

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

**ALINE SALDANHA MARRONI**

**Diferenças étnicas na distribuição de variantes genéticas da  
sintase endotelial do óxido nítrico**

**Campinas- SP**

**2006**

**ALINE SALDANHA MARRONI**

**Diferenças étnicas na distribuição de variantes genéticas da  
sintase endotelial do óxido nítrico**

Dissertação apresentada  
à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas  
da Universidade Estadual de Campinas  
para a obtenção do título de Mestre  
em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Campinas- SP  
2006



## Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

**Orientador:**

**Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos**

**Membros:**

**Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos**

**Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior**

**Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga**

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

**Data: 18/01/2006**

***À minha mãe Neusa  
e à minha irmã Simone  
por serem as pessoas que mais amo  
e por todo o apoio e compreensão  
que me concederam até aqui***

## **Agradecimentos**

*Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.*

*Ao Prof. Dr. José Eduardo, sou eternamente grata pela orientação e incentivo, e principalmente pela paciência e compreensão.*

*A todos os Prof. da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela contribuição na minha formação.*

*Aos meus parceiros de laboratório: Débora, Ingrid e Sabrina, sem o qual este projeto não teria se realizado.*

*A Débora e Ingrid pelos ensinamentos no início dos meus experimentos, muito obrigada!*

*A todos os colegas do laboratório.*

*Aos voluntários que aceitaram participar desse estudo, obrigada pela disposição e*

*reconhecimento da importância desse trabalho.*

*À CNPQ pelo apoio financeiro.*

*A minha mãe Neusa, irmãs Lílian e Simone, e minha sobrinha Lorena, pelo carinho, apoio e companheirismo ao longo desses anos, amo muito vocês.*

*Temos, todos que vivemos,  
Uma vida que é vivida  
E outra vida que é pensada,  
E a única vida que temos  
É essa que é dividida  
Entre a verdadeira e a errada.  
(Fernando Pessoa)*

# ***RESUMO***

## Resumo

O óxido nítrico (NO) é um gás solúvel com importantes papéis fisiológicos. Alterações na biodisponibilidade de NO contribuem para o desenvolvimento de vários estados fisiopatológicos, tais como hipertensão arterial, aterosclerose, doença coronariana e hipertensão pulmonar. A importância do NO no controle cardiovascular levou a estudos visando avaliar se polimorfismos do gene da eNOS estão associados com doenças cardiovasculares. Três polimorfismos de interesse clínico do gene da eNOS têm sido estudados: T -786C na região promotora, 4a/4b no íntron 4 e Glu298Asp no éxon 7. Diversos estudos têm apresentado resultados contraditórios sobre a associação desses polimorfismos com doenças cardiovasculares. Demonstrou-se que numa população dos EUA, estas variantes genéticas apresentam acentuada diferença étnica em sua distribuição. Não se sabe se na população brasileira ocorrem essas mesmas diferenças étnicas na distribuição de variantes da eNOS observadas na população americana. O objetivo desse trabalho foi avaliar a frequência desses polimorfismos em voluntários diferentes etnicamente (136 negros e 154 brancos) na população brasileira. Também foi estimada a frequência haplotípica e a associação entre os variantes genéticos. A amplificação do DNA genômico foi feita por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) e os genótipos foram determinados por eletroforese em gel de poliacrilamida. O variante Asp298 foi mais comum em brancos (32.8%) que em negros (15.1%)( $P < 0.004$ ). De modo similar, o variante C-786 foi mais comum em brancos (41.9%) que em negros (19.5%)( $P < 0.0004$ ). Já o variante 4a foi mais comum em negros (32%) que em brancos (17.9%)( $P < 0.003$ ). O haplótipo mais comum em ambos grupos étnicos era aquele que combinava os variantes



comuns. O segundo haplótipo mais comum em negros incluía o variante 4a e os variantes não polimórficos para os outros dois polimorfismos. Nos indivíduos brancos, entretanto, o segundo haplótipo mais comum incluía os variantes Asp298 e C-786 e o variante comum para o polimorfismo do íntron. Essa acentuada diferença é similar àquela demonstrada na população americana. Esses achados sugerem haver uma consistente diferença interétnica na distribuição desses variantes genéticos da eNOS em negros e brancos da população brasileira. Essas diferenças podem estar associadas às disparidades étnicas observadas com relação às doenças cardiovasculares e resposta a drogas.

# ***ABSTRACT***

## Abstract

Nitric oxide (NO) is a soluble gas with fundamental physiologic role. Alterations in NO bioavailability contribute to the development of many diseases such as hypertension, atherosclerosis, coronary artery disease and pulmonary hypertension. The pivotal role of NO in the regulation of the cardiovascular system has motivated studies to assess whether polymorphisms in the eNOS gene are associated with cardiovascular diseases. Three specific polymorphisms in the eNOS gene have been widely studied : T-786C in the promoter region, 4a/4b in intron 4 and Glu298Asp in exon 7. Several studies have associated inconsistently these polymorphisms with cardiovascular diseases. In an American population these variants show interethnic differences in their distribution. However, we don't know whether there are the same differences in the Brazilian population. To test this possibility, we examined the distribution of genetic variants in 136 black and 154 white subjects from a Brazilian population. We also estimated the haplotype frequency, and evaluated associations between these variants. The Asp298 variant was more common in whites (32.8 %) than in blacks (15.1%)( $P < 0.004$ ). Similarly, the C<sup>-786</sup> variant was more common in whites (41.9%) than in blacks (19.5%)( $P < 0.0004$ ). However, the 4a variant was more common in blacks (32.0%) than in whites (17.9%)( $P < 0.003$ ). The most common predicted haplotype in both ethnic groups combined only wild type variants. While the second most common haplotype in blacks includes the variant 4a and the wild-type variants for the remaining polymorphisms, the second most common haplotype in whites includes the variants Asp298 and C<sup>-786</sup> and the wild-type variant for polymorphism in intron 4. The marked interethnic differences that we found in Brazilians are very

similar to that previously reported in Americans. These findings strongly suggest a consistent difference in the distribution of eNOS genetic variants in blacks compared with whites in Brazilian population. These findings may explain in part the ethnic disparities in cardiovascular risk and response to drugs.

## Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

- Arg**-arginina
- BH4**- tetrahidrobiopterina
- BP**- pressão sanguínea
- cAMP**- adenosina monofosfato cíclica
- DNA**- ácido desoxirribonucléico
- EcSOD**- superóxido dismutase extracelular
- eNOS**-sintetase endotelial do óxido nítrico
- GMPc**- guanosina monofosfato cíclica
- iNOS**- sintetase induzida do óxido nítrico
- L-OHArg**- N- hydroxy-L-arginina
- MLCK**- quinase miosina de cadeia leve
- mRNA**- ácido ribonucléico mensageiro
- NO**- óxido nítrico
- NOS**- sintases do óxido nítrico
- nNOS**- sintetase neuronal do óxido nítrico
- PKA**- proteína kinase A
- PKG**- proteína kinase G
- ROS**- espécie reativa de oxigênio
- SNP**- polimorfismo de base única
- SOD**- superóxido dismutase
- VCAM-1**- molécula de adesão da célula vascular
- VNTR**- número variável de repetições em sequência

## Sumário

<b>RESUMO</b> .....	07
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS</b> .....	13
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1- O sistema do óxido nítrico (NO).....	16
1.1.1- Síntese celular do NO.....	16
1.1.2- Sinalização intracelular do NO.....	17
1.1.3- Importância do NO no sistema cardiovascular.....	18
1.1.3.1- Efeitos vasodilatadores do NO.....	18
1.1.3.2- Efeitos antiplaquetários do NO.....	19
1.1.3.3- Efeitos antiadesivos do NO.....	19
1.1.3.4- Efeitos antiproliferativos do NO.....	20
1.1.3.5- Efeitos antioxidativos do NO.....	20
1.2- A sintase endotelial do NO (eNOS).....	21
1.2.1- Estrutura e localização.....	21
1.2.2- O que são polimorfismos genéticos e sua importância para a farmacologia.....	23
1.2.3- A eNOS exibe polimorfismos clinicamente relevantes.....	24
1.2.4- Polimorfismos da eNOS e implicações funcionais.....	25
1.2.5- A relação entre os polimorfismos da eNOS e doenças cardiovasculares.....	25
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	28
<b>3- CAPÍTULO</b> .....	30
<b>4- DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>5- CONCLUSÕES</b> .....	43
<b>6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	49

# ***INTRODUÇÃO***

## 1- INTRODUÇÃO

### 1.1- *O sistema do óxido nítrico*

#### 1.1.1- Síntese celular do óxido nítrico

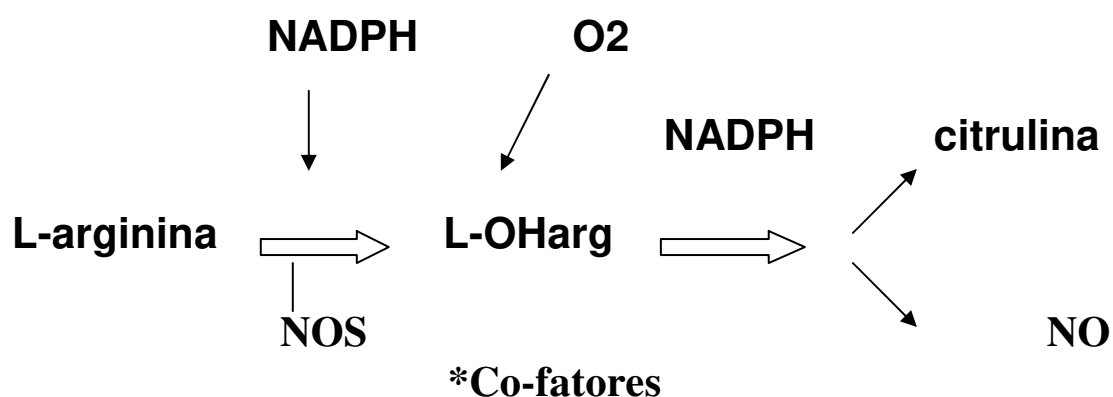
O óxido nítrico (NO) é um gás solúvel utilizado em várias funções de sinalização celular e intracelular, incluindo regulação da pressão sanguínea, transmissão de sinal neuronal, citotoxicidade contra patógenos e tumores e coordenação do ritmo cardíaco (MONCADA & HIGGS, 1993).

O NO é sintetizado pelas sintases do óxido nítrico (NOS), isoenzimas presentes em vários tipos de células. Há dois tipos de NOS identificados atualmente: duas formas constitutivas (cNOS) e uma forma induzida por citocinas e outras substâncias (iNOS). Há dois subtipos de cNOS: uma foi detectada inicialmente no endotélio vascular e é chamada de NOS endotelial (eNOS) e a outra se encontra nos sistemas nervoso central e periférico e constitui a NOS neuronal (nNOS) (MONCADA & HIGGS, 1995; MONCADA *et. al.*, 1997).

A síntese do NO ocorre em duas etapas e é dependente de vários co-fatores como tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>), NADPH e oxigênio. Na primeira etapa da reação ocorre a formação de L-OHArg pela oxigenação da L-Arginina e no segundo passo ocorre uma clivagem da ligação C=N da L-OHArg levando à formação de citrulina e NO. (MONCADA *et. al.*, 1991).



