

PÂMELA SOUZA SILVA

**“ESTUDO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS E
FARMACOGENÉTICOS DE RESPOSTA AO ENALAPRIL
EM PACIENTES HIPERTENSOS”**

CAMPINAS

Unicamp

2012



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

**“ESTUDO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS E
FARMACOGENÉTICOS DE RESPOSTA AO ENALAPRIL
EM PACIENTES HIPERTENSOS”**

PÂMELA SOUZA SILVA

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Doutor em Farmacologia, sob orientação do Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos.

CAMPINAS

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

Si38e Silva, Pâmela Souza, 1983 -
Estudo de marcadores bioquímicos e
farmacogenéticos de resposta ao enalapril em pacientes
hipertensos / Pâmela Souza Silva. -- Campinas, SP :
[s.n.], 2012.

Orientador : José Eduardo Tanus dos Santos.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Hipertensão. 2. Estresse oxidativo. 3. Óxido
nítrico. 4. Enalapril. 5. Farmacogenética. I. Santos,
José Eduardo Tanus dos. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: The study of biochemical and pharmacogenetic markers in response to enalapril by hypertensive patients.

Palavras-chave em inglês:

Hypertension

Oxidative stress

Nitric oxide

Enalapril

Pharmacogenetics

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

José Eduardo Tanus dos Santos [Orientador]

Maria de Fatima Sonati

Heitor Moreno Junior

Eduardo Barbosa Coelho

Juan Carlos Yugar Toledo

Data da defesa: 06-03-2012

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

Banca Examinadora de Tese de Doutorado

PÂMELA SOUZA SILVA

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Membros:

Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Profa. Dra. Maria de Fatima Sonati

Prof. Dr. Heitor Moreno Junior

Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho

Prof. Dr. Juan Carlos Yugar Toledo

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 06/03/2012

*Às flores mais belas do meu jardim,
minha mãe, Lídia,
e minha vovó, Taninha,*

Ofereço!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom maior, a vida.

A minha mãe, Lídia, pelo carinho e compreensão, e às minhas avós, tios, primos, padrinhos e afilhados pela enorme alegria de ter nascido nesse ninho tão especial.

Ao meu orientador, Dr. José Eduardo Tanus dos Santos pelo prazer de tê-lo conhecido, pela dedicação e confiança dispensados a mim. Obrigada pelos conselhos, pessoais e profissionais, e pelas grandes oportunidades que me ofereceu.

À grande amiga, irmã, companheira de laboratório e de vida, Vanessa Fontana. Sem você, não teria chegado aqui.

A cada um dos voluntários participantes do projeto e ao nosso colaborador, Dr. Celso Biagi, por ter vestido a camisa do nosso projeto. Aos funcionários e amigos do Centro de Saúde e Laboratório Exame de Araçatuba pela enorme ajuda, à querida Joana, funcionária da Viação Reunidas, responsável pelo trajeto semanal Ribeirão - Araçatuba, e à Nathy, pela amizade e acolhimento.

Ao professor Wilson Araújo pela colaboração no desenvolvimento desse trabalho.

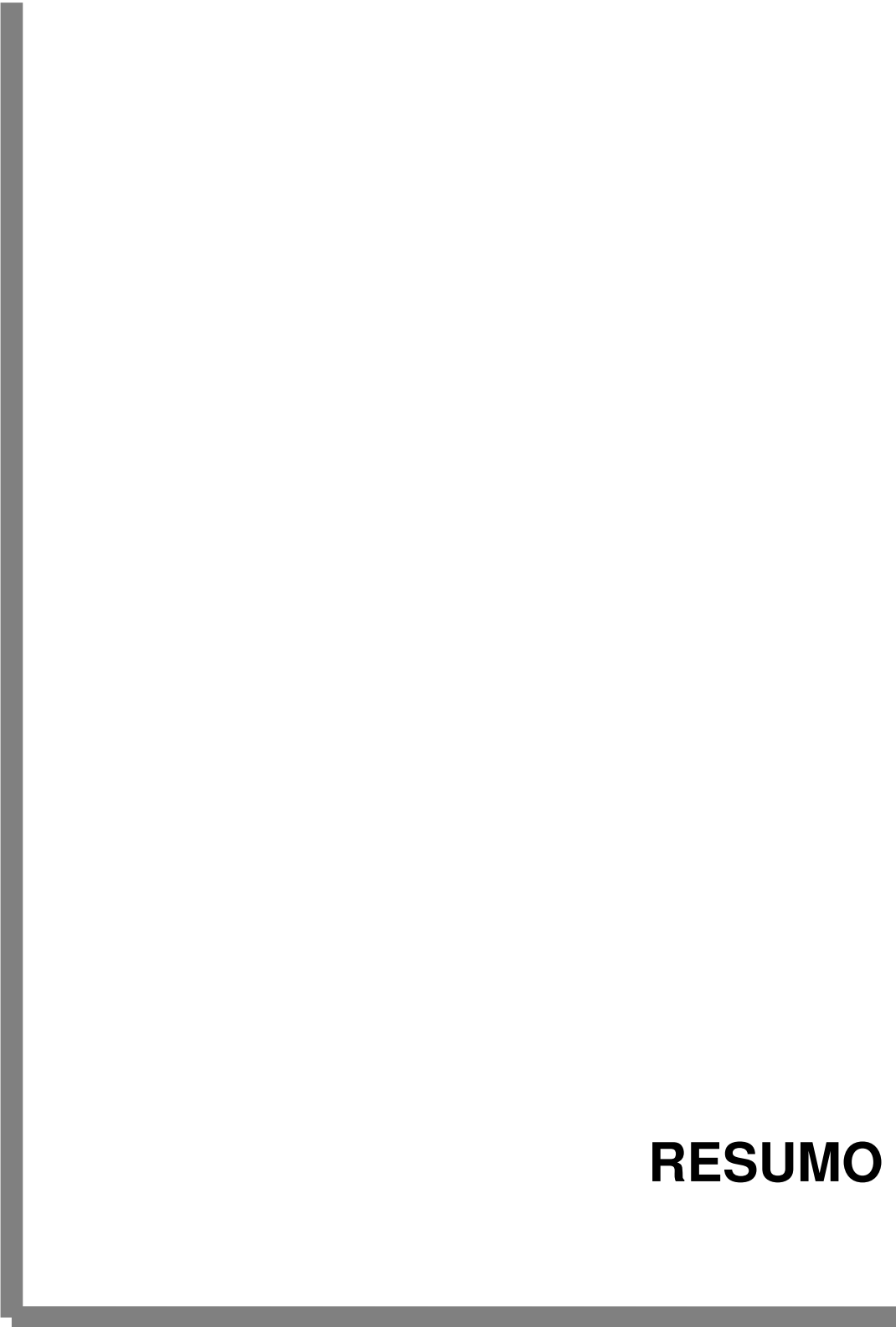
Aos grandes amigos, Vanessa Belo, Karina, Lorena, Dani, Joice, Flávia, Valzinha, Carla, Élen, Ozélia, Ana Carol, Jonas, Alisson, Evandro, Marcelo Luizon, Marcelo Montenegro, Lucas, Jefferson, Stefany, Juliana, Tatiane, Vânia, César, Anna Laura, Riccardo, Sandra e outros tantos queridos, que tornaram meus dias mais leves, alegres, divertidos, poéticos, coloridos...

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca examinadora pelas preciosas sugestões e considerações

*“O que sabemos é uma gota,
o que ignoramos é o oceano.”*

Isaac Newton

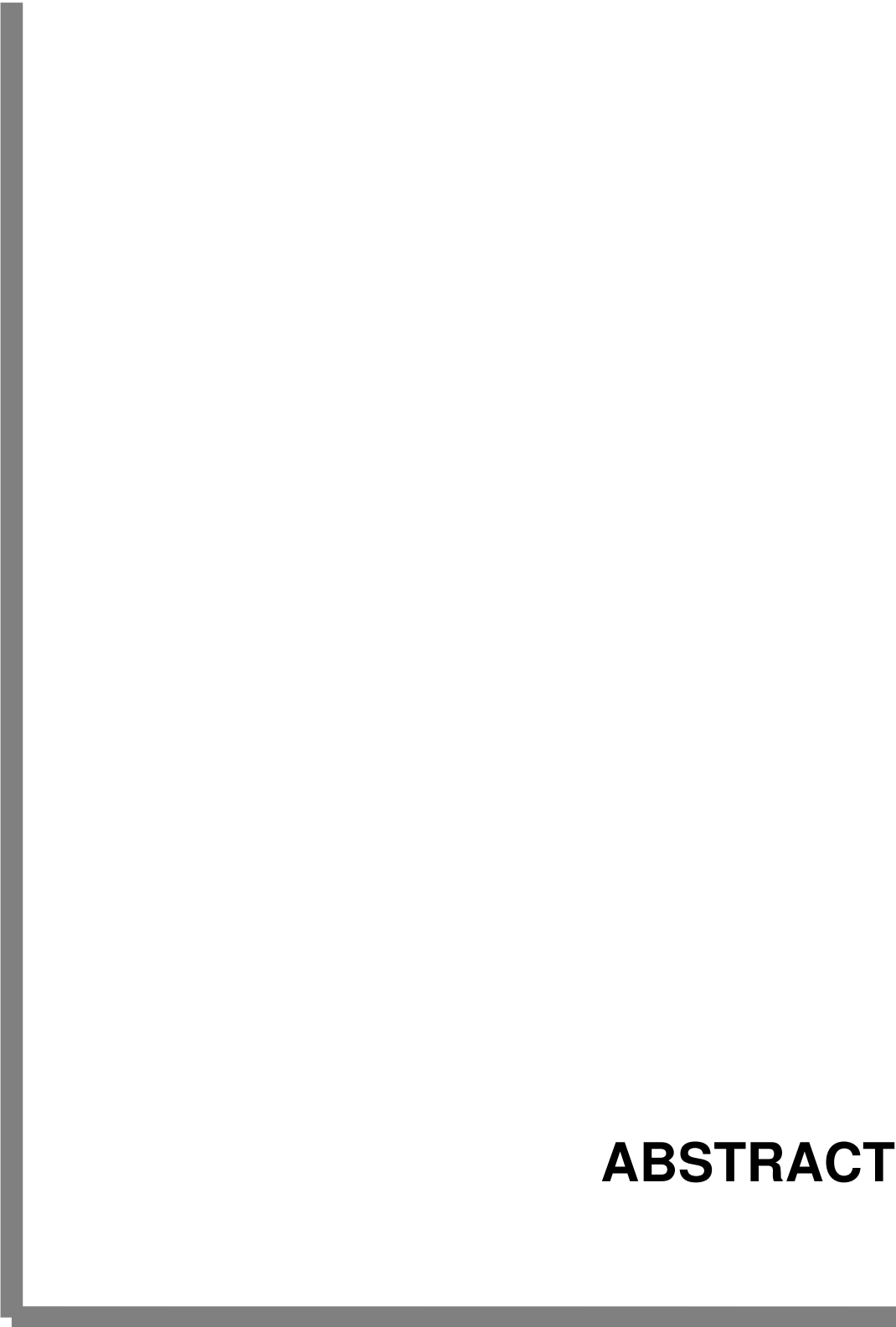


RESUMO

A hipertensão é um fator de risco bem estabelecido para doenças cardiovasculares. Embora existam muitas classes de drogas disponíveis, os inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (iECA) são uma das classes mais amplamente utilizadas. O efeito anti-hipertensivo dos iECA envolve a vasodilatação e a melhora da função endotelial através da inibição da ECA, levando a uma diminuição da formação de angiotensina II (ang II) e aumento dos níveis de bradicinina. A diminuição da pressão arterial promovida pelo iECA é explicada, ao menos em parte, pelo aumento da formação de óxido nítrico (NO) proporcionado pela bradicinina e diminuição do estresse oxidativo e vasoconstrição induzidos pela ang II. Apesar de vários estudos com modelos animais e *in vitro* evidenciarem que o tratamento com iECA promove aumento da biodisponibilidade de NO em nível tecidual, não existe consenso entre os estudos clínicos que buscam associação dos níveis circulantes dos metabólitos estáveis de NO com a resposta anti-hipertensiva a essa classe de drogas. Além disso, evidências crescentes indicam que os efeitos de drogas que aumentam a biodisponibilidade de NO são modulados por polimorfismos no gene da síntase endotelial do óxido nítrico (eNOS) e do receptor tipo 2 de bradicinina (BDKRB2). Assim, os objetivos do nosso estudo foram: **1)** Identificar possíveis associações entre o tratamento com enalapril e mudanças em marcadores relevantes relacionados ao estresse oxidativo e a formação de óxido nítrico e **2)** investigar se polimorfismos genéticos/haplótipos nos genes da eNOS e do BDKRB2 afetam a resposta anti-hipertensiva ao enalapril. Para atingir nosso primeiro objetivo, dezoito pacientes hipertensos foram tratados com enalapril por 60 dias e dezoito voluntários normotensos foram seguidos pelo mesmo período de tempo. Amostras de sangue venoso foram coletadas antes do início do tratamento e após 30/60 dias de tratamento com enalapril. As concentrações de NOx (nitrito + nitrato) no plasma foram medidas usando reação de Griess. As concentrações de nitrito no plasma e no sangue total foram determinadas por quimioluminescência. Já as concentrações das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e de 8-isoprostano no plasma foram determinadas por método fluorimétrico e ELISA, respectivamente. O tratamento com enalapril diminuiu a pressão arterial nos

pacientes hipertensos. No entanto, não encontramos mudanças estatisticamente significativas nas concentrações de NOx plasmático e nitrito medidos no plasma e sangue total nem em marcadores de estresse oxidativo em indivíduos normotensos ou pacientes hipertensos tratados com enalapril. Adicionalmente, para atingirmos o segundo objetivo proposto, nós avaliamos cento e seis pacientes hipertensos tratados com enalapril por 60 dias. A diferença entre a pressão arterial média (PAM) antes e após o tratamento anti-hipertensivo foi definida como Δ PAM. Os pacientes foram agrupados como respondedores pobres (RP) ou respondedores bons (RB) quando Δ PAM foi menor ou maior que a mediana, respectivamente. O DNA genômico foi extraído a partir do sangue total e amostras foram então genotipadas para os polimorfismos da eNOS através de reação de PCR seguida por eletroforese para o polimorfismo 4b/4a e por PCR em tempo real para os polimorfismos T⁻⁷⁸⁶C e G894T. As frequências dos haplótipos da eNOS foram estimadas pelo programa PHASE. Os polimorfismos C⁻⁵⁸T e BE1 +9/-9 e os haplótipos do gene BDKRB2 foram determinados por reação de PCR seguida por sequenciamento. Os genótipos TC/CC e o alelo C para o polimorfismo T⁻⁷⁸⁶C no gene da eNOS foram mais frequentes entre os RB quando comparado aos RP. Adicionalmente, o genótipo TT para o polimorfismo C⁻⁵⁸T no gene do BDKRB2 foi mais frequente em RP quando comparado ao grupo dos RB. Não foram encontradas outras diferenças significativas nos demais genótipos avaliados nem nos haplótipos. Esses achados nos sugerem que o polimorfismo T⁻⁷⁸⁶C no gene da eNOS e C⁻⁵⁸T no gene do BDKRB2 afetam a resposta anti-hipertensiva ao enalapril.

Palavras-chave: Hipertensão. Estresse oxidativo. Óxido nítrico. Enalapril. Farmacogenética.



ABSTRACT

Hypertension is an established risk factor in cardiovascular diseases. Although there are many available drugs, angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEi) are one of the most widely used drug class. The antihypertensive effects of ACEi involve vasodilation and improved endothelial function resulting from ACE inhibition, which lowers angiotensin II formation and increases bradykinin levels. The effect of blood pressure lowering of ACEi are explained, at least in part, by enhanced bradykinin-dependent nitric oxide (NO) formation and decreased angiotensin II-induced oxidative stress and vasoconstriction. Although previous studies in animal models or *in vitro* showed that ACEi increase NO bioavailability at tissue levels, there aren't consensus regarding clinical studies involving circulating concentrations of NO metabolites in responsiveness to antihypertensive therapy. Moreover, there is growing evidence indicating that the effects of drugs that improve NO bioavailability are modulated by polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and bradykinin type 2 receptor (BDKRB2) gene. Thus, the objectives of this study were: **1)** to identify possible associations between the treatment with enalapril and changes in relevant markers of oxidative stress and NO formation and **2)** to investigate if polymorphisms (or haplotypes) of eNOS and BDKRB2 genes affect the antihypertensive response to enalapril. To achieve our first goal, untreated hypertensive patients were treated with enalapril for 60 days and eighteen normotensive healthy controls were followed for the same period. Venous blood samples were collected at baseline and after 30/60 days of treatment with enalapril. Plasma NO_x (nitrites+nitrates) concentrations were determined by using the Griess reaction. Plasma nitrite and whole blood nitrite concentrations were determined by using an ozone-based chemiluminescence assay. Plasma thiobarbituric acid-reactive species (TBARS) and 8- isoprostane concentrations were determined by a fluorimetric method and by ELISA, respectively. The treatment with enalapril decreased blood pressure in hypertensive patients. However, we didn't find significant changes in plasma NO_x, nitrite, whole blood nitrite, and in the levels of markers of oxidative stress in both normotensive controls and hypertensive patients treated with enalapril. Moreover, to achieve our second goal, we evaluated one hundred and six hypertensive

patients treated with enalapril for 60 days. The difference between the mean arterial pressure (MAP) before and after the antihypertensive treatment was defined as Δ MAP. The patients were classified as poor responders (PR) or good responders (GR) when their Δ MAP were below or above the median value, respectively. Genomic DNA was extracted from whole blood, and then the genotypes for eNOS were determined by PCR followed by electrophoresis for 4b/4a polymorphism and by real time PCR for T⁻⁷⁸⁶C and G894T polymorphisms. The eNOS haplotype frequencies were determined by the programs PHASE. The C⁻⁵⁸T and BE1 +9/-9 polymorphisms of BDKRB2 gene and their haplotypes were determined using PCR amplification, followed by DNA sequencing. The TC/CC genotypes and the C allele for the T⁻⁷⁸⁶C polymorphism of eNOS gene were more frequent in GR, compared with PR patients. Furthermore, the TT genotype for the C⁻⁵⁸T polymorphism of BDKRB2 gene were more frequent in PR when compared with GR. No other significant differences in genotypes or haplotypes were found. These findings suggest to us that both T⁻⁷⁸⁶C polymorphism of eNOS gene and C⁻⁵⁸T polymorphism of BDKRB2 gene affect the antihypertensive response to enalapril.

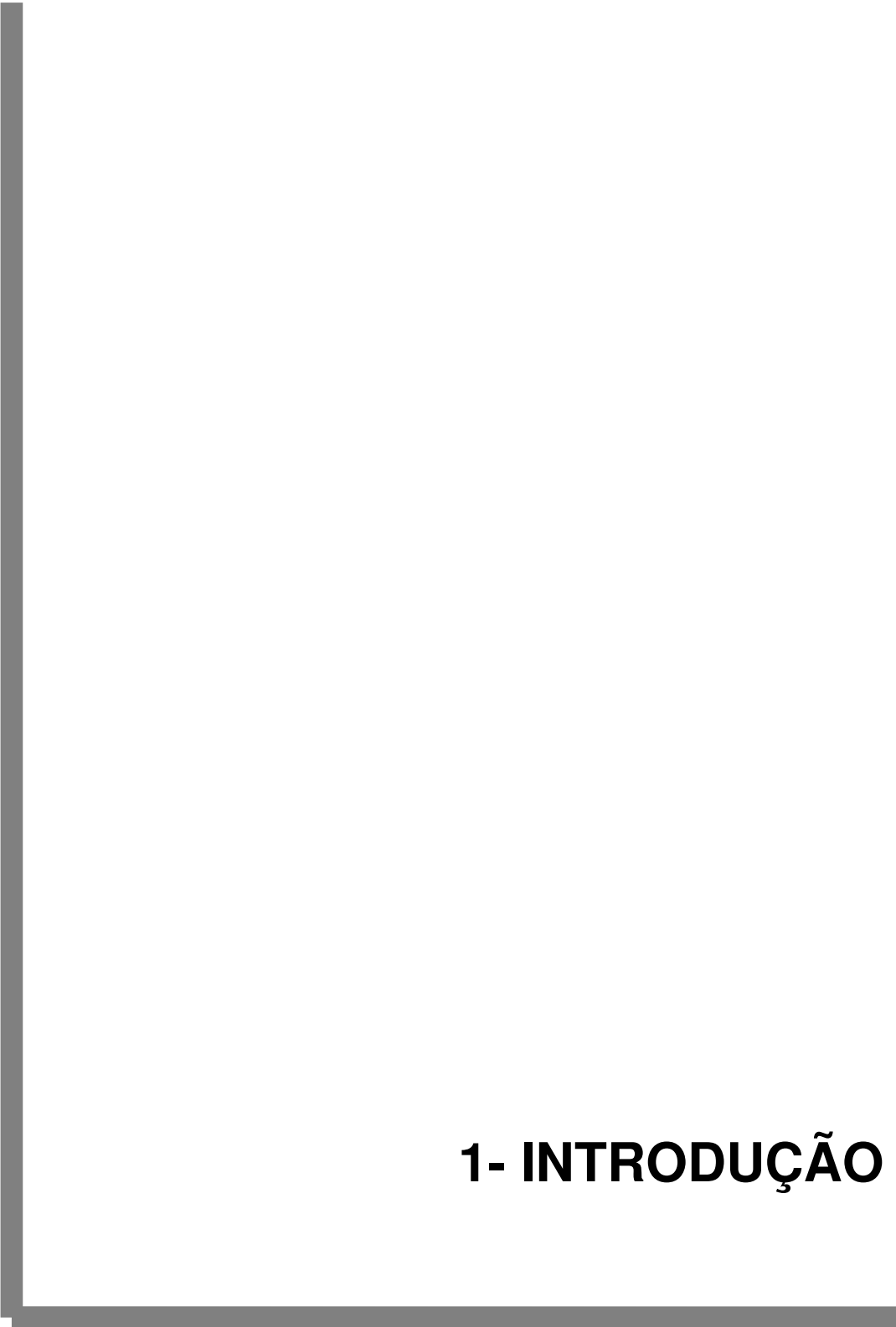
Key-words: Hypertension. Oxidative stress. Nitric oxide. Enalapril. Pharmacogenetics.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

Ang-	Angiotensina
Asp-	Aspartato
BDKRB2-	Receptor tipo 2 de bradicinina
BK-	Bradicinina
C-	Citosina
ECA-	Enzima Conversora de Angiotensina
Enos-	Sintase endotelial do óxido nítrico
G-	Guanina
Glu-	Glutamato
HAS-	Hipertensão Arterial Sistêmica
iECA-	Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina
NOx-	Nitrito + nitrato
PA-	Pressão arterial
PAD-	Pressão Arterial Diastólica
PAM-	Pressão Arterial Média
PAS-	Pressão Arterial Sistólica
PCR-	<i>Polimerase chain reaction</i> - reação em cadeia da polimerase
RB-	Respondedores bons

RP-	Respondedores pobres
ROS-	<i>Reactive Oxygen Species</i> - Espécies Reativas de Oxigênio
SNP-	<i>Single nucleotide polymorphism</i> - polimorfismo de base única
T-	Timina
TBARs-	<i>Thiobarbituric acid-reactive species</i> - espécies reativas de ácido tiobarbitúrico
VNTR-	<i>Variable Number of Tandem Repeat</i> - número variável de repetições em tandem.
%	Porcentagem

	Pág.
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	x
1- INTRODUÇÃO GERAL.....	16
1.1- Hipertensão: um problema de saúde pública.....	17
1.2- Farmacologia dos iECA.....	18
1.3- Modulação do óxido nítrico pelos iECA.....	19
1.4- Polimorfismos genéticos da eNOS envolvidos na resposta a drogas de ação cardiovascular.....	20
2- OBJETIVOS.....	24
3- CAPÍTULOS.....	26
3.1- Capítulo 1.....	27
3.2- Capítulo 2.....	34
3.3- Capítulo 3.....	43
4- DISCUSSÃO GERAL.....	67
5- CONCLUSÃO GERAL.....	73
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
7- ANEXOS.....	87
7.1- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	88
7.2- Termos de Consentimento Livre e Esclarecido.....	89



1- INTRODUÇÃO

1.1- Hipertensão: um grave problema de saúde pública

As doenças cardiovasculares constituem importante causa de morte e incapacidade no mundo todo [1]. No Brasil, segundo os dados do ano de 2009, as doenças do aparelho circulatório contribuem com 29% dos óbitos para todas as faixas etárias, sendo a principal causa de morte (www.datasus.gov.br).

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é o principal fator de risco modificável para doenças cardiovasculares [2], constituindo uma das principais causas evitáveis de morte [3]. A mortalidade cardiovascular atribuída à HAS corresponde a quase 6% do total de mortes ocorridas no mundo anualmente [4]. Sendo assim, o tratamento e o controle adequados da HAS são de fundamental importância para a redução da morbidade e mortalidade cardiovasculares [5,6].

A maioria dos hipertensos, além da redução do peso corporal, da restrição alimentar e da prática de exercícios físicos regularmente, necessita do controle da pressão arterial por drogas anti-hipertensivas [7-9]. Dentre as drogas disponíveis no mercado, os inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA) são amplamente usados na terapia da hipertensão e infarto do miocárdio. Estudos clínicos têm confirmado que tais medicamentos diminuem a mortalidade e morbidade de pacientes com insuficiência cardíaca [10,11], além de serem relevantes no processo de remodelamento ventricular esquerdo após infarto agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca [12,13].

Apesar de os iECA apresentarem diversos efeitos benéficos ao sistema cardiovascular, o mecanismo preciso pelo qual eles desempenham essa função ainda não foi completamente elucidado. É bem estabelecido que os riscos de eventos cardiovasculares são reduzidos pelo uso de drogas que promovem diminuição dos valores pressóricos, sendo que a amplitude dessa redução é um importante determinante do efeito benéfico destes tratamentos. Adicionalmente, dados coletados de 17 ensaios clínicos, envolvendo cerca de 100 mil indivíduos tratados com iECA, indicam que o tratamento com essa classe de drogas provê uma redução do risco de eventos cardiovasculares por mecanismos independentes da redução da pressão arterial [14].

1.2- Farmacologia dos iECA

A Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), também denominada cininase II, dipeptidil carboxipeptidase ou peptidildipeptídeo hidrolase, possui diferentes substratos. Estes incluem a Angiotensina I [Ang I, Ang-(1-10)], que é convertida em Ang II (Ang-1-8), um potente vasoconstritor capaz de regular a pressão sanguínea, dos fluidos e a homeostase de eletrólitos; e a bradicinina (1-9) [BK-(1-9)], um potente vasodilatador que é convertido em BK-(1-7), um metabólito inativo.

Assim, a redução da formação de Ang II a partir da Ang I e o aumento dos níveis de cininas pela diminuição da sua degradação através da inibição da ECA, promovem o aumento da vasodilatação e melhora da função endotelial [15]. É bem estabelecido que a Ang II aumenta a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelas células da musculatura lisa vascular [16], demonstrando o envolvimento do estresse oxidativo na patogênese de várias doenças cardiovasculares, inclusive na hipertensão. O ânion superóxido, considerado o ROS primário, interage com outras moléculas, como o NO[•], resultando na formação de peroxinitrito, envolvido no desenvolvimento da hipertensão [17]. Níveis elevados de superóxido foram associados à supressão da formação de NO em anéis de aorta em modelos animais de hipertensão. O prejuízo na formação de NO pelas células endoteliais gera um quadro de disfunção endotelial, um importante fator no desenvolvimento da hipertensão [16].

Dessa forma, a diminuição do estresse oxidativo via Ang II e o aumento da biodisponibilidade de NO parecem ser, ao menos em parte, responsáveis pelos efeitos cardioprotetores adicionais à diminuição da pressão arterial promovido pelos iECA [18-27].

1.3- Modulação do óxido nítrico pelos iECA

Diversos mecanismos são atribuídos ao aumento da biodisponibilidade de NO promovido pelos iECA, no entanto, o aumento do nível de cininas, principalmente a bradicinina (BK), desempenha papel central nesse efeito. A ação da BK é em parte mediada pela ligação aos seus receptores B2 que, através do aumento da concentração de cálcio intracelular e/ou fosforilação de resíduos de serina na posição 1177 da sintase endotelial do óxido nítrico (eNOS), promovem ativação da enzima com consequente produção de NO [26,28]. Foi observado aumento da concentração dos metabólitos do NO (NOx=nitrito+nitrato) no sobrenadante de células endoteliais após incubação com diversos iECA, enquanto tal efeito foi completamente abolido após incubação concomitante com D-Arg-[Hyp³,Thi^{5,8}, D-phe⁷]-BK, um antagonista do receptor B2 [29]. Além de promover aumento da atividade da enzima, estudos em humanos e roedores têm demonstrado que a ligação das cininas aos seus receptores também ativam a via do NO através da modulação da expressão da eNOS [30-32]. Foram demonstrados níveis próximos de mRNA da eNOS em ratos controles e hipertensos tratados com enalapril, no entanto, foi observada significativa diminuição do mRNA da eNOS na aorta de ratos hipertensos tratados concomitantemente com enalapril e icatibant, um antagonista do receptor B2 [33].

Além disso, um metabólito da BK (des-Arg⁹-BK), formado a partir da ação de carboxipeptidases, também é capaz de promover o aumento da biodisponibilidade de NO através da ativação de seus receptores B1. Adicionalmente, os receptores B1 parecem ser diretamente ativados pelos iECA levando ao aumento de NO por um mecanismo semelhante àquele descrito para o agonista des-Arg⁹-BK [34]. Além disso, outro mecanismo descrito capaz de promover aumento das concentrações de NO ocorre através da interação entre a ECA e os receptores tipo 2 de BK (BDKRB2). Ao se ligarem à ECA, os iECA promovem uma mudança conformacional da enzima, que fica ancorada na membrana celular, favorecendo a interação da BK ao seu receptor, potencializando, assim, o efeito da BK [34].

Ainda que diversos mecanismos sejam propostos para o aumento da biodisponibilidade de NO pelos iECA, não se sabe quanto cada via contribui para esse efeito.

Apesar de vários estudos *in vitro* e em diversos modelos animais evidenciarem que o tratamento com iECA promove aumento da biodisponibilidade de NO, estudos clínicos apresentam resultados conflitantes em relação aos níveis circulantes de metabólitos do NO - nitrato ou NOx - em pacientes hipertensos. Alguns estudos mostram altos níveis de metabólitos do NO [35-39], enquanto outros estudos mostram menores quantidades desses marcadores [40-42] após terapia com iECA.

Além dos iECA, várias outras classes de drogas usadas no tratamento de doenças cardiovasculares, como os antagonistas do receptor de Ang II, os bloqueadores dos canais de cálcio e inibidores da 3-metilglutaril coenzima A redutase (estatinas) também promovem o aumento da biodisponibilidade de NO [43-45]. Em parte, essa resposta parece estar associada a polimorfismos da eNOS, o que nos sugere que tais polimorfismos poderiam também modular a resposta aos iECA

1.4- Polimorfismos genéticos da eNOS envolvidos na resposta a drogas de ação cardiovascular

Polimorfismos genéticos são variações específicas na sequência de bases nitrogenadas do DNA, cuja frequência seja igual ou superior a 1% na população [46]. O tipo mais comum de variação genética é a substituição de apenas 1 base nitrogenada por outra, chamado de SNP (*single nucleotide polymorphisms*). Tal modificação na sequência de DNA pode conduzir a alterações na sequência de aminoácidos, levando à produção de uma proteína alterada, ou ainda a modificações na taxa de transcrição gênica.

A enorme importância do NO na manutenção da homeostase do sistema cardiovascular estimulou a procura de variações no gene (polimorfismos) que codifica a eNOS, as quais poderiam explicar diferentes níveis de atividade desta enzima e, possivelmente, um maior risco ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, tais como hipertensão, espasmo coronariano, doenças cerebrovasculares, pré-eclâmpsia, trombose venosa profunda e infarto agudo do miocárdio [47-53].

Dentre os polimorfismos identificados para o gene da eNOS, três são amplamente estudados e apresentam grande relevância clínica: o polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) na região promotora T⁻⁷⁸⁶C, que pode conter uma base T (alelo mais comum) ou C (alelo mais raro); o segundo corresponde a um número variável de repetições em tandem (VTNR) de 27pb no intron 4, sendo que os alelos mais frequentes apresentam 4 cópias (alelo a, mais raro) ou 5 cópias (alelo b, mais comum); e o terceiro é um SNP no exon 7 (G⁸⁹⁴T) que ocorre através da substituição do nucleotídeo G pelo nucleotídeo T na posição 894 do gene da eNOS, resultando na conversão do glutamato para aspartato na posição 298 (Glu298Asp) da enzima [54]. As possíveis implicações funcionais desses três polimorfismos estão resumidas na Figura 1 do nosso artigo de revisão localizado no Capítulo 2 da tese.

No polimorfismo T⁻⁷⁸⁶C, a ocorrência do alelo C no promotor do gene da eNOS reduz em mais de 50% a atividade promotora em células em cultura, o que reflete a diminuição nos níveis celulares de mRNA para eNOS, e consequentemente, de eNOS (Figura 1a e 1b; Capítulo 2) [55,56]. Adicionalmente, foi identificada menor produção plaquetária de NO em indivíduos portadores do alelo C que em indivíduos não portadores deste alelo [57]. Células endoteliais com o genótipo CC tratadas com estatinas apresentaram maiores níveis de mRNA para eNOS que as células portadoras do genótipo TT [58]. Além disso, este polimorfismo mostrou ação moduladora sobre o aumento da biodisponibilidade do NO, a diminuição do estresse oxidativo e os efeitos antiinflamatórios produzidos em pacientes tratados com atorvastatina [59,60].

Tais achados indicam que essa estatina poderia ser mais relevante para a prevenção de eventos cardiovasculares em indivíduos com o genótipo CC do que em indivíduos com genótipo TT.

O polimorfismo no intron 4, possivelmente associado à formação de um pequeno RNA que interfere na expressão do gene da eNOS (Figura 1c e 1d; Capítulo 2), também parece modular a resposta às estatinas. Os indivíduos portadores do alelo “a” tratados com pravastatina mostraram significativa melhora da vasodilatação induzida por adenosina quando comparados aos indivíduos tratados com a estatina portadores genótipo “bb”, provavelmente pelo maior aumento da produção de NO pelo endotélio nos indivíduos com o alelo raro [61].

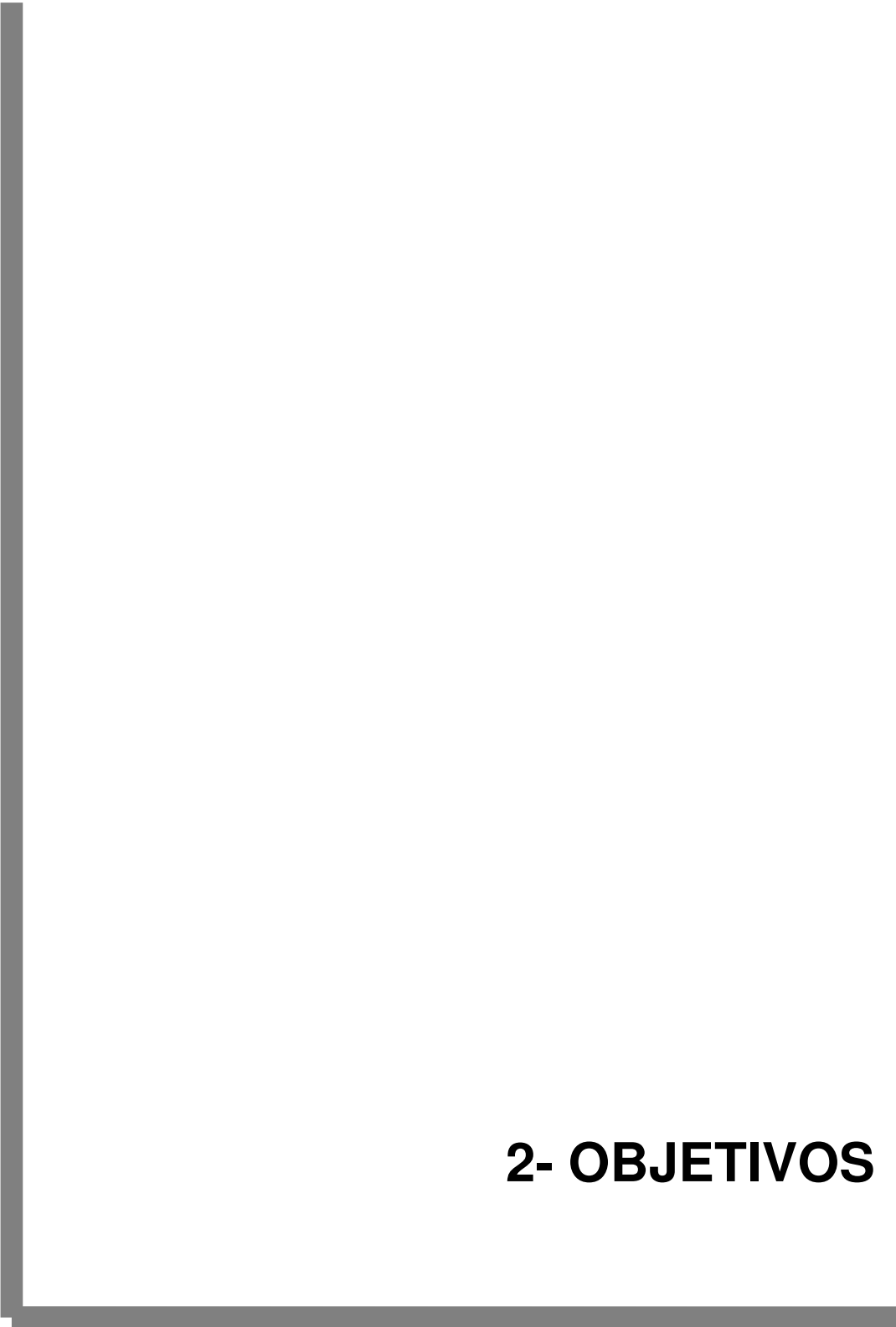
O polimorfismo Glu298Asp está associado à alteração da atividade da eNOS (Figura 1e e 1f; Capítulo 2). Células portadoras do alelo Asp apresentam menor disponibilidade da enzima na cavéola ($\downarrow$ eNOS/Caveolina-1). Uma vez que a localização celular da eNOS e sua ligação à caveolina-1 desempenham papel fundamental para ativação da enzima, indivíduos portadores do alelo raro estão associados à menor produção de NO. Tal polimorfismo também parece modular a resposta a alguns fármacos. A presença do alelo Asp parece estar associada ao pior padrão de resposta quando comparada à indivíduos portadores do alelo Glu [57,62-64]. Pacientes homozigotos para o alelo Glu tratados com hidroclorotiazida mostraram maior redução da pressão arterial quando comparados aos pacientes portadores do alelo Asp [62].

A maioria dos estudos realizados até então consideram a contribuição de apenas um polimorfismo no desenvolvimento de doenças ou resposta a fármacos e não de uma combinação desses polimorfismos (haplótipos), que é uma abordagem muito mais informativa. Atualmente, acredita-se que a análise simultânea de um conjunto de polimorfismos numa dada região do gene, ou seja, o haplótipo é mais informativa do que a análise individual de cada polimorfismo [65-70].

Adicionalmente, outros polimorfismos/haplótipos em outros genes candidatos também podem afetar a resposta a fármacos de ação cardiovascular. Em função do mecanismo de ação dos iECA, o gene do receptor tipo 2 de bradicinina (BDKRB2) torna-se um importante candidato a ser investigado.

Grande parte dos estudos envolvendo esse gene centra-se em dois polimorfismos: um deles compreende uma troca de uma citosina (C) por uma timina (T) na posição 58 da região promotora do gene, enquanto o outro avalia a presença (+9) ou ausência (-9) de uma sequência de 9 pb no exon 1 não codificante. Apesar de os efeitos funcionais desses polimorfismos não estarem completamente elucidados, parecem estar associados a alterações na taxa de transcrição gênica [71]. A presença do alelo +9 foi associada com diminuição da transcrição do gene do receptor B2 e maior pressão sistólica quando comparado ao alelo -9 [72,73]. Em contrapartida, um recente estudo envolvendo grande número de brasileiros sugere que o alelo -9 poderia conferir susceptibilidade à hipertensão, uma vez que está associado à maior pressão diastólica [74]. Além disso, tal polimorfismo parece influenciar na resposta vasodilatadora dependente de BK durante inibição da ECA [75]. Voluntários saudáveis portadores do genótipo +9/+9 apresentaram menor fluxo sanguíneo no antebraço e menor vasodilatação em resposta a BK, durante administração do enalaprilato, que indivíduos portadores do alelo -9.

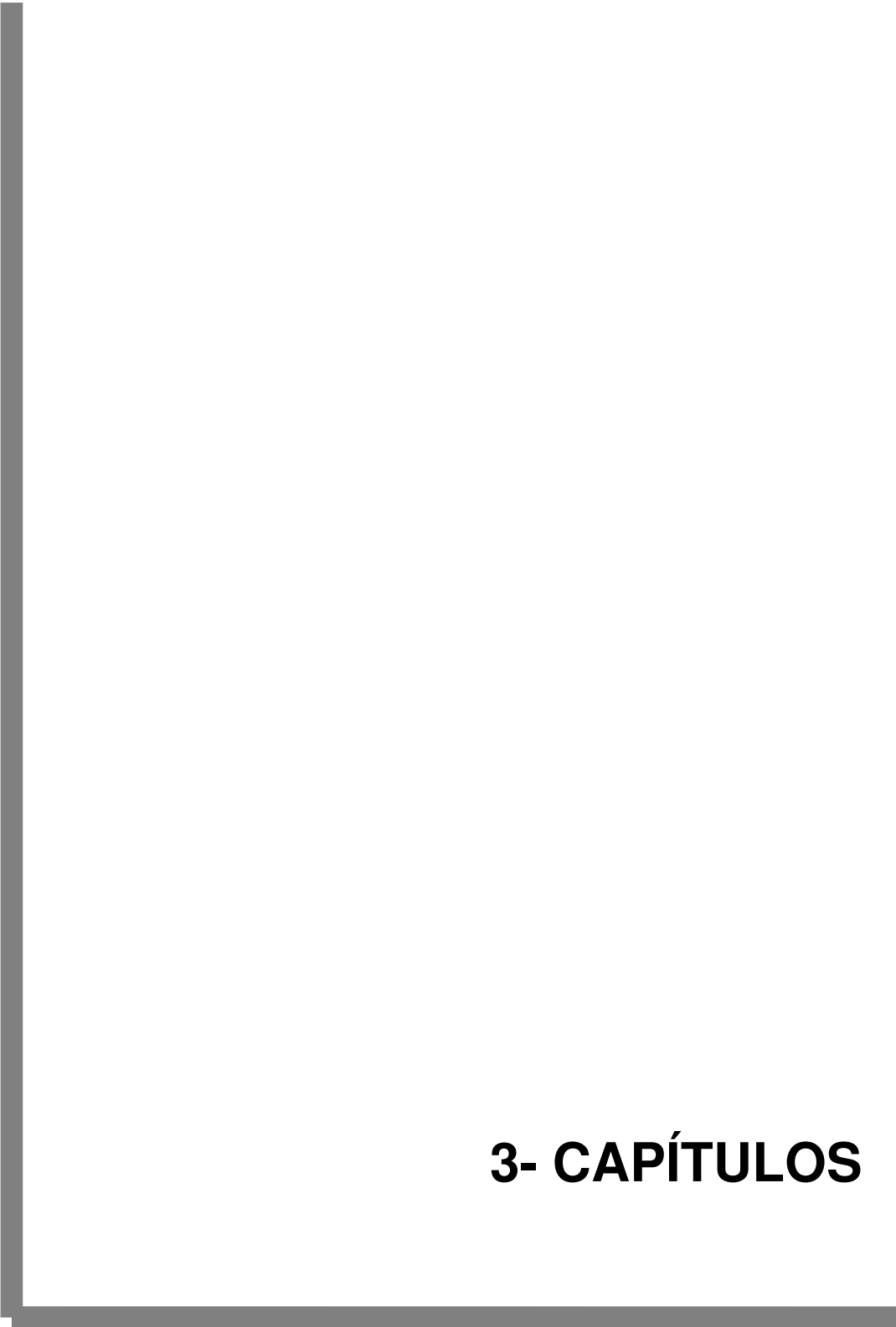
Conforme descrito nos tópicos anteriores, experimentos *in vitro* ou com modelos animais evidenciam o aumento da biodisponibilidade de NO proporcionada pelos iECA, no entanto, não existe consenso entre os estudos clínicos que buscam associação dos níveis circulantes dos metabólitos estáveis de NO com a resposta a essa classe de drogas. Além disso, não se sabe se polimorfismos em genes relacionados à via de ação dessa classe de fármacos (como o gene da eNOS e do BDKRB2) são capazes de modular a resposta anti-hipertensiva ao enalapril, um conhecido e muito utilizado iECA.



2- OBJETIVOS

Os objetivos do nosso estudo foram:

- 2.1-** Identificar possíveis associações entre os níveis sanguíneos dos marcadores bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo e ao óxido nítrico com a resposta anti-hipertensiva ao enalapril (Capítulo 1).
- 2.2-** Identificar possíveis associações entre polimorfismos genéticos/haplótipos nos genes da eNOS e do BDKRB2 com a resposta ao tratamento anti-hipertensivo com enalapril (Revisão da literatura: Capítulo 2 e Parte Experimental: Capítulo 3).



3- CAPÍTULOS

CAPÍTULO 1

**ANTIHYPERTENSIVE EFFECTS EXERTED BY ENALAPRIL
IN MILD TO MODERATE HYPERTENSION ARE NOT
ASSOCIATED WITH CHANGES IN THE CIRCULATING
LEVELS OF NITRIC OXIDE-RELATED MARKERS**

Antihypertensive effects exerted by enalapril in mild to moderate hypertension are not associated with changes in the circulating levels of nitric oxide-related markers

Pamela S. Silva · Vanessa Fontana · Ana C. T. Palei ·
Jonas T. C. Sertório · Celso Biagi ·
Jose Eduardo Tanus-Santos

Received: 19 November 2010 / Accepted: 17 January 2011 / Published online: 9 February 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract

Purpose The antihypertensive effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEi) are explained, at least in part, by enhanced bradykinin-dependent nitric oxide (NO) formation and decreased angiotensin II-induced oxidative stress and vasoconstriction. We examined for the first time whether treatment with enalapril increases the plasma levels of markers of NO formation and decreases oxidative stress in mild to moderate hypertensive patients.

Methods Eighteen untreated hypertensive patients were treated with enalapril 10 mg/day ($n=10$) or 20 mg/day ($n=8$) for 60 days. Eighteen normotensive healthy controls were followed for the same period. Venous blood samples were collected at baseline and after 30/60 days of treatment with enalapril. Plasma NOx (nitrites+nitrates) concentrations were determined by using the Griess reaction. Plasma nitrite

and whole blood nitrite concentrations were determined by using an ozone-based chemiluminescence assay. Plasma thiobarbituric acid-reactive species (TBARS) and 8-isoprostane concentrations were determined by a fluorimetric method and by ELISA, respectively.

Results Treatment with enalapril decreased blood pressure in hypertensive patients. However, we found no significant changes in plasma NOx, nitrite, whole blood nitrite, and in the levels of markers of oxidative stress in both normotensive controls and hypertensive patients treated with enalapril.

Conclusions Our data show that enalapril 10–20 mg/day does not affect the concentrations of relevant markers of NO formation or markers of oxidative stress in mild to moderately hypertensive subjects, despite satisfactory blood pressure control. Our findings do not rule out the possibility that ACEi may produce such effects in more severely hypertensive patients treated with higher doses of ACEi.

P. S. Silva · A. C. T. Palei · J. T. C. Sertório
Department of Pharmacology, Faculty of Medicinal Sciences,
University of Campinas, State University of Campinas,
Campinas, SP, Brazil

V. Fontana · J. E. Tanus-Santos (✉)
Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirão
Preto, University of São Paulo,
Av. Bandeirantes, 3900,
14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil
e-mail: tanus@fmrp.usp.br

J. E. Tanus-Santos
e-mail: tanussantos@yahoo.com

C. Biagi
Santa Casa of Araçatuba,
Araçatuba, SP, Brazil

Keywords ACE inhibitors · Enalapril · Nitric oxide ·
Oxidative stress · Hypertension

Introduction

Hypertension is a major risk factor associated with cardiovascular events, and a number of different drugs can be used to treat it. While many drugs are available, angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEi) are known to exert many beneficial effects that reduce mortality and morbidity in patients with cardiovascular disorders [1]. The antihypertensive effects of ACEi involve vasodilation and improved endothelial function resulting from ACE inhibition, which lowers angiotensin II formation and increases bradykinin

levels [2]. Bradykinin, in turn, stimulates receptors on endothelial cells causing the release of vasodilators such as nitric oxide (NO), prostacyclin, and endothelium-derived hyperpolarizing factor EDHF [3]. Therefore, it is generally accepted that ACEi decrease the blood pressure in hypertensive patients, at least in part, by enhancing bradykinin-dependent NO formation and by decreasing angiotensin II-induced oxidative stress and vasoconstriction [3–6].

Previous clinical studies showed increased circulating nitrates or NOx (nitrates+nitrites) levels, suggesting that ACEi increase NO bioavailability in hypertensive patients [7–12]. However, nitrates or NOx concentrations are influenced by a variety of NO synthase-independent factors including diet, clinical conditions, medications, smoking, and environmental chemicals [13], thus limiting the clinical utility of measuring nitrates or NOx levels to assess endogenous NO production. Therefore, there is only very limited clinical evidence indicating that ACEi increase NO bioavailability. In contrast with NOx or nitrate levels, plasma or whole blood nitrite concentrations have been shown to reflect endogenous NO formation and to reflect endothelial function under normal or pathological conditions [14–18]. However, no previous study has examined whether ACEi increase the circulating levels of nitrite in plasma or whole blood from hypertensive patients. In the present study, we evaluated whether treatment with enalapril increases nitrite levels in plasma or in whole blood samples from mild to moderate hypertensive patients. We have also examined the effects of this treatment on plasma NOx concentrations and on markers of oxidative stress.

Materials and methods

Study subjects

This study was approved by the Institutional Review Board at the Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Brazil, and each subject provided written informed consent. The present work was carried out in accordance with the ethics standards of the Helsinki Declaration. Eighteen untreated hypertensive patients were recruited at the Cardiology Division from the Araçatuba Health Center at Araçatuba (SP, Brazil). Eighteen normotensive, healthy controls were recruited from the general public. All the subjects provided a complete health history and underwent physical examination and laboratory analysis to exclude individuals with evidence of severe or secondary hypertension, other concomitant cardiovascular diseases, or respiratory, hepatic, renal, or hematological dysfunction. None of the patients or healthy controls had a smoking habit or were given any additional antihypertensive medications or drugs during the study.

Study design

After the initial evaluation, patients were treated with enalapril 10 mg/day ($n=10$) or 20 mg/day ($n=8$) for 60 days. Normotensive healthy controls were followed for the same period. Venous blood samples were collected after overnight (>12 h) fasting into heparin Vacutainer tubes (Becton-Dickinson Sao Paulo, Brazil) before the treatment and 30 and 60 days after the treatment with enalapril was started. Healthy volunteers were sampled at the same time intervals as hypertensive patients.

Blood samples used to assess whole blood nitrite concentrations were immediately mixed with a nitrite preservative solution containing 0.8 M ferricyanide and 1% NP-40 in a 5:1 dilution, as previously described and stored at -20°C [19]. Blood samples used to assess plasma thiobarbituric acid-reactive species (TBARS), 8-isoprostane, nitrite, and NOx (nitrate+nitrite) were centrifuged at 1,000 g for 3 min, and plasma aliquots were immediately stored at -70°C until analyzed as described below.

Measurement of plasma TBARS and 8-isoprostane

To evaluate oxidative stress, plasma TBARS were determined by a fluorimetric method as previously described [20]. In addition, to further study oxidative stress, plasma 8-isoprostane (8-isoPGF_{2 α}) concentrations were determined with commercially available enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), according to manufacturer's instructions.

Measurement of plasma NOx and nitrite and whole blood nitrite concentrations

The plasma NOx concentrations were determined in duplicate by using the Griess reaction as described previously [21, 22]. Briefly, 40 μL of plasma was incubated with the same volume of nitrate reductase buffer [0.1 M potassium phosphate, pH 7.5, containing 1 mM beta nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), and 2 units/mL of nitrate reductase] in individual wells of a 96-well plate. Samples were allowed to incubate overnight at 37°C in the dark. To each well, 80 μL of freshly prepared Griess reagent (1% sulphanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride in 5% phosphoric acid) was added, and the plate was incubated for an additional 15 min at room temperature. A standard nitrate curve was obtained by incubating sodium nitrate (0.2–200 μM) with the same reductase buffer. The total nitrite recovery was >98%, and absorbances were measured at 540 nm using a microplate reader.

Plasma nitrite content was analyzed in triplicate using an ozone-based chemiluminescence assay as previously de-

scribed [15, 23]. Briefly, 100 μ l of plasma samples were injected into a solution of acidified tri-iodide, purged with nitrogen in-line with a gas-phase chemiluminescence NO analyzer (Sievers Model 280 NO Analyzer, Boulder, CO, USA). Approximately 8 ml of tri-iodide solution (2 g potassium iodide and 1.3 g iodine dissolved in 40 ml water with 140 ml acetic acid) was placed in the purge vessel into which plasma samples were injected. The tri-iodide solution reduