, Lacchini R, Sertório JT, Jordão AA Jr, Nobre YT, Tucci S Jr, et al. Low nitric oxide bioavailability is associated with better responses to sildenafil in patients with erectile dysfunction. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 2013;386(9):805-11.
74. Durante W, Johnson FK, Johnson RA. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34(9):906-11.
75. Pernow J, Jung C. Arginase as a potential target in the treatment of cardiovascular disease: reversal of arginine steal? *Cardiovasc Res*. 2013;98(3):334-43.
76. Masuda H. Significance of nitric oxide and its modulation mechanisms by endogenous nitric oxide synthase inhibitors and arginase in the micturition disorders and erectile dysfunction. *Int J Urol*. 2008;15(2):128-34.
77. Nelin LD, Wang X, Zhao Q, Chicoine LG, Young TL, Hatch DM, et al. MKP-1 switches arginine metabolism from nitric oxide synthase to arginase following endotoxin challenge. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;293(2):C632-40.
78. Munder M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br J Pharmacol*. 2009;158(3):638-51.
79. Thengchaisri N, Hein TW, Wang W, Xu X, Li Z, Fossum TW, et al. Upregulation of arginase by H₂O₂ impairs endothelium-dependent nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(9):2035-42.
80. Sankaralingam S, Xu H, Davidge ST. Arginase contributes to endothelial cell oxidative stress in response to plasma from women with preeclampsia. *Cardiovasc Res*. 2010;85(1):194-203.
81. Chandra S, Romero MJ, Shatanawi A, Alkilany AM, Caldwell RB, Caldwell RW. Oxidative species increase arginase activity in endothelial cells through the RhoA/Rho kinase pathway. *Br J Pharmacol*. 2012;165(2):506-19.
82. Prieto CP, Krause BJ, Quezada C, San Martin R, Sobrevia L, Casanello P. Hypoxia-reduced nitric oxide synthase activity is partially explained by higher arginase-2 activity and cellular redistribution in human umbilical vein endothelium. *Placenta*. 2011;32(12):932-40.

83. Chen B, Calvert AE, Cui H, Nelin LD. Hypoxia promotes human pulmonary artery smooth muscle cell proliferation through induction of arginase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009;297(6):L1151-9.
84. Toque HA, Romero MJ, Tostes RC, Shatanawi A, Chandra S, Carneiro ZN, et al. p38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) increases arginase activity and contributes to endothelial dysfunction in corpora cavernosa from angiotensin-II-treated mice. *J Sex Med.* 2010;7(12):3857-67.
85. Quitter F, Figulla HR, Ferrari M, Pernow J, Jung C. Increased arginase levels in heart failure represent a therapeutic target to rescue microvascular perfusion. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2013;54(1):75-85.
86. Porembaska Z, Kedra M. Early diagnosis of myocardial infarction by arginase activity determination. *Clin Chim Acta.* 1975;60(3):355-61.
87. Ogino K, Takahashi N, Takigawa T, Obase Y, Wang DH. Association of serum arginase I with oxidative stress in a healthy population. *Free Radic Res.* 2011;45(2):147-55.
88. Kashyap SR, Lara A, Zhang R, Park YM, DeFronzo RA. Insulin reduces plasma arginase activity in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2008;31(1):134-9.
89. Ryo S, Lemmon CA, Soucy KG, Gupta G, White AR, Nyhan D, et al. Oxidized low-density lipoprotein-dependent endothelial arginase II activation contributes to impaired nitric oxide signaling. *Circ Res.* 2006;99(9):951-60.
90. Romero MJ, Platt DH, Tawfik HE, Labazi M, El-Remessy AB, Bartoli M, et al. Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity. *Circ Res.* 2008;102(1):95-102.
91. Bivalacqua TJ, Hellstrom WJ, Kadowitz PJ, Champion HC. Increased expression of arginase II in human diabetic corpus cavernosum: in diabetic-associated erectile dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;283(4):923-7.
92. Li H, Romieu I, Sienra-Monge JJ, Ramirez-Aguilar M, Estela Del Rio-Navarro B, Kistner EO, et al. Genetic polymorphisms in arginase I and II and childhood asthma and atopy. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117(1):119-26.
93. Vonk JM, Postma DS, Maarsingh H, Bruinenberg M, Koppelman GH, Meurs H. Arginase 1 and arginase 2 variations associate with asthma, asthma severity and beta2 agonist and steroid response. *Pharmacogenet Genomics.* 2010;20(3):179-86.
94. Salam MT, Bastain TM, Rappaport EB, Islam T, Berhane K, Gauderman WJ, et al. Genetic variations in nitric oxide synthase and arginase influence exhaled nitric oxide levels in children. *Allergy.* 2011;66(3):412-9.
95. Meroufel D, Dumont J, Médiène-Benchekor S, Benhammamouch S, Ducimetière P, Cottel D, et al. Characterization of arginase 1 gene polymorphisms in the Algerian population and association with blood pressure. *Clin Biochem.* 2009;42(10-11):1178-82.
96. Dumont J, Zureik M, Cottel D, Montaye M, Ducimetière P, Amouyel P, et al. Association of arginase 1 gene polymorphisms with the risk of myocardial infarction and common carotid intima media thickness. *J Med Genet.* 2007;44(8):526-31.
97. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(6):789-91.
98. Holmes DI, Zachary I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biol.* 2005;6(2):209.
99. Giordano FJ, Gerber HP, Williams SP, VanBruggen N, Bunting S, Ruiz-Lozano P, et al. A cardiac myocyte vascular endothelial growth factor paracrine pathway is required to maintain cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(10):5780-5.
100. Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ. VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol.* 1998;274(3 Pt 2):H1054-8.
101. Van Der Zee R, Murohara T, Luo Z, Zollmann F, Passeri J, Lekutat C, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation.* 1997;95(4):1030-7.
102. Lin CS, Ho HC, Chen KC, Lin G, Nunes L, Lue TF. Intracavernosal injection of vascular endothelial growth factor induces nitric oxide synthase isoforms. *BJU Int.* 2002;89(9):955-60.
103. Shen BQ, Lee DY, Zioncheck TF. Vascular endothelial growth factor governs endothelial nitric-oxide synthase expression via a KDR/Flk-1 receptor and a protein kinase C signaling pathway. *J Biol Chem.* 1999;274(46):33057-63.
104. Musicki B, Kramer MF, Becker RE, Burnett AL. Inactivation of phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (Ser-1177) by O-GlcNAc in diabetes-associated erectile dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(33):11870-5.
105. Musicki B, Kramer MF, Becker RE, Burnett AL. Age-related changes in phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in the rat penis. *J Sex Med.* 2005;2(3):347-55; discussion 355-7.
106. Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, et al. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet.* 2003;34(4):383-94.
107. Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson IV, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(1):260-4.
108. Sandrim VC, Palei AC, Cavalli RC, Araújo 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.
109. Goncalves FM, Martins-Oliveira A, Speciali JG, Izidoro-Toledo TC, Luizon MR, Dach F, et al. Vascular endothelial growth factor genetic polymorphisms and haplotypes in women with migraine. *DNA Cell Biol.* 2010;29(7):357-62.

110. Lacchini R, Luizon MR, Gasparini S, Ferreira-Sae MC, Schreiber R, Nadruz W Jr, et al. Effect of genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor on left ventricular hypertrophy in patients with systemic hypertension. *Am J Cardiol.* 2014;113(3):491-6.
111. Belo VA, Souza-Costa DC, Luizon MR, Izidoro-Toledo TC, Lanna CM, Pinheiro LC, et al. Vascular endothelial growth factor haplotypes associated with childhood obesity. *DNA Cell Biol.* 2011;30(9):709-14.
112. Howell WM, Ali S, Rose-Zerilli MJ, Ye S. VEGF polymorphisms and severity of atherosclerosis. *J Med Genet.* 2005;42(6):485-90.
113. Biselli PM, Guerzoni AR, de Godoy MF, Pavarino-Bertelli EC, Goloni-Bertollo EM. Vascular endothelial growth factor genetic variability and coronary artery disease in Brazilian population. *Heart Vessels.* 2008;23(6):371-5.
114. Bouras G, Defereos S, Tousoulis D, Giannopoulos G, Chatzis G, Tsounis D, et al. Asymmetric Dimethylarginine (ADMA): a promising biomarker for cardiovascular disease? *Curr Top Med Chem.* 2013;13(2):180-200.
115. Pope AJ, Karupiah K, Cardounel AJ. Role of the PRMT-DDAH-ADMA axis in the regulation of endothelial nitric oxide production. *Pharmacol Res.* 2009;60(6):461-5.
116. Kielstein JT, Bode-Böger SM, Klein G, Graf S, Haller H, Fliser D. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors and renal perfusion in patients with heart failure. *Eur J Clin Invest.* 2003;33(5):370-5.
117. Tutarel O, Denecke A, Bode-Böger SM, Martens-Lobenhoffer J, Lovric S, Bauersachs J, et al. Asymmetrical dimethylarginine--more sensitive than NT-proBNP to diagnose heart failure in adults with congenital heart disease. *PLoS One.* 2012;7(3):e33795.
118. Yang L, Xiufen Q, Shugin S, Yang Y, Ying S, Yanwei Y, et al. Asymmetric dimethylarginine concentration and recurrence of atrial tachyarrhythmias after catheter ablation in patients with persistent atrial fibrillation. *J Interv Card Electrophysiol.* 2011;32(2):147-54.
119. Tousoulis D, Bouras G, Antoniadou C, Marinou K, Papageorgiou N, Miliou A, et al. Methionine-induced homocysteinemia impairs endothelial function in hypertensives: the role of asymmetrical dimethylarginine and antioxidant vitamins. *Am J Hypertens.* 2011;24(8):936-42.
120. Teerlink T. ADMA metabolism and clearance. *Vasc Med.* 2005;(10 Suppl 1):S73-81.
121. Anderssohn M, McLachlan S, Lüneburg N, Robertson C, Schwedhelm E, Williamson RM, et al. Genetic and environmental determinants of dimethylarginines and association with cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2014;37(3):846-54.
122. Seppala I, Kleber ME, Lyytikäinen LP, Hernessniemi JA, Mäkelä KM, Oksala N, et al. Genome-wide association study on dimethylarginines reveals novel AGXT2 variants associated with heart rate variability but not with overall mortality. *Eur Heart J.* 2014;35(8):524-31.
123. Abhary S, Burdon KP, Kuot A, Javadiyan S, Whiting MJ, Kasmeridis N, et al. Sequence variation in DDAH1 and DDAH2 genes is strongly and additively associated with serum ADMA concentrations in individuals with type 2 diabetes. *PLoS One.* 2010;5(3):e9462.
124. Krzyzanowska K, Mittermayer F, Wolzt M, Scherthaner G. Asymmetric dimethylarginine predicts cardiovascular events in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2007;30(7):1834-9.
125. Lu TM, Chung MY, Lin MW, Hsu CP, Lin SJ. Plasma asymmetric dimethylarginine predicts death and major adverse cardiovascular events in individuals referred for coronary angiography. *Int J Cardiol.* 2011;153(2):135-40.
126. Boger RH, Sullivan LM, Schwedhelm E, Wang TJ, Maas R, Benjamin EJ, et al. Plasma asymmetric dimethylarginine and incidence of cardiovascular disease and death in the community. *Circulation.* 2009;119(12):1592-600.
127. Ding H, Wu B, Wang H, Lu Z, Yan J, Wang X, et al. A novel loss-of-function DDAH1 promoter polymorphism is associated with increased susceptibility to thrombotic stroke and coronary heart disease. *Circ Res.* 2010;106(6):1145-52.
128. Boesen EI. Endothelin receptors, renal effects and blood pressure. *Curr Opin Pharmacol.* 2005;21:25-34.
129. Krum H, Viskoper RJ, Lacourciere Y, Budde M, Charlton V. The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. *Bosentan Hypertension Investigators. N Engl J Med.* 1998;338(12):784-90.
130. Nakov R, Pfarr E, Eberle S. Darusentan: an effective endothelinA receptor antagonist for treatment of hypertension. *Am J Hypertens.* 2002;15(7 Pt 1):583-9.
131. Calabro P, Limongelli G, Maddaloni V, Vizza CD, D'Alto M, D'Alessandro R, et al. Analysis of endothelin-1 and endothelin-1 receptor A gene polymorphisms in patients with pulmonary arterial hypertension. *Intern Emerg Med.* 2012;7(5):425-30.
132. Yasuda H, Kamide K, Takiuchi S, Matayoshi T, Hanada H, Kada A, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in endothelin family genes with the progression of atherosclerosis in patients with essential hypertension. *J Hum Hypertens.* 2007;21(11):883-92.
133. Chatsuriyawong S, Gozal D, Kheirandish-Goza L, Bhattacharjee R, Khalyfa AA, Wang Y, et al. Genetic variance in nitric oxide synthase and endothelin genes among children with and without endothelial dysfunction. *J Transl Med.* 2013;11:227.
134. Banno M, Hanada H, Kamide K, Kokubo Y, Kada A, Yang J, et al. Association of genetic polymorphisms of endothelin-converting enzyme-1 gene with hypertension in a Japanese population and rare missense mutation in preproendothelin-1 in Japanese hypertensives. *Hypertens Res.* 2007;30(6):513-20.

135. Turner ST, Boerwinkle E, O'Connell JR, Bailey KR, Gong Y, Chapman AB, et al. Genomic association analysis of common variants influencing antihypertensive response to hydrochlorothiazide. *Hypertension*. 2013;62(2):391-7.
136. Kansas, G. S. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*, v. 88, n. 9, p. 3259-87, Nov 1 1996. ISSN 0006-4971 (Print)
137. Liu F, He J, Gu D, Rao DC, Huang J, Hixson JE, et al. Associations of Endothelial System Genes With Blood Pressure Changes and Hypertension Incidence: The GenSalt Study. *Am J Hypertens*. 2015;28(6):780-8.
138. Sass C, Pallaud C, Zannad F, Visvikis S. Relationship between E-selectin L/F554 polymorphism and blood pressure in the Stanislas cohort. *Hum Genet*. 2000;107(1):58-61.
139. Lesko LJ, Zineh I. DNA, drugs and chariots: on a decade of pharmacogenomics at the US FDA. *Pharmacogenomics*. 2010;11(4):507-12.
140. Collins FS. Statement on NIH funding of research using geneediting technologies in human embryos. [Internet] [Acesso em 20 Jun 2016]. Disponível em: http://www.nih.gov/about/director/04292015_statement_gene_editing_technologies.htm >.
141. Watson J. Statement by James D Watson. *The New York Times*. [Internet] [Acesso em 20 Jun 2016]. Disponível em: < http://www.nytimes.com/2007/10/25/science/26wattext.html?_r=0
142. Crick F. On the Genetic Code - Nobel Lecture. [Internet] [Acesso em 20 Jun 2016]. Disponível em: < http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1962/crick-lecture.html