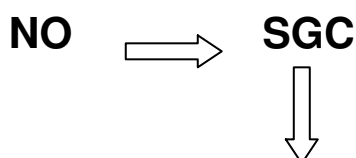
### Desenho esquemático da síntese do NO

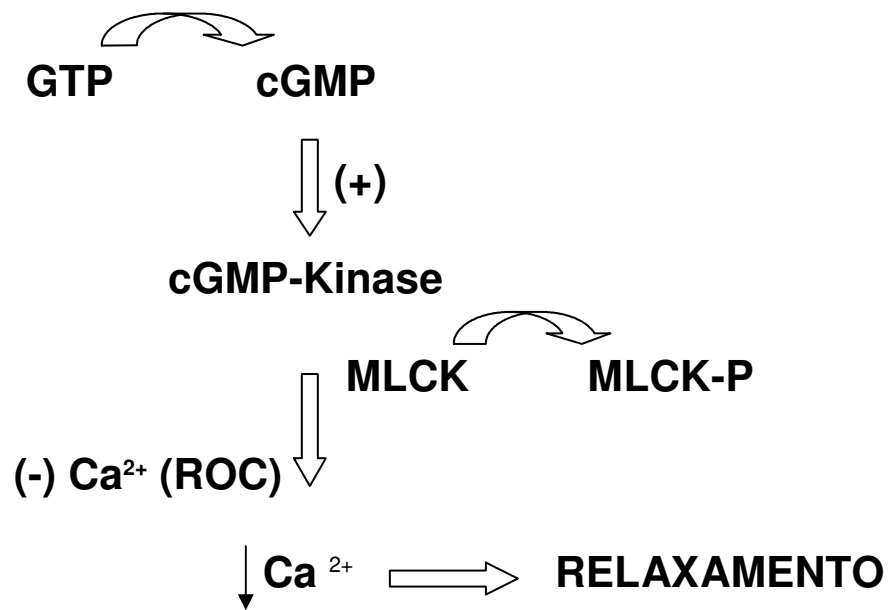


#### 1.1.2- Sinalização intracelular do NO

O NO liberado ativa a guanilato ciclase solúvel em células musculares lisas, plaquetas, neurônios, e outras células, aumentando os níveis de um mensageiro cíclico intracelular (GMPc) (IGNARRO & KADOWITS, 1985). O receptor endógeno para o NO é provavelmente o grupo heme da guanilato ciclase. (IGNARRO, 1992). O aumento de GMPc causa relaxamento das células musculares lisas por diferentes mecanismos que levam a uma redução de Ca<sup>2+</sup> livre intracelular, como a inibição da entrada de Ca<sup>2+</sup> através de canais de Ca<sup>2+</sup> e ativação da proteína quinase, a qual fosforila a quinase de cadeia leve-miosina (MLCK) (IGNARRO, 1989).

### Desenho esquemático da sinalização do NO





### 1.1.3- Importância do óxido nítrico para o sistema cardiovascular

#### 1.1.3.1- Efeitos vasodilatadores do NO

A vasodilatação é a mais importante atividade conhecida do NO no sistema cardiovascular. Estudos recentes mostram que a produção endógena do NO está envolvida na regulação do tônus vasomotor local e da pressão sanguínea. A inibição da síntese do NO endógeno induz aumentos na pressão sanguínea (HUANG *et. al.*, 1995). Pressão sanguínea (BP) elevada é um conhecido fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como acidente vascular cerebral e infarto de miocárdio, enquanto uma redução na BP é efetiva na redução da mortalidade e morbidade em doenças cardiovasculares (KANDEL *et. al.*, 2000). Assim, a manutenção de uma BP

normal pelo NO endotelial pode ser considerada como um dos efeitos protetores do NO.

### **1.1.3.2- Efeitos antiplaquetários do NO**

As plaquetas desempenham um papel vital na homeostase vascular. No processo de aterosclerose freqüentemente ocorre hiperatividade das plaquetas, o que pode levar a trombose, infarto de miocárdio e acidente vascular cerebral. (RADOMSKI & MONCADA, 1993). O NO parece inibir a agregação plaquetária por mecanismos similares aos da vasodilatação (TREPAKOVA *et. al.*, 1999).

Estudos demonstram que o NO e doadores de NO estimulam a produção de cGMP em plaquetas humanas levando a ativação do PKG e inibição da agregação plaquetária (BENJAMIM *et. al.*, 1991; MORO *et. al.*, 1996).

### **1.1.3.3- Efeitos antiadesivos do NO**

O aumento da adesão dos leucócitos é uma importante etapa na patogênese da aterosclerose (ROSS, 1999).

A adesão leucocitária depende da expressão de várias moléculas de adesão na superfície celular das células endoteliais. É provável que essa expressão ocorra como consequência do aumento do estresse oxidativo vascular (KUNSH & MEDFORD, 1999). Os monócitos, os quais aderem às células vasculares, migram para dentro da parede vascular e aumentam o estresse oxidativo pela liberação de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROSS, 1999). Assim, a redução da expressão de moléculas de

adesão ou inibição da função de moléculas de adesão são consideradas como estratégias vasoprotetoras que reduzem a progressão da injúria vascular.

O NO é um importante mediador endógeno que inibe a adesão leucocitária . Um estudo feito por KHAN *et. al.*, 1996, mostrou que o NO inibe a expressão da molécula de adesão da célula vascular (VCAM-1), enquanto outro trabalho demonstrou que a inibição da síntese endógena de NO promove aumento da adesão leucocitária (NIU *et. al.*, 1994).

#### **1.1.3.4- Efeitos antiproliferativos do NO**

A proliferação das células musculares lisas desempenha um papel chave na lesão dos vasos sanguíneos. Nesse processo, as células musculares lisas da vasculatura mostram alterações em sua função como o desaparecimento da atividade contrátil. Essas alterações incluem perda das miofibrilas e geração de proteínas de matriz (ROSS, 1991).

O NO gerado pelo endotélio vascular tem mostrado inibir a proliferação da musculatura lisa (NAKAKI *et. al.*, 1990), porém o mecanismo subjacente a esse efeito antiproliferativo não é totalmente compreendido. Tem sido sugerido que um mecanismo de ativação da proteína kinase A pode contribuir (TANNER *et. al.* 2000).

#### **1.1.3.5- Efeitos antioxidativos do NO**

O estresse oxidativo vascular contribui para a fisiopatologia de doenças cardiovasculares. Entre as várias espécies oxigênio reativas formadas nessas condições, o superóxido é a mais importante (KODJA & HARRISON, 1999). O mais conhecido efeito antioxidativo do NO ocorre por redução da oxidação de

lipídeos. O NO pode potencialmente inibir a oxidação de ácidos graxos livres , fosfatidilcolina e partículas de lipoproteínas de baixa densidade. Considerando o efeito proaterogênico de lipídeos oxidantes, esta atividade antioxidativa do NO é de grande relevância (BONINI & AUGUSTO, 2001).

Outro efeito antioxidante do NO se dá pela indução da dismutase superóxido extracelular (ecSOD) (FUKAI *et. al.*, 2000). Na parede da vasculatura, aproximadamente 40% da superóxido dismutase é um tipo de enzima extracelular e a regulação de sua expressão representa um mecanismo importante que previne a degradação do NO endotelial mediada por superóxidos . Do mesmo modo, a formação de peroxinitrito será reduzida, porque altos níveis de superóxido dismutase favorecem a dismutação de superóxido a peróxido de hidrogênio (KOPPENOL, 1999)

## **1.2. - A sintetase endotelial do NO (eNOS)**

### **1.2.1- Estrutura e localização**

A eNOS é um dímero que consiste de dois monômeros idênticos de 134 kD O gene que codifica os monômeros da eNOs é localizado no cromossomo 7 na posição q35-36 e contém 26 exons e 21 kB de extensão (ÉSTER *et. al.*, 2003).

Os monômeros de eNOS têm dois diferentes domínios, um domínio oxigenase N-terminal (1 a 491 aminoácidos) que contém o sítio catalítico e um domínio redutase C-terminal (492-1205 a.a.) (HEMMENS & MAYER, 1999). O domínio redutase tem sítios de ligação para NADPH, flavinas e calmodulina (CaM), e transfere elétrons via flavinas ao grupo heme ligado ao domínio



### **1.2.2- O que são polimorfismos genéticos e sua importância para a farmacologia**

Variações genéticas que ocorrem com frequência mínima de 1% na população são denominadas polimorfismos. Embora inserções e deleções da seqüência de DNA não sejam freqüentes, substituições de um único nucleotídeo (denominado polimorfismo de nucleotídeo único ou SNPs) são o tipo mais comum de variação genética inter-individual. SNPs são variantes da seqüência de DNA, provavelmente resultantes de erros de replicação, no qual um nucleotídeo é substituído por outro, tipicamente transições de purina para purina (ex, A em substituição de G), ou de piridimina para piridimina (C-T) (DORIS, 2001; WANG *et. al.*, 1998). Os SNPs são muito comuns e aqueles de alta frequência alélica podem ocorrer a cada 1000 pares de bases. Recentemente foi identificada a existência de mais de 1,42 milhões de SNPs (SACHIDANADAM *et. al.*, 2001). Assim, particular interesse tem sido despertado com relação ao significado desses polimorfismos em genes de interesse clínico.

Um polimorfismo que ocorre na região codificadora do gene pode resultar em uma alteração qualitativa na estrutura da proteína (e na sua função) se o SNP codificador levar a alteração de um aminoácido específico. Esse tipo de SNP é denominado como SNP “nonsynonymous”. Tem sido estimado que no mínimo 20 a 30 % de SNPs “nonsynonymous” podem resultar em uma função alterada da proteína (SUNYAEV *et al.*, 2001; NG & HEIKOFF, 2002). Entretanto, polimorfismos que ocorrem em regiões não codificadoras do DNA também podem ser importantes, como os SNPs presentes na região promotora

do gene, a qual tem um papel fundamental na regulação da expressão gênica (DRYSDALE *et. al.*, 2000). Além disso, SNPs marcadores podem ocorrer em desequilíbrio de ligação com outros funcionais. Assim, alterações ainda não identificadas nos genes podem representar marcadores genéticos potencialmente úteis para estágios de doenças e resposta à drogas (CADMAN & O'CONNOR, 2003).

### **1.2.3- A eNOS exhibe polimorfismos clinicamente relevantes**

O gene da eNOS apresenta 13 polimorfismos conhecidos atualmente. Estes polimorfismos estão presentes na região promotora (SNPs nas posições -786, -924 e -1474) (NAKAYAMA *et. al.*, 1999; POIRIER *et. al.*, 1999), na região codificadora do DNA (C774T, G894T e Glu298Asp) (YOSHIMURA *et. al.*, 1998) e 5 nos íntrons 2, 11, 22 e 23 (POIRIER *et. al.*, 1999). Existe também um VNTR de 27 pares de bases no íntron 4 e uma repetição de CA no íntron 13 (MARSDEN *et. al.*, 1993).

Entretanto, três polimorfismos genéticos do gene da eNOS tem sido mais amplamente estudados: um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) na região promotora (T-786C), um SNP no éxon 7 e um número variável de bases que se repetem (VNTR) no íntron 4 (NADAND *et. al.*, 1994). O polimorfismo T-786C que ocorre na região 5` (promotora) do gene da eNOS resulta da substituição de um nucleotídeo de timidina por um de citosina (T-786 →C) na posição -786 deste gene (NAKAYAMA *et. al.*, 1999). Na seqüência dos 27 pares de bases que se repetem no íntron 4, dois alelos, um alelo comum maior e um alelo menor tem sido mais comumente encontrados. O alelo maior (alelo eNOS 4b) designado "inserção b" tem cinco repetições dos pares de bases; já



no alelo menor (eNOS4a), a seqüência dos 27 pares de bases se repete quatro vezes no intron 4. O SNP G894T localizado no exon 7 leva a uma alteração de um aminoácido, ou seja, ocorre uma substituição do ácido glutâmico pelo ácido aspártico no resíduo aminoácido 298 (Glu298Asp) (YOON *et. al.*, 2000).

#### **1.2.4 - Polimorfismos da eNOS e implicações funcionais**

Diversos estudos tem sido conduzidos para saber se os polimorfismos T-786 C, 4 a/4b e Glu298Asp do gene da eNOS afetam a expressão e atividade dessa enzima. Há evidências na literatura mostrando que a redução na expressão e atividade da eNOs, e provavelmente uma redução na produção de NO sejam significativamente associados com a mutação C (-786C) do polimorfismo T-786C da região promotora da eNOs. NAKAYAMA *et. al.*, 1999, mostraram que o polimorfismo T-786C pode reduzir a atividade da região promotora do gene da eNOS em aproximadamente 50% ,o que evidencia um possível importante papel fisiológico desse polimorfismo. Não há estudos mostrando evidências que expliquem como o polimorfismo do intron 4 altera a expressão ou a atividade da eNOS e as evidências são controversas a respeito do prejuízo da função enzimática como resultado do polimorfismo do exon 7 (TESAURO *et. al.*, 2000; FAIRCHILD *et. al.*, 2001).

#### **1.2.5- A relação entre os polimorfismos da eNOs e doenças cardiovasculares**

Embora evidências experimentais apontem para uma alteração funcional e possível relevância dos polimorfismos da eNOS em doenças cardiovasculares, estudos feitos em diferentes populações têm mostrado

associações controversas entre esses polimorfismos e doenças cardiovasculares.

Por exemplo, o SNP T-786C da região promotora esteve associado com predisposição a infarto de miocárdio (NAKAYAMA *et. al.*, 1998; YOSHIMURA *et. al.*, 2000) na população japonesa, porém o mesmo dado não foi confirmado em outros estudos feitos com populações de caucasianos na França (POIRIER *et. al.*, 1999) ou na Austrália (SIM *et. al.*, 1998). Discrepâncias também têm sido encontradas em estudos envolvendo o polimorfismo Glu298Asp no exon 7 e a incidência de infarto de miocárdio. A associação do variante Asp298 com espasmo coronário e infarto de miocárdio foi verificada em um estudo feito com japoneses (SHIMASAKI *et. al.*, 1998; YOSHIMURA *et. al.*, 1998) entretanto essa associação não foi confirmada em estudos com caucasianos na França (POIRIER *et. al.*, 1999), Austrália (CAI *et. al.*, 1999) ou Ásia (YOON *et. al.*, 2000). Resultados contraditórios também têm sido observados com relação ao polimorfismo 4a/4b no íntron 4 e a ocorrência de doenças cardiovasculares. Este VNTR foi associado com hipertensão em um estudo com a população japonesa (UWABO *et. al.*, 1998), mas em outros trabalhos tal fato não foi confirmado (MYAMOTO *et. al.*, 1999; WANG *et. al.*, 1996).

Uma possível explicação para esses resultados contraditórios é que os estudos de associação geralmente avaliam a contribuição de um único polimorfismo para uma condição clínica específica e assim podem não ter o poder de detectar a influência real do polimorfismo (RISCH, 2000). Além disso, a mistura étnica em casos ou controles podem distorcer frequências alélicas em muitas situações e, se o risco para determinada doença varia pela etnicidade, pode haver uma inconsistência nos resultados devido a

estratificação da população (CARDON & PALMER, 2003). Dessa maneira, considerar as diferenças interétnicas na distribuição dos variantes da eNOS pode contribuir para a melhoria dos estudos de associação.

A prevalência e incidência de doenças com base genética variam acentuadamente entre diferentes populações e recentes informações a respeito do genoma humano mostram que a frequência de polimorfismos variam significativamente entre diferentes etnias (XIE *et. al.*, 2001).

Além disso, trabalho realizado por Tanus-Santos *et. al.*, 2001, revelou a existência de uma diferença interétnica na distribuição de 3 polimorfismos genéticos da eNOS, a saber: os polimorfismos T-786C na região promotora, 4a/4b no íntron 4 e Glu298Asp no éxon 7 na população americana. Além disso, a frequência haplotípica estimada e a associação entre esses variantes mostrou significativa diferença interétnica, especialmente quando comparados americanos-africanos com caucasianos. Essas diferenças podem explicar em parte as disparidades étnicas que existem em relação a biodisponibilidade de NO, risco cardiovascular e resposta a drogas (LI *et. al.*, 2004; STEIN *et. al.*, 1997; HOUGHTON *et. al.*, 1997; KALINOWSKI *et. al.*, 2004).

Visto que essas diferenças interétnicas na distribuição de polimorfismos do gene da eNOS existem na população americana, não se sabe se tais diferenças interétnicas existem em outras populações. Assim, a hipótese fundamental desse trabalho é de que os três polimorfismos clinicamente relevantes do gene da eNOS (T-786 C, Glu298Asp e 4a/4b) apresentem diferenças interétnicas em sua distribuição, considerando negros e brancos da população brasileira.

# ***OBJETIVOS***

## 2- OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal testar a hipótese de que exista uma diferença na distribuição de polimorfismos genéticos da eNOS (T-786 C, 4a/4b e Glu298Asp) em indivíduos negros e brancos da população brasileira.

Secundariamente, objetivamos estimar a frequência de haplótipos em ambos os grupos étnicos e compará-los.

# ***CAPÍTULO***

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

Nitric Oxide 12 (2005) 177–182

**NITRIC  
OXIDE**  
*Biology and Chemistry*
[www.elsevier.com/locate/yniox](http://www.elsevier.com/locate/yniox)

## Consistent interethnic differences in the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide synthase genetic polymorphisms

Aline S. Marroni <sup>a</sup>, Ingrid F. Metzger <sup>b</sup>, Debora C. Souza-Costa <sup>b</sup>, Sabrina Nagassaki <sup>b</sup>,  
Valeria C. Sandrim <sup>b</sup>, Ronan X. Correa <sup>c</sup>, Fabricio Rios-Santos <sup>c</sup>, Jose E. Tanus-Santos <sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacology, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

<sup>b</sup> Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

<sup>c</sup> Department of Health, State University of Santa Cruz, Ilheus, Brazil

Received 8 December 2004; revised 8 December 2004

### Abstract

A maldistribution of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) genetic variants may explain differences in NO-mediated effects and response to drugs among black and white subjects. While interethnic differences in the distribution of eNOS genetic variants exist in the American population, it is not known whether such interethnic differences exist in other populations. To test this possibility, we examined the distribution of genetic variants of three clinically relevant eNOS polymorphisms (T<sup>-786</sup>C in the promoter, the VNTR in intron 4, and the Glu298Asp variant in exon 7) in 136 black and 154 white subjects from a Brazilian population, which is very heterogeneous. We also estimated the haplotype frequency and evaluated associations between these variants. The Asp298 variant was more common in whites (32.8%) than in blacks (15.1%) ( $P < 0.004$ ). Similarly, the C<sup>-786</sup> variant was more common in whites (41.9%) than in blacks (19.3%) ( $P < 0.0004$ ). However, the 4a variant was more common in blacks (32.0%) than in whites (17.9%) ( $P < 0.003$ ). The most common predicted haplotype in both ethnic groups combined only wild-type variants. While the second most common haplotype in blacks includes the variant 4a and the wild-type variants for the remaining polymorphisms, the second most common haplotype in whites includes the variants Asp298 and C<sup>-786</sup> and the wild-type variant for polymorphism in intron 4. The marked interethnic differences that we found in Brazilians are very similar to those previously reported in Americans. These findings strongly suggest a consistent difference in the distribution of eNOS genetic variants in blacks compared with whites and indicate that the interethnic differences do not vary with geographic origin.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Endothelial nitric oxide synthase; Genotype; Interethnic differences; Nitric oxide; Polymorphisms

Nitric oxide (NO) is a highly diffusible molecule [1] playing a major role in the regulation of cardiovascular homeostasis [2]. Produced in endothelial cells and platelets by endothelial NO synthase (eNOS), NO maintains basal vasodilator tone, inhibits platelet aggregation, attenuates leukocyte adhesion to the endothelium, and modulates smooth muscle proliferation [2]. While NO bioavailability is tightly regulated by a balance between

NO inactivation by hemoglobin and NO production by endothelial cells [3], many cardiovascular diseases may be related to abnormalities in the activity of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) [2]. Therefore, the relevance of NO in the regulation of the cardiovascular system motivated a number of investigators to study whether polymorphisms in the eNOS gene are associated with many cardiovascular diseases [4]. Importantly, three clinically relevant polymorphisms in the eNOS gene have been widely studied: a single nucleotide polymorphism (SNP) in the promoter region (T<sup>-786</sup>C), a SNP in exon 7, and the variable number of

\* Corresponding author. Fax: +55 16 633 2301.

E-mail address: [tanus@fmrp.usp.br](mailto:tanus@fmrp.usp.br) (J.E. Tanus-Santos).

tandem repeats (VNTR) in intron 4 [4,5]. However, inconsistent associations between these eNOS genetic variants and cardiovascular diseases have been found. For example, the SNP in the promoter region (T<sup>-786</sup>C) was suggested to reduce promoter activity and predispose to coronary spasm [6,7] and myocardial infarction [8] in a Japanese population. However, the same did not hold true in studies involving Caucasians in France [9] and in Australia [10]. Discrepancies have also been found between studies exploring the association of myocardial infarction with the incidence of the SNP in exon 7. In this regard, the association of the variant Asp298 with coronary spasm and myocardial infarction in Japanese [11,12] was not confirmed in a Caucasian population in France [9], Australia [13], nor in Asians [14]. Conflicting results have also been found in studies associating cardiovascular diseases with the VNTR in intron 4 [15]. One possible explanation for these contrasting results is that such association studies usually focus on the contribution of a single polymorphism to a specific clinical condition and may not have the power to detect modest effects. Furthermore, population stratification, as a consequence of ethnic diversity, may also decrease the power of association studies [16]. These factors often confound and dilute the power of case-control studies that are usually designed to identify genetic risk factors for a disease, especially when ethnic variations in allele frequencies in cases and controls are not matched [17]. It follows that reliable information regarding the distribution of eNOS variants in different ethnic populations may be able to improve the design of association studies.

We have previously reported marked interethnic differences in the distribution of eNOS genetic variants in the American population [5]. Moreover, the estimated haplotype frequency and the association between these variants show significant interethnic differences, especially when African-Americans are compared with Caucasian-Americans [5]. These interethnic differences may in part explain the ethnic disparities in bioavailability of NO, cardiovascular risk, and response to drugs [18–22].

While interethnic differences in the distribution of eNOS genetic variants exist in the American population [5], it is not known whether such interethnic differences exist in other populations. The present-day Brazilian population is very heterogeneous and results from extensive interethnic crosses between peoples from different continents including Europeans, Africans, Asians, and autochthonous Amerindians [23]. In the present study, we examined the distribution of genetic variants of three clinically relevant polymorphisms found in eNOS gene in black and white Brazilians. We then estimated the haplotype frequency in these two ethnic groups and evaluated associations between these polymorphic variants.

## Materials and methods

### Subjects

Approval for use of human donors was obtained from the Institutional Review Board at Faculty of Medicine of Ribeirao Preto and at State University of Santa Cruz. One hundred and thirty-six subjects self-reported as black and 154 subjects self-reported as white (total  $N=290$ ; age range: 18–56 years) were recruited to give blood after informed consent was obtained. Venous blood samples were collected and genomic DNA was extracted from the cellular component of 1 ml of whole blood by a salting-out method and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analyzed.

### Genotyping

#### T<sup>-786</sup>C polymorphism in the 5'-flanking region of eNOS

Genotypes for the T<sup>-786</sup>C polymorphism in the 5'-flanking region of eNOS were determined by polymerase chain reaction (PCR) amplification using the primers 5'-TGG AGA GTG CTG GTG TAC CCC A-3' (sense) and 5'-GCC TCC ACC CCC ACC CTG TC-3' (antisense) [5,24,25]. The PCR was performed in a 25  $\mu\text{l}$  reaction volume that included approximately 100 ng of template genomic DNA, 10 pmol of each primer, 200  $\mu\text{M}$  of each dNTP, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2.5  $\mu\text{l}$  of 10 $\times$  PCR buffer, and 5 U of DNA Taq Polymerase (Promega, Madison, WI). The PCR mixtures were heated to 94  $^{\circ}\text{C}$  for 4 min for denaturation and underwent 35 cycles at 94  $^{\circ}\text{C}$  for 30 s for denaturation, 65  $^{\circ}\text{C}$  for 30 s for annealing, and 72  $^{\circ}\text{C}$  for 1 min for extension. Finally, extension was conducted at 72  $^{\circ}\text{C}$  for 5 min. The amplified products were digested with *MspI* for at least 3 h, at 37  $^{\circ}\text{C}$ , producing fragments of 140 and 40 bp for the wild-type allele (allele "T"), or 90, 50, and 40 bp in the case of a polymorphic variant (allele "C"). Fragments were separated by electrophoresis in 12% polyacrylamide gels and visualized by silver staining (Fig. 1).

#### Glu298Asp polymorphism in exon 7

For the detection of the Glu298Asp polymorphisms in exon 7, the primers 5'-AAG GCA GGA GAC AGT GGA TGG A-3' (sense) and 5'-CCC AGT CAA TCC CTT TGG TGC TCA-3' (antisense) were used in a PCR with the same cycles and conditions as described above [5,24]. The resulting 258-bp fragment was digested with the enzyme *BanII* for 6 h, at 37  $^{\circ}\text{C}$ , producing 163 and 85 bp fragments (wild type) or no digestion (variant allele) that were analyzed by gel electrophoresis in 12% polyacrylamide gels and visualized by silver staining (Fig. 1).

#### VNTR (27-bp repeat) polymorphism in intron 4

Genotypes for the polymorphic VNTR in intron 4 were determined by polymerase chain reaction (PCR) using the primers 5'-AGG CCC TAT GGT AGT GCC TTT-3' (sense) and 5'-TCT CTT AGT GCT GTG GTC



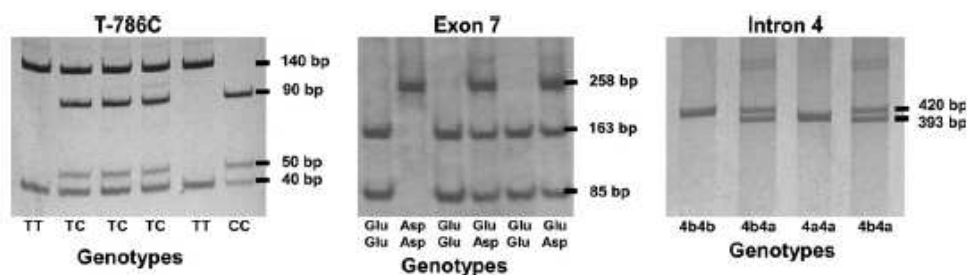


Fig. 1. Genotyping for the T<sup>-786</sup>C polymorphism in the promoter region, for the Glu298Asp polymorphism in exon 7, and for the VNTR polymorphism in intron 4 of eNOS gene. The PCR products were digested with restriction enzymes producing different fragments leading to specific genotypes.

AC-3' (antisense) [5,24]. The PCR was performed in a 40  $\mu$ l reaction volume that included approximately 100 ng of template genomic DNA, 10 pmol of each primer, 200  $\mu$ M of each dNTP, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 4  $\mu$ l of 10 $\times$  PCR buffer, and 5 U of DNA *Taq* Polymerase (Promega, Madison, WI). The PCR mixtures were heated to 94  $^{\circ}$ C for 4 min for denaturation and underwent 35 cycles at 94  $^{\circ}$ C for 30 s for denaturation, 63  $^{\circ}$ C for 30 s for annealing, and 72  $^{\circ}$ C for 1 min for extension. Finally, extension was conducted at 72  $^{\circ}$ C for 5 min. Fragments of 339, 393, 420, and 447 bp correspond to the eNOS alleles 4y, 4a, 4b, and 4c, respectively. Fragments were separated by electrophoresis in 8% polyacrylamide gels and visualized by silver staining (Fig. 1).

#### Estimation of linkage disequilibrium

The Estimating Haplotype (EH) software program (<ftp://linkage.rockefeller.edu/software/eh>; assessed on December 8, 2004) was used to estimate the haplotypes frequency in each ethnic group [26]. We also used this software to perform a linkage analysis between each pairwise combination of variants. This program calculates  $D'$  (the maximum-likelihood estimate of disequilibrium), which is a standard measure of linkage disequilibrium. The estimated disequilibrium  $D'$  values for each pairwise combination of variants were calculated as  $D' = D/D_{\max}$ , where  $D = h - p \cdot q$  [27]. Here,  $p$  and  $q$  are the frequencies for the rarer variants of the two polymorphisms being tested for linkage, such that  $p \leq q \leq 0.5$ , and  $h$  is the frequency of the haplotype including two specific variants. When  $D < 0$ ,  $D_{\max} = -p \cdot q$ ; when  $D > 0$ ,  $D_{\max} = p(1 - q)$ . Thus,  $D'$  values can vary from +1 to -1, with a positive  $D'$  indicating that the rarer variants are associated and a negative  $D'$  indicating that the rarer variant of one polymorphism is associated with the common variant at the other locus.

#### Statistical analysis

The distribution of genotypes for each polymorphism was assessed for deviation from the Hardy–Weinberg

equilibrium by using chi-squared tests (StatView for Windows, Cary, NC, USA). Differences in the genotype frequency of each polymorphism and in the allele frequency between the two ethnic groups were also assessed with chi-squared tests. A value of  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant.

#### Results

Table 1 shows the frequency of genotypes and alleles in blacks and whites. The distribution of genotypes for each polymorphism showed no deviation from Hardy–Weinberg equilibrium. There was a notable disparity in the distribution of eNOS genotypes and variants between the two ethnic groups (Table 1 and Fig. 2). The Asp298 variant in exon 7 was more common in whites

Table 1  
Genotypes and alleles frequency in the two ethnic groups studied

	Genotype	Ethnic groups		$\chi^2$	$P$
		B (n = 136)	W (n = 154)		
Glu298Asp	Glu, Glu	0.713 (97)	0.422 (65) <sup>a</sup>	17.91	<0.0001
	Glu, Asp	0.272 (37)	0.500 (77) <sup>a</sup>		
	Asp, Asp	0.015 (2)	0.078 (12) <sup>a</sup>		
T <sup>-786</sup> C	T, T	0.640 (87)	0.311 (48) <sup>a</sup>	24.53	<0.0001
	T, C	0.330 (45)	0.539 (83) <sup>a</sup>		
	C, C	0.030 (4) <sup>a</sup>	0.150 (23) <sup>a</sup>		
Intron 4	4b, 4b	0.470 (64)	0.701 (108) <sup>a</sup>	13.82	<0.001
	4b, 4a	0.390 (53)	0.273 (42) <sup>a</sup>		
	4a, 4a	0.125 (17)	0.026 (4) <sup>a</sup>		
	4b, 4c	0.015 (2)	—		
Alleles	B (n = 272)	W (n = 308)			
Glu298Asp	Glu	0.849 (231)	0.672 (207) <sup>a</sup>	10.96	<0.004
	Asp	0.151 (41)	0.328 (101) <sup>a</sup>		
T <sup>-786</sup> C	T	0.805 (219)	0.581 (179) <sup>a</sup>	12.48	<0.0004
	C	0.195 (53)	0.419 (129) <sup>a</sup>		
Intron 4	4b	0.673 (183)	0.821 (253) <sup>a</sup>	8.64	<0.003
	4a	0.320 (87)	0.179 (55) <sup>a</sup>		
	4c	0.007 (2)	—		

Blacks (B) and whites (W).

The rare variant 4c was grouped with the variant 4a before statistical analysis of intron 4 polymorphism.

<sup>a</sup>  $P < 0.001$  compared to blacks (chi-squared test).

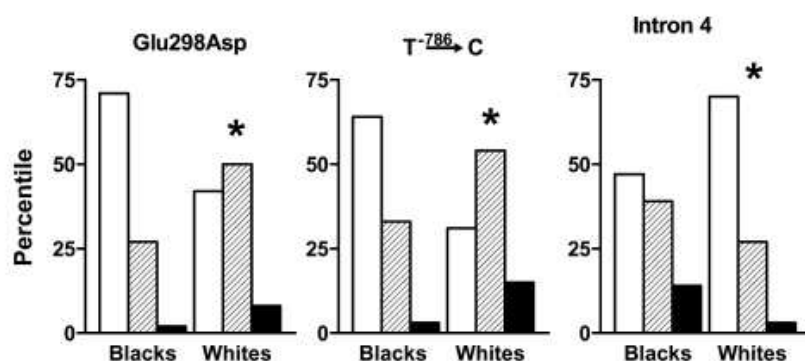


Fig. 2. Percentile distribution of genotypes in blacks and whites. Open bars, wild-type homozygotes; diagonal, heterozygotes; and closed bars, homozygote variants. \* $P < 0.01$  compared to the other ethnic groups (chi-squared tests).

(32.8%) than in blacks (15.1%) ( $P < 0.004$ ). Similarly, the  $C^{-786}$  variant in the promoter region was also more common in whites (41.9%) than in blacks (19.5%) ( $P < 0.0004$ ). Correspondingly, the heterozygote or homozygote variant genotypes for both exon 7 and promoter region polymorphisms were more common in whites than in blacks ( $P < 0.001$  for both comparisons). On the other hand, the variant 4a in intron 4 was more common in blacks (32.0%) than in whites (17.9%) ( $P < 0.003$ ). Also, the heterozygote or homozygote variant genotypes for intron 4 were more common in blacks than in whites ( $P < 0.001$ ). In addition to the wild-type allele (4b) and the allele 4a, which have five and four 27-bp repeats, respectively, we detected the variant 4c for the VNTR polymorphism in intron 4 confined to the group of blacks, which corresponds to six 27-bp repeats,

as previously observed [5]. Because of the low frequency of these rare variant 4c (two subjects in the present study), and to simplify the analysis, we decided to group it with the variant 4a.

The estimated haplotype frequency for the two ethnic groups is shown in Table 2. As anticipated, the most common haplotype for the two ethnic groups combines the wild-type variants for all three polymorphisms. For blacks, the second most common haplotype (estimated frequency = 22%) includes the variant 4a in intron 4 and the wild-type variants for the other two polymorphisms. In whites, however, two other haplotypes were also commonly found (estimated frequency = 15% for both): the haplotype including the variants Asp298 and  $C^{-786}$ , in exon 7 and in the promoter region, respectively, and the haplotype including the variant  $C^{-786}$  in the promoter region and the wild-type variants for the other two polymorphisms.

The linkage analysis between each pairwise combination showed specific associations between polymorphic variants for both ethnic group. In whites, a positive  $D'$  value (+0.58) for association between the rarer variants in the promoter region and in intron 4 ( $C^{-786}$  and 4a, respectively) was found (Fig. 3), thereby indicating that these rare variants are associated ( $P < 0.05$ ). In blacks, however, we found a negative  $D'$  value (-0.50) for the association between the variants in the exon 7 and in intron 4 indicating that the rarer variant 4a in intron 4 is associated with the wild-type variant Glu298 in exon 7 or vice versa ( $P < 0.05$ ).

Table 2

Estimated haplotype frequency in the two ethnic groups studied

Haplotypes				Ethnic group	
	Glu298Asp	T-786	Intron 4	B	W
Glu	T	4b	0.45	0.41	
Glu	T	4a	0.22	0.04	
Glu	C	4b	0.09	0.15	
Glu	C	4a	0.05	0.08	
Asp	T	4b	0.11	0.13	
Asp	T	4a	0.05	0.01	
1Asp	C	4b	0.02	0.15	
Asp	C	4a	0.01	0.03	

Blacks (B) and whites (W).

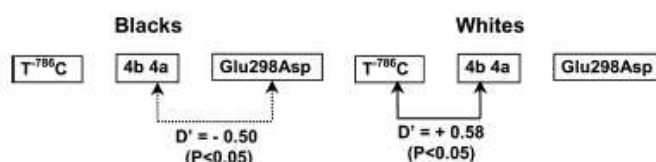


Fig. 3. Maximum-likelihood estimate of disequilibrium ( $D'$ ) for pairwise combinations of polymorphic variants in the two ethnic groups. A positive  $D'$  value (continuous line) indicates that the rarer variants of each polymorphism are associated. A negative  $D'$  (dashed line) indicates that the rarer polymorphic variant in one polymorphism is associated with the more common variant of the other.

## Discussion

In this study, we found marked differences in the distribution of eNOS variants in blacks compared with whites in a Brazilian population. In addition, we found significant interethnic differences in estimated haplotype frequency, and in the association between variants. Importantly, although the Brazilian population is very heterogeneous and results from extensive interethnic crosses between peoples from different continents [23], the interethnic differences we found in the present study are almost identical to those previously reported for the American population [5].

Few studies have attempted to demonstrate the mechanisms through which these genetic variations can affect eNOS enzyme activity. The T<sup>-786</sup>C polymorphism was shown to reduce the promoter activity by approximately 50% [6,28], thereby lending experimental support to a physiologic role for this SNP. Conversely, there is controversial evidence for an impaired enzyme function as a result of the polymorphism in the exon 7 [29,30] and no evidence for the VNTR in intron 4 [4]. However, many recent studies have implicated these three polymorphisms in the development of cardiovascular diseases, and it is possible that interethnic differences in NO-mediated effects may result from a disproportionate distribution of eNOS variants among ethnic groups [5]. For example, interethnic differences in eNOS variants may result in a higher incidence and severity of hypertension in African-Americans [31]. In addition, the identification of the genetic determinants underlying interethnic differences in drug response can help predict the drug effects and improve therapy [32].

The frequencies that we found in the occurrence of the variant Asp298 (exon 7) in white and black Brazilians (32.8 and 15.1%, respectively) are very similar to those previously reported in Caucasians and African-Americans (34.5 and 15.5%, respectively) [5]. In addition, the occurrence of the variant C (promoter region) in white and black Brazilians (41.9 and 19.5%, respectively) is also very similar to those previously reported in Caucasians and African-Americans (42.0 and 17.5%, respectively) [5]. Finally, the occurrence of the variant 4a (intron 4) in white and black Brazilians (17.9 and 32.0%, respectively) is also very similar to those previously reported in Caucasians and African-Americans (16.0 and 26.5%, respectively) [5].

Confirming these similarities in alleles frequencies between Brazilians and Americans, white Brazilians presented an association (linkage) between the variant in the promoter region and in intron 4 that was previously reported in American-Caucasians [5]. In addition, black Brazilians presented an association (linkage) between the variant in intron 4 and in exon 7 that is identical to that previously reported in African-Americans [5]. Finally, the haplotypes most commonly found in white and black Brazilians are the same haplotypes most commonly

found in Caucasian-Americans and African-Americans, respectively [5]. Taken together, these findings strongly suggest a consistent difference in the distribution of eNOS genetic variants in blacks compared with whites and strongly suggest that the interethnic differences do not vary with geographic origin, at least when comparing two populations from North America and South America. Moreover, these findings may help us understand how the combination of SNPs and distinct haplotypes influence the interethnic disparities in bioavailability of NO, cardiovascular risk, and response to drugs [18–22].

Black Brazilians had higher prevalence of the 4a variant in intron 4 than white Brazilians. This genetic variant has been implicated in the increased risk of developing cardiovascular [33] and renal [34] diseases in African-Americans. Interestingly, the serum concentrations of NO metabolites were reported to be lower in subjects with this variant [35]. Curiously, almost all studies of the eNOS polymorphism in intron 4 have not included variants other than the 4a. We found two black Brazilians who carried the variant 4c. Similarly, the variant 4c was previously reported to be confined to African-Americans [5]. While there is no information regarding the clinical relevance of this variants, it is possible that they do have an impact on cardiovascular risk. One study of 1043 individuals found the 4c variant in only five subjects, but three of these had severe coronary artery disease with multiple myocardial infarctions while the other two had hypertension, one of them with depressed left ventricular function [36]. These anecdotal cases point to a possible clinical relevance for the 4c variant that we documented in four out of 136 black Brazilians.

In conclusion, it is clear that there are marked differences in the distribution of clinically relevant genetic variants of eNOS in black compared with white subjects, both in the Brazilian and in the American population. These differences suggest a proportional significance of these polymorphisms in each ethnic group. Finally, these differences may in part explain the ethnic disparities in cardiovascular risk and response to drugs.

## Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

## References

- [1] J.R. Lancaster Jr., A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide, *Nitric Oxide* 1 (1997) 18–30.
- [2] J.P. Cooke, V.J. Dzau, Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease, *Annu. Rev. Med.* 48 (1997) 489–509.

- [3] M.T. Gladwin, J.R. Lancaster Jr., B.A. Freeman, A.N. Schechter, Nitric oxide's reactions with hemoglobin: a view through the SNO-storm, *Nat. Med.* 9 (2003) 496–500.
- [4] A.D. Hingorani, Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis: John French Lecture 2000, *Atherosclerosis* 154 (2001) 521–527.
- [5] J.E. Tanus-Santos, M. Desai, D.A. Flockhart, Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants, *Pharmacogenetics* 11 (2001) 719–725.
- [6] M. Nakayama, H. Yasue, M. Yoshimura, Y. Shimasaki, K. Kugiyama, H. Ogawa, T. Motoyama, Y. Saito, Y. Ogawa, Y. Miyamoto, et al., T-786-C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm, *Circulation* 99 (1999) 2864–2870.
- [7] M. Yoshimura, H. Yasue, M. Nakayama, Y. Shimasaki, H. Ogawa, K. Kugiyama, Y. Saito, Y. Miyamoto, Y. Ogawa, T. Kaneshige, et al., Genetic risk factors for coronary artery spasm: significance of endothelial nitric oxide synthase gene T-786-C and missense Glu298Asp variants, *J. Investig. Med.* 48 (2000) 367–374.
- [8] M. Nakayama, H. Yasue, M. Yoshimura, Y. Shimasaki, H. Ogawa, K. Kugiyama, Y. Mizuno, E. Harada, S. Nakamura, T. Ito, et al., T(-786)C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with myocardial infarction, especially without coronary organic stenosis, *Am. J. Cardiol.* 86 (2000) 628–634.
- [9] O. Poirier, C. Mao, C. Mallet, V. Nicaud, S.M. Herrmann, A. Evans, J.B. Ruidavets, D. Arveiler, G. Luc, L. Tiret, et al., Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene—no consistent association with myocardial infarction in the ECTIM study, *Eur. J. Clin. Invest.* 29 (1999) 284–290.
- [10] A.S. Sim, J. Wang, D. Wilcken, X.L. Wang, MspI polymorphism in the promoter of the human endothelial constitutive NO synthase gene in Australian Caucasian population [letter], *Mol. Genet. Metab.* 65 (1998) 62.
- [11] Y. Shimasaki, H. Yasue, M. Yoshimura, M. Nakayama, K. Kugiyama, H. Ogawa, E. Harada, T. Masuda, W. Koyama, Y. Saito, et al., Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction, *J. Am. Coll. Cardiol.* 31 (1998) 1506–1510.
- [12] M. Yoshimura, H. Yasue, M. Nakayama, Y. Shimasaki, H. Sumida, S. Sugiyama, K. Kugiyama, H. Ogawa, Y. Ogawa, Y. Saito, et al., A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese, *Hum. Genet.* 103 (1998) 65–69.
- [13] H. Cai, D.E. Wilcken, X.L. Wang, The Glu-298-Asp (894G-T) mutation at exon 7 of the endothelial nitric oxide synthase gene and coronary artery disease, *J. Mol. Med.* 77 (1999) 511–514.
- [14] Y. Yoon, J. Song, S.H. Hong, J.Q. Kim, Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease, *Clin. Chem.* 46 (2000) 1626–1630.
- [15] X.L. Wang, J. Wang, Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease, *Mol. Genet. Metab.* 70 (2000) 241–251.
- [16] L.R. Cardon, J.I. Bell, Association study designs for complex diseases, *Nat. Rev. Genet.* 2 (2001) 91–99.
- [17] N.J. Risch, Searching for genetic determinants in the new millennium, *Nature* 405 (2000) 847–856.
- [18] R. Li, D. Lyn, R. Lapu-Bula, A. Oduwole, P. Igho-Pemu, B. Lankford, J. Morgan, S. Nkemdechi, G. Liu, C. Pack, et al., Relation of endothelial nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide level, endothelial function, and blood pressure in African Americans, *Am. J. Hypertens.* 17 (2004) 560–567.
- [19] C.M. Stein, C.C. Lang, R. Nelson, M. Brown, A.J. Wood, Vasodilation in black Americans: attenuated nitric oxide-mediated responses, *Clin. Pharmacol. Ther.* 62 (1997) 436–443.
- [20] J.L. Houghton, V.E. Smith, D.S. Strogatz, N.L. Henches, W.M. Breisblatt, A.A. Carr, Effect of African-American race and hypertensive left ventricular hypertrophy on coronary vascular reactivity and endothelial function, *Hypertension* 29 (1997) 706–714.
- [21] L. Kalinowski, I.T. Dobrucki, T. Malinski, Race-specific differences in endothelial function: predisposition of African Americans to vascular diseases, *Circulation* 109 (2004) 2511–2517.
- [22] P. Sareli, I.V. Radevski, Z.P. Valtchanova, E. Libhaber, G.P. Candy, E. Den Hond, C. Libhaber, D. Skudicky, J.G. Wang, J.A. Staessen, Efficacy of different drug classes used to initiate antihypertensive treatment in black subjects: results of a randomized trial in Johannesburg, South Africa, *Arch. Intern. Med.* 161 (2001) 965–971.
- [23] F.C. Parra, R.C. Amado, J.R. Lambertiucii, J. Rocha, C.M. Antunes, S.D. Pena, Color and genomic ancestry in Brazilians, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 177–182.
- [24] J.E. Tanus-Santos, M. Desai, L.R. Deak, J.C. Pezzullo, D.R. Abernethy, D.A. Flockhart, J.E. Freedman, Effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on platelet function, nitric oxide release, and interactions with estradiol, *Pharmacogenetics* 12 (2002) 407–413.
- [25] S. Nagasaki, I.F. Metzger, D.C. Souza-Costa, A.S. Marroni, J.A. Uzelli, J.E. Tanus-Santos, eNOS genotype is without effect on circulating nitrite/nitrate level in healthy male population, *Thromb. Res.* 115 (2005) 375–379.
- [26] J.D. Terwillinger, J. Ott, *Handbook of Linkage Analysis*, The Johns Hopkins University Press, New York, NY, 1994.
- [27] A. Cox, N.J. Camp, M.J. Nicklin, F.S. di Giovine, G.W. Duff, An analysis of linkage disequilibrium in the interleukin-1 gene cluster, using a novel grouping method for multiallelic markers, *Am. J. Hum. Genet.* 62 (1998) 1180–1188.
- [28] Y. Miyamoto, Y. Saito, M. Nakayama, Y. Shimasaki, T. Yoshimura, M. Yoshimura, M. Harada, N. Kajiyama, I. Kishimoto, K. Kuwahara, 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.* 9 (2000) 2629–2637.
- [29] R. Golser, A.C. Gorren, B. Mayer, K. Schmidt, Functional characterization of Glu298Asp mutant human endothelial nitric oxide synthase purified from a yeast expression system, *Nitric Oxide* 8 (2003) 7–14.
- [30] T.A. Fairchild, D. Fulton, J.T. Fontana, J.P. Gratton, T.J. McCabe, W.C. Sessa, Acidic hydrolysis as a mechanism for the cleavage of the Glu298Asp-variant of human endothelial nitric oxide synthase, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 30.
- [31] C.M. Stein, C.C. Lang, H.G. Xie, A.J. Wood, Hypertension in black people: study of specific genotypes and phenotypes will provide a greater understanding of interindividual and interethnic variability in blood pressure regulation than studies based on race, *Pharmacogenetics* 11 (2001) 95–110.
- [32] A.J. Wood, Racial differences in the response to drugs—pointers to genetic differences, *N. Engl. J. Med.* 344 (2001) 1393–1396.
- [33] W.C. Hooper, C. Lally, H. Austin, J. Benson, A. Dille, N.K. Wenger, C. Whitsett, P. Rawlins, B.L. Ewart, The relationship between polymorphisms in the endothelial cell nitric oxide synthase gene and the platelet GPIIb gene with myocardial infarction and venous thromboembolism in African Americans, *Chest* 116 (1999) 880–886.
- [34] B.I. Freedman, H. Yu, P.J. Anderson, B.H. Roh, S.S. Rich, D.W. Bowden, Genetic analysis of nitric oxide and endothelin in end-stage renal disease, *Nephrol. Dial. Transplant.* 15 (2000) 1794–1800.
- [35] T. Tsukada, K. Yokoyama, T. Arai, F. Takemoto, S. Hara, A. Yamada, Y. Kawaguchi, T. Hosoya, J. Igari, Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245 (1998) 190–193.
- [36] H.H. Sigusch, R. Surber, M.H. Lehmann, S. Surber, J. Weber, A. Henke, D. Reinhardt, A. Hoffmann, H.R. Figulla, Lack of association between 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of the endothelial nitric oxide synthase gene and the risk of coronary artery disease, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 60 (2000) 229–235.

# ***DISCUSSÃO***

## 4- DISCUSSÃO

No presente trabalho pudemos observar significativas diferenças nas distribuições de frequência de polimorfismos genéticos clinicamente relevantes do gene da eNOS (T-786C na região promotora, 4a/4b no intron 4 e Glu298Asp no exon 7) entre indivíduos negros e brancos da população brasileira. Nossos resultados também evidenciam diferenças interétnicas na frequência haplotípica estimada e na associação entre os variantes genéticos estudados. Essas diferenças interétnicas confirmam haver na população brasileira diferenças já demonstradas previamente na população americana (TANUS-SANTOS *et. al.*, 2001).

Os indivíduos negros analisados em nosso estudo tiveram maior prevalência do variante 4a no íntron 4 quando comparados aos brancos brasileiros. Além disso tiveram uma alta frequência para o haplótipo que inclui este variante. Diversos estudos tem mostrado uma associação entre o alelo 4a no íntron 4 e a ocorrência de doenças renais e cardiovasculares em negros americanos (HOOPER *et. al.*, 1999); FREEDMAN *et. al.*, 2000). Além disso, as concentrações séricas dos metabólitos do NO demonstraram ser menores em indivíduos com este variante (TSUKADA *et. al.*, 1998). Esses dados sugerem uma possível importância do variante 4a nesse grupo étnico.

Quase todos estudos com o polimorfismo no intron 4 do gene da eNOS não incluem variantes além do variante 4a, o que pode ser explicado devido à baixa frequência de ocorrência dos variantes 4c e 4y descritos em negros americanos. Nós encontramos dois brasileiros portadores do variante 4c, o que também confirma a similaridade entre os dados obtidos por nós em brasileiros e os dados prévios obtidos em americanos, pois o variante 4c somente foi

encontrado em negros americanos (TANUS-SANTOS *et. al.*, 2001). Não existem informações na literatura que evidenciem uma relevância clínica desse variante. Entretanto, é possível que o variante 4c possa ter alguma importância no risco cardiovascular. Em um estudo realizado com 1043 indivíduos, o alelo 4c ocorria em apenas cinco pessoas, porém três desses indivíduos tinham doença arterial coronária severa, tendo sofrido múltiplos infartos do miocárdio, enquanto os outros dois pacientes apresentavam hipertensão, tendo um deles comprometimento severo da função ventricular esquerda. (SIGUSCH *et. al.*, 2000). Esses casos sugerem uma possível relevância clínica do variante 4c, o qual nós documentamos em quatro dos 136 indivíduos negros que fizeram parte do presente estudo.

Estudos prévios indicam haver implicações funcionais dos polimorfismos da eNOS enfocados em nosso estudo. Particularmente quanto ao polimorfismo da região promotora (T-786C), embora não ocorra especificamente num local que seja um sítio de ligação transcripcional da região promotora do gene da eNOS (WANG & WANG, 2000), há fortes evidências para associação entre este variante genético e uma redução na expressão do gene dessa enzima. Neste sentido, NAKAYAMA *et. al.*, 2000, demonstraram que o genótipo C/C está associado com 52% e 62% de diminuição na atividade do promotor em condições de normóxia ou de hipóxia, respectivamente, comparado com a atividade do promotor contendo apenas o alelo “wild-type” da região promotora (alelo T). Estes pesquisadores também encontraram uma forte associação entre o alelo “C” e ocorrência de espasmo coronariano, sugerindo que um decréscimo na expressão de eNOS poderia ter importantes implicações clínicas. Outro estudo *in vivo* demonstrou que o

alelo C diminui os níveis de RNAm, bem como as concentrações de nitritos e nitratos séricos, os quais são produtos da oxidação do NO (MIYAMOTO *et. al.*, 2000). Em resumo, parece haver evidência biológica satisfatória associando a ocorrência do alelo “C” deste polimorfismo e um comprometimento da produção endógena de NO pelo aparelho cardiovascular.

Já com relação ao polimorfismo 4a/4b no intron 4, não há dados na literatura científica que evidenciem a importância do intron 4 na expressão ou a atividade da eNOS .

Especificamente com relação ao polimorfismo Glu298Asp no exon 7, demonstrou-se que a proteína eNOS seria mais susceptível a clivagem proteolítica em portadores do variante Asp298 quando comparada com a eNOS de portadores do variante Glu298 (TESAURO *et. al.*, 2000). Assim, este estudo sugere que a maior instabilidade da eNOS com tal variante se traduziria num possível comprometimento funcional deste sistema por conta do polimorfismo Glu298Asp. Entretanto, um trabalho feito posteriormente revelou que tal instabilidade era resultado de um artefato experimental (FAIRCHILD *et. al.*, 2001).

No presente estudo, indivíduos brancos tiveram uma alta prevalência do variante C-786 quando comparados aos negros. Esses dados sugerem que o polimorfismo T-786C na região promotora do gene da eNOS pode ser mais relevante nesse grupo étnico .

É possível que diferenças nos efeitos mediados pelo NO possam resultar de uma distribuição desproporcional desses variantes da eNOS entre grupos étnicos (XIE *et. al.*, 2001). Doenças cardiovasculares, a causa mais comum de mortalidade no mundo todo, difere acentuadamente em sua



prevalência e severidade entre diferentes grupos étnicos (MURRAY & LOPEZ, 1997). Nos Estados Unidos, a ocorrência de doenças cardiovasculares, especialmente a hipertensão arterial e os acidentes vasculares cerebrais, ocorrem de maneira desproporcional entre brancos e negros americanos, sendo que no segundo grupo étnico a prevalência de hipertensão é em torno de 50 a 75% mais elevada quando comparados aos brancos, estando entre as mais elevadas do mundo (MARTINS *et. al.*, 2002). Além disso, as complicações cardiovasculares são também mais freqüentes em negros americanos quando comparados aos brancos americanos. Estudo feito por KLAG *et. al.*, 1997, mostrou que a freqüência de doenças renais aumenta de 3 a 4 vezes em americanos-africanos quando comparados a caucasianos, assim como a mortalidade relacionada a doenças cardíacas, que aumenta entre 50 e 80% neste grupo étnico.

Além disso, diferenças étnicas observadas para a resposta a algumas drogas podem ser devidas a discrepâncias na distribuição de polimorfismos entre esse grupos. Por exemplo, TURNER *et. al.*, 2001, mostraram que indivíduos hipertensos portadores do alelo T para o polimorfismo C825T da sub-unidade beta-3 da proteína G respondem melhor à terapia diurética com hidroclorotiazida quando comparados a portadores do alelo C. O alelo T apresenta uma freqüência bem maior em negros americanos do que em caucasianos americanos (76% versus 28,9% respectivamente). Além disso, polimorfismos de receptores incluindo receptores alfa e beta adrenérgicos, receptores da angiotensina II e da eNOS, os quais estão ligados a alterações na resposta terapêutica (ANDERSON *et. al.*, 1999; WAGONER *et. al.*, 2000) apresentam diferenças interétnicas em suas distribuições (XIE *et. al.*, 2001), o

que evidencia uma possível importância da etnia na distribuição de polimorfismos genéticos de interesse farmacológico.

Em nosso estudo, optamos por fazer uma combinação haplotípica entre os polimorfismos da eNOS baseados em dados prévios, do que fazer a análise de um único polimorfismo, o que poderia ser insuficiente para detectar a influência de um determinado polimorfismo. Estudos de associação entre polimorfismos genéticos e doenças cardiovasculares têm sido limitados em detectar uma associação porque eles avaliam a contribuição de apenas um único polimorfismo (RISCH, 2000). Um gene pode conter diversos polimorfismos que afetam a sua expressão (DRYSDALE *et. al.*, 2000). Assim, conhecer cada um dos polimorfismos, bem como suas relações com outros, pode ser uma maneira mais eficaz de se prever a resposta a uma droga. O estudo de combinações haplotípicas (combinação de diversos polimorfismos) proporciona melhor habilidade preditiva. Além disso, um variante pode estar em desequilíbrio de ligação com um gene próximo, o qual pode representar o verdadeiro locus associado a variações de respostas farmacológicas (JHASON *et. al.*, 2000).

A frequência com que encontramos os variantes Asp298 (exon 7) em brasileiros brancos e negros (32.8% e 15.1%, respectivamente) são muito similares àquelas encontradas previamente em caucasianos e negros americanos (34.5% e 15.5%, respectivamente)( $p < 0.004$ ). Além disso, a ocorrência do variante C (polimorfismo T-786C da região promotora) em brancos e negros brasileiros (41.9% e 19.5%, respectivamente)( $p < 0.0004$ ) são também muito similares àquelas observadas em caucasianos e negros americanos (42.0% e 17.5%, respectivamente). A ocorrência do variante 4a

(polimorfismo 4a/4b íntron 4) em indivíduos brancos e negros brasileiros em nosso estudo (17.9% e 32.0%, respectivamente)( $p < 0.003$ ) reproduzem também os dados previamente observados em brancos e negros da população americana (16.0% e 26.5%, respectivamente) (TANUS-SANTOS *et. al.*, 2001). Esta similaridade entre as populações americana e brasileira nos surpreendeu, pois tem-se, em geral, a impressão de que a população brasileira é caracterizada fundamentalmente por miscigenação racial.

Confirmando estas similaridades nas frequências alélicas entre brancos e negros das populações americana e brasileira, os indivíduos brancos brasileiros tiveram uma associação entre o variante do polimorfismo T-786C na região promotora e o variante do polimorfismo 4a/4b do intron 4, o que havia sido previamente demonstrado entre negros e brancos na população americana (TANUS-SANTOS *et. al.*, 2000). Além disso, negros da população brasileira tiveram uma associação (ligação) entre o variante no intron 4 e o variante no exon 7, como demonstrado previamente em americanos-africanos (TANUS-SANTOS *et. al.*, 2000).

Finalmente, a análise de haplótipos mostrou que os haplótipos mais comumente encontrados em nosso trabalho para indivíduos negros e brancos da população brasileira são os mesmos haplótipos mais encontrados em caucasianos e americanos africanos, respectivamente, em estudo realizado previamente (TANUS-SANTOS *et. al.*, 2000).

Analisados em conjunto, estes dados sugerem que existe uma diferença interétnica consistente na distribuição de variantes genéticas de interesse clínico no gene da eNOS (T-786C, 4a/4b e Glu298Asp) em brancos comparados aos negros. Estes resultados permitem sugerir que as diferenças

encontradas entre esses dois grupos étnicos (brancos e negros) não sofrem interferências com relação à origem geográfica, pelo menos quando comparamos as duas populações da América do Norte e da América do Sul.

O termo raça ou etnicidade são difíceis de serem definidos precisamente (FELDMAN, 2003) e, na verdade, são relatados de forma bastante inconsistente na literatura (KRESSIN *et. al.*, 2003). A raça sugere uma base biológica para uma categoria construída socialmente e implica homogeneidade genética dentro de um grupo heterogêneo classificado de modo geral (SCHWARTZ, 2001). Traços físicos, especialmente pigmentação da pele, cor e textura do cabelo e formato dos lábios e nariz são critérios comumente utilizados para a caracterização de uma raça (FOSTER & SHARP, 2001). A etnicidade considera um grupo de indivíduos, definidos por sua cultura, origem, fatores genéticos e do meio, e tem a flexibilidade de incluir múltiplos parâmetros e características da população mais claramente (SENIOR & BHOPAL, 1997). Entretanto, existem divergências na literatura quanto a classificação mais adequada (KENNEDY & DEAPEN, 1991) e ambas apresentam limitações (MOSCOU *et. al.*, 2003).

Além disso, quando consideramos a população brasileira avaliada em nosso estudo, devemos levar em conta que esta população apresenta grande diversidade étnica, complexos fenótipos individuais, e resulta de misturas interétnicas entre pessoas de diferentes continentes incluindo europeus, africanos, asiáticos e índios americanos (PARRA *et. al.*, 2001)

Tendo consciência destes problemas, no presente estudo, optamos por usar o critério de auto-definição da raça para os voluntários que participaram de nosso estudo. Embora tal critério também apresente limitações (HAHN *et.*

*al.*, 1996;), a auto-definição da raça é freqüentemente sugerida como o melhor método para a coleta de dados referentes a raça e etnia (KAUFMAN *et. al.*, 1999).

De modo geral, os resultados do nosso estudo podem nos ajudar a entender como a combinação de SNPs e haplótipos distintos poderiam influenciar as disparidades interétnicas que existem na biodisponibilidade de NO, no risco cardiovascular aumentado de alguns indivíduos, e na resposta a drogas (LI *et. al.*, 2004; STEIN *et. al.*, 1997; HOUGHTON *et. al.*, 1997; KALINOWSKI *et. al.*, 2004). Além disso, conhecer as diferenças que podem ocorrer na distribuição de variantes genéticas entre as etnias pode contribuir para um tratamento mais eficaz de doenças cardiovasculares (WOOD, 2000).

## ***CONCLUSÕES***

## 5- CONCLUSÕES

Podemos concluir que existe uma acentuada diferença na distribuição dos três polimorfismos clinicamente relevantes da eNOS estudados (T-786C, 4a/4b e Glu298Asp) entre indivíduos negros comparados aos brancos, tanto na população brasileira quanto na população americana. Essas diferenças podem ajudar a explicar, ao menos em parte, as disparidades étnicas observadas com relação à susceptibilidade a doenças cardiovasculares e resposta à drogas.

***REFERÊNCIAS***  
***BIBLIOGRÁFICAS***



## 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHINI, V.; MALTA, E.; MILLER, R. C. Effect of endothelium and carbachol on alpha-adrenoceptor agonists stimulated uptake and efflux of Ca in rat isolated aorta.

**Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 336: 287-94, 1992.

ANDERSON, B.; BLANGE, I.; SYLVE, C. Angiotensin-II type 1 receptor gene polymorphism and long-term survival in patients with idiopathic congestive heart failure. **Eur J Heart Fail**, 1: 369-79, 1999.

ANDREW, P. J.; MAYER, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases.

**Cardiovasc Res**, 43: 521-31, 1999.

BALLA, G.; JACOBS, H. S.; BALLA, J. Et. al. Ferritin: a cytoprotective antioxidant

stratagem of endothelium. **J Biol Chem**, 267: 18148–153, 1992.

BENJAMIN, N.; DUTTON, J. A. E.; RITTER, J. M. Human vascular smooth muscle cell inhibit platelet aggregation when incubated with glyceryl trinitrate: evidence for

generation of nitric oxide. **Br J Pharmacol**, 102: 847–50, 1991.

BONINI, M. G.; AUGUSTO, O. Carbon dioxide stimulates the production of thiyl, sulfinyl, and disulfide radical anion from thiol oxidation by peroxynitrite. **J Biol Chem**, 276: 9749–54, 2001.

CADMAN, P. E.; O'CONNOR, D. T. Pharmacogenomics of hipertension. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, 12: 61-70, 2003.

CAI, H.; WILCKEN, D. E.; WANG, X. L. The Glu-298--Asp (894G--T) mutation at exon 7 of the endothelial nitric oxide synthase gene and coronary artery disease. **J Mol Med**, 77: 511-4, 1997.

CARDON, R. L. I.; BELL, J. L. Association study designs for complex diseases. **Nat Rev Gene**, 2: 91-9, 2001.

CARDON, R. L.; PALMER, L. J. Population stratification and spurious allelic association. **Lancet** , 361: 598-604, 2003.

CHASMAN, D.; ADAMS, R. M. Predicting the functional consequences of non-synonymous single nucleotide polymorphisms structure based assessment of amino-acid variation. **J Mol Biol**, 307: 683-706, 2001.

- CHEN, F.; CASTRANOVA, V.; SHI, X.; DEMERS, L. M. New insights into the role of nuclear factor- $\kappa$ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. **Clin Chem**, 45: 7–17, 1999.
- COLLINS, P.; GRIFFITH, T. M.; HENDERSON, A. H.; LEWIS, M. J. Endothelium derived relaxing factor alters calcium fluxes in rabbit aorta: a cyclic guanosine monophosphate-mediated effect. **P Physiol (Lond)**, 381: 427-37, 1992.
- COX, L.; CAMP, N. J.; NICKLIN, M. J.; DI GIOVANI, F. S.; DUFF, G. W. An analysis of linkage disequilibrium in the interleukin-1 gene cluster, using a novel grouping method for multiallelic markers. **Am J Hum Genet**, 62: 1180-88, 1998.
- DORIS, P. Hypertension genetics, single nucleotide polymorphisms and the common disease: common variant hypothesis. **Hypertension**, 39: 323-31, 2001.
- DRYSDALE, C. M. et al. Complex promoter and coding region B2-adrenergic receptor haplotypes affect receptor expression and predict in vivo responsiveness. **Proc Nat Acad Sci USA**, 97: 10483-8, 2000.
- FAIRCHILD, T. A.; FULTON, D.; FONTANA, J. T.; GRATTON, J. P.; MCCABE, T. J.; SESSA, W. C. Acidic hydrolysis as a mechanism for the cleavage of the Glu298Asp-variant of human endothelial nitric oxide synthase. **J Biol Chem**, 276: 26674-9, 2001.
- FARREL, A. J.; BLAKE, D. R. Nitric Oxide. **Ann Rheum Dis**, 55: 7-20, 1996.
- FELDMAN, M. W.; LEWONTIN, R. C.; KING, M. C. Race: a genetic melting-point. **Nature**, 424: 374-7, 2003.
- FOSTER, M. W.; SHARP, R. R. Race, ethnicity and genomics social classifications as proxies of biological heterogeneity. **Genome Res**, 12: 844-50, 2002
- FREEDMAN, B. I.; YU, H.; ANDERSON, P. J.; ROH, B. H.; RICH, S. S.; BOWDEN, D. W. Genetic analysis of nitric oxide and endothelin in end-stage renal disease. **Nephrol Dial Transplant**, 15: 1794-1800, 2001.
- FUKAI, T.; SIEGFRIED, M. R.; USCHIO-FUKAI, M. et al. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. **J Clin Invest**, 105: 1631–9, 2000.

- GLADWIN, M. T.; JR LANCASTER, J. R.; FREEMAN, B. A.; SCHECHTER, A. N. Nitric oxide's reactions with hemoglobin view through the SNO-storm. **Nat Med**, 9: 496-500, 2003.
- GOLSER, R.; GORREN, A. C.; MAUER, B.; SCHIMDT, K. Functional characterization of Glu298Asp mutant human endothelial nitric oxide synthase purified from a yeast expression system. **Nitric Oxide**, 8: 7-14, 2003.
- GREENBERG, S.; DIECKE, F. P.; TANAKA, T. P. Species and vascular bed responses of veins and arteries to endothelial derived relaxing factor in dog and pig. **Drug Dev Res**, 7: 299-309, 1986.
- HEMMENS, B.; MAYER, B. Enzymology of nitric oxide synthases. **Methods Mol Biol**, 100: 1-32, 1998.
- HINGORANI, A. D. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis. **Atherosclerosis**, 154: 521-7, 2001.
- HOFFMAN, A.; GLOE, T.; POHL, U. Hypoxia- induced upregulation of eNOS gene expression is redox-sensitive: a comparison between hypoxia and inhibitors of cell metabolism. **J Cell Physiol**, 188: 33-44, 2001.
- HOOPER, W. C.; LALLY, C.; AUSTIN, H; BENSON, J.; DILLEY, A.; WENGER, N.K. et. al. The relationship between polymorphisms in the endothelial cell nitric oxide synthase gene and the platelet GPIII, a gene with myocardial infarction and venous thromboembolism in African Americans. **Chest**, 116: 880-6, 1999.
- HOUGHTON, J. L.; SMITH, V. E.; STROGATZ, D. S.; HENCHES, N. L.; BREISBLATT, W. M.; CARR, A. A. Effect of African-American race and hypertensive left ventricular hypertrophy on coronary vascular reactivity and endothelial function. **Hypertension**, 29: 706-14, 1997.
- HOROWTIZ, A.; MENICE, C. B.; LAPORTE, R.; MORGAN, K. G. Mechanisms of smooth muscle contraction. **Physiol Rev**, 76: 967-1003, 1996.
- HUANG, P. L.; HUANG, Z. H.; MASHIMO, H. et.al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. **Nature**, 377: 239-42, 1995.
- IGNARRO, L. J. Biological actions and properties of endothelium –d oxide formed and released from artery and vein. **Circ Res**, 65: 1-21, 1989a.
- IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WEI, L. H. et. al. Role of the arginine–nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. **Proc Natl Acad Sci USA**, 98: 4202-8, 2001.

- IGNARRO, L. J. Haem-dependent activation of cytosolic guanylate cyclase by nitric oxide: a widespread signal transduction mechanism. **Biochem Soc Trans**, 20: 465-9, 1992.
- IGNARRO, L.; KADOWITZ, P. J. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 25: 171-9, 1985.
- ISHIKAWA, T.; HUME, J. R.; KEEFF, K. D. Regulation of Ca<sup>2+</sup> channels by cAMP and cGMP in vascular smooth muscle cells. **Circ Res**, 73: 1128–31, 1993.
- JHASON, R.; STEPHENS, J. C.; WINDENMUTH, A. The predictive power of haplotypes in clinical response. **Pharmacogenomics**, 1: 2-23, 2000.
- KALINOWSKI, L.; DOBRUCKI, I. T.; MALINSKI, T. Race-specific differences in endothelial function: predisposition of African Americans to vascular diseases. **Circulation**, 109:2511-17, 2004.
- KANNEL, W. B. Fifty years of Framingham Study contributions to understanding hypertension. **J Hum Hypertens**, 14: 83–90, 2000.
- KAUFMAN, J. S. How inconsistencies in racial classification demystify the race in public health statistics. **Epidemiology**, 10: 101-13, 1999.
- KENNEDY, R. D.; DEAPEN, R. E. Differences between Oklahoma Indian infant mortality and other races. **Public Health Rep**, 106: 97-9, 1991.
- KERWIN, J. F.; LANCASTER, J. R.; FELDMAN, P. L. I. Nitric Oxide: a new paradigm for second messengers. **J Med Chem**, 38: 4343-62, 1995.
- KHAN, B. V.; HARRISON, D. G.; OLBRYCH, M. T. Alexander R. W.; Medford R. M. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, 93: 9114–9, 1999.
- KODJA, G.; HARRISON, D. G. Interactions between NO and reactive oxygen species: Pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. **Cardiovasc Res**, 43: 562–71, 1999.
- KOPPENOL, W. H. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. **Free Radic Biol Med**, 25: 385–91, 1998.
- KRESSIN, N. T.; CHANG, B. H.; HENDRICKS, A.; KAZIZ, L. E. Agreement between administrative data and patients self reports of race/ethnicity. **Am J Public Health**, 3: 1734-9, 2003.

- KUNSCH, C.; MEDFORD, R. M. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. **Circ Res**, 85: 753–66, 1999.
- LANCASTER, J. R. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide, **Nitric Oxide**, 1: 18-30, 1997.
- LI, R.; LYN, D.; LAPU-BULA, R.; ODUWOLE, A.; IGHO-PEMU, P.; LANKFORD, B.; MORGAN, J. et. al. Regulation of endothelial nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide level, endothelial function, and blood pressure in African Americans. **Am J Hypertens**, 17: 560-7, 2004.
- LIST, B. M.; KLOSH, B.; VOLKER, C. et. al. Characterization of bovine endothelial nitric oxide synthase as a homodimer with down-regulated uncoupled NADPH oxidase activity: tetrahydrobiopterin binding kinetics and role of haem in dimerization. **Biochem J**, 323: 159-65, 1997.
- MARSDEN, P. A.; HENG, H. H.; SCHERE, S. W.; STEWART, R. J.; HALL, A. V.; SHI, X. M. et. al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. **Biol Chem**, 268-70, 1993.
- MARTINS, D.; TAREEN, N.; NORRIS, K. C. The epidemiology of end-stage renal diseases among African Americans. **Am J Med Sci**, 323: 65-71, 2002.
- MIYAMOTO, Y.; SAITO, Y.; NAKAYAMA, M.; SHIMASAK, Y.; YOSHIMURA, T.; YOSHIMURA, T. 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**, 9: 2629-37, 2000.
- MONCADA, S.; HIGGS, E. A. Furchgott, R. International Union of Pharmacology nomenclature in nitric oxide research. **Pharmacol Rev**, 49: 137-42, 1997.
- MONCADA, S.; HIGGS, E. A. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. **FASEB J**, 9:1319-30, 1995.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev**, 43: 109-42, 1991.
- MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. **The New England Journal of Medicine**, 329: 2002-12, 1993.
- MORO, M. A.; RUSSEL, J. R.; CELLESK, S. et. al. cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: Confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. **Proc Natl Acad Sci USA**, 93: 1480–5, 1996.

NAGASSAKI, S.; METZGER, I. F.; SOUZA-COSTA, D. C.; MARRONI, A. S.; UZUELLI, J. A.; TANUS-SANTOS, J. E. eNOS genotype is without effect on circulating nitrite/nitrate level in healthy male population. **Thromb Res**, 115(5): 379-9.

NAKAKI, T.; NAKAYMA, M.; KATO, R. Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. **Eur J Pharmacol Mol Pharmacol**, 189: 347–53, 1990.

NAKAYAMA, M.; YASUE, H.; YOSHIMURA, M.; SHIMASAKI, Y.; KUGIYAMA, K.; OGAWA, Y.; MIYAMOTO, Y. et al., T-786-C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. **Circulation**, 99: 2864-70, 1999.

NAKAYAMA, M.; YASUE, H.; YOSHIMURA, M.; SHIMASAKI, Y.; OGAWA, H.; KUGIYAMA, K. et al. T(-786)C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with myocardial infarction, especially without coronary organic stenosis. **Am J Cardiol**, 86: 628-34, 2000.

NG, P. C.; HEIKOFF, S. Accounting for human polymorphisms predicted to affect protein function. **Genome Res**, 12: 436-46, 2002.

NIU, X. F.; SMITH, C. W.; KUBES, P. Intracellular oxidative stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increases endothelial cell adhesion to neutrophils. **Circ Res**, 74: 1133–40, 1994.

OBERLE, S.; SCHWARTZ, P.; ABATE, A.; SCHRODER, H. The antioxidant defense protein ferritin is a novel and specific target for pentaerythryl tetranitrate in endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 261: 28–34, 1999.

O'DONELL, V. B.; FREEMAN, B. A. Interactions between nitric oxide and lipid oxidation pathways—Implications for vascular disease. **Circ Res**, 88: 12–21, 2001.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of the endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 327: 524-6, 1987.

PALMER, R. M.; Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from l-arginine. **Nature**, 333: 664-6, 1988.

- PARRA, F. C.; AMADO, R. C.; LAMBERTUCCI, J. R.; ROCHA, J.; ANTUNES, C. M.; PENA, S. D. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100: 177-82, 2003.
- POIRIER, O.; MAO, C.; MALLET, C.; NICAUD, V.; HERRMANN, S. M.; EVANS, A. et. al. Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene - no consistent association with myocardial infarction in the ECTIM study. **Eur J Clin Invest**, 29: 284-90, 1999.
- RADOMSKI, M. W.; MONCADA, S. Regulation of vascular hemostasis by nitric oxide. **Thromb Haemost**, 70: 36-41, 1993.
- RISCH, N. J. Searching for genetic determinants in the new millennium. **Nature**, 405: 847- 56, 2000.
- ROSS, R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. **New Engl J Med**, 340: 115-26, 1999.
- SHIMASAKY, Y.; YOSUE, H.; YOSHIMURA, M.; NAKAYAMA, M.; KUGIYAMA, K.; OGAWA, H. et. al. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. **J Am Cardiol**, 31: 1508-10, 1998.
- SACHIDANADAM, R.; WEISSMAN, D.; SCHIMDT, S. C. et. al. A map of human genome sequence variation containing 1,42 million single nucleotide polymorphisms. **Nature**, 409: 928-33, 2001.
- SARELI, P.; RADEVSKI, I.V.; VALTCHANOVA, Z. P.; LIBHABER, E.; CANDY, G. P.; DENHOND, E. et. al. Efficacy of different drug classes used to initiate antihypertensive treatment in black subjects: results of a randomized trial in Johannesburg, South Africa. **Arch Intern Med**, 161: 965-71, 2001.
- SAUSBIER, M.; SCHUBERT, L.; VOIGT, V. et. al. Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. **Circ Res**, 87: 825-830, 2000.
- SCHAWARTZ, R. S. Racial profiling in medical research. **N Eng J med**, 344: 1392-7, 2001.
- SENIOR, P. A.; BOPHAL, R. Ethnicity as a variable in epidemiological research. **BMJ**, 309: 327-30, 1994.
- SHIMASAKY, Y.; YASUR, H.; YOSHIMURA, M.; NAKAYAMA, M.; KUGIYAMA, K.; OGAWA, H. et. al. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol**, 31:1506-10, 1998.

SIM, A. S.; WANG, J.; WILCKEN, D.; WANG, X. L. MspI polymorphism in the promoter of the human endothelial constitutive NO synthase gene in Australian Caucasian population [letter]. **Mol Genet Metab**, 65: 62, 1998.

SIMMERMAN, H. K.; JONES, L. R. Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. **Physiol Rev**, 78: 921–47, 1998.

STEIN, C. M.; LANG, C. C.; NELSON, R.; BROWN, M.; WOOD, A. J. Vasodilation in black Americans: attenuated nitric oxide-mediated responses. **Clin Pharmacol Ther**, 62: 436-43, 1997.

STEIN, C. M.; LANG, C. C.; XIE, H. G.; WOOD, A. J. Hypertension in black people: study of specific genotypes and phenotypes will provide a greater understanding of interindividual and interethnic variability in blood pressure regulation than studies based on race. **Pharmacogenetics**, 11: 95-110, 2001.

TANNER, F.C.; MEIER, P.; GREUTER, C.; CHAMPION, E.G. Nabel and T. F. Lusher, Nitric oxide modulates expression of cell cycle regulatory proteins- a cytostatic strategy for inhibition of hu vascular smooth muscle cell proliferation. **Circulation**, 101: 1982-9, 2000.

TANUS-SANTOS, J. E.; DESAI, M.; FLOCKHART, D. A. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. **Pharmacogenetics**, 11: 719-25, 2001

TANUS-SANTOS, J. E.; DESAI, M.; DEAK, L. R.; PEZZULO, L. R.; ABERTNETHY, D. R.; FLOCKHART, D. A.; FREEDMAN, J. E. Effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on platelet function, nitric oxide release, and interactions with estradiol. **Pharmacogenetics**, 12: 407-13, 2002.

TERWILLINGER, D.; OTT, J. Handbook of linkage analysis. **The Johns Hopkins University Press**. New York, NY, 1994.

TESAURO, M.; THOMPSON, W. C. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate in position 298. **Proc Nat Acad Sci USA**, 97: 2832-35, 2000.

TREPAKOVA, E. S., COHEN, R. A., BOLOTINA, V. M. Nitric oxide inhibits capacitative cation influx in human platelets by promoting



- sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> -ATPase-dependent refilling of Ca<sup>2+</sup> stores. **Cir Res**, 84: 201-9, 1999.
- UEMATSU, M.; OHARA, Y.; NAVAS, J. P. et. al. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. **Am J Physiol**, 269: C1371-C8, 1995.
- 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**, 11: 125-8, 1998.
- VASALLE, M. Contribution of the Na-K-pump to the membrane potential. **Experientia**, 43: 1135-40, 1987.
- XIE, H. G.; KIM, R. B.; WOOD, A. J.; STEIN, C. M. Molecular basis of ethnic differences in drug disposition and response. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 41: 815-50, 2001.
- WAGONER, L.; CRAFT, L. L.; SINH, B. et. al. Polymorphisms of the beta (2)-adrenergic receptor determine exercise capacity in patients with heart failure. **Cir Res**, 86: 834-40, 2000.
- WANG, D. G.; FAN, J. B.; SIAO, C. J. et. al. Large-scale identification, mapping and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. **Science**, 280: 1077-82, 1998.
- WANG, X. L.; SIM, A. S.; BODENSHOP, R. F.; McCrede, R. M.; Wilcken, D. E. A smoking dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. **Nat Med**, 2: 41-5, 1996.
- WANG, X. L.; WANG, J. Endothelial nitric oxide synthase gen sequences variations and vascular disease. **Mol Genet Metab**, 70: 241-5, 2000.
- WOOD, A. J. Racial Differences in the Response to Drugs -- Pointers to Genetic Differences. **N Engl J Med**, 344: 1393-6, 2001.
- YOON, S.; SONG, J.; HONG, S. H.; KIM, J. Q. Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease. **Clin Chem**, 46: 1626-30, 2000.
- YOSHIMURA, M.; YASUE, H.; NAKAYAMA, M.; SHIMASAKI, Y.; KUGIYAMA, K. et. al. Genetic risk factors for coronary artery spasm: significance of

endothelial nitric oxide synthase gene T-786-C and missense Glu298Asp variants, **J Investig Med**, 48: 367-74, 2000.

YOSHIMURA, M.; YASUE, H.; NAKAYAMA, M.; SHIMASAKI, Y.; SUMIDA, H.; SUGIYAMA, S. et. al. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. **Hum Genet**, 103: 65-9, 1998.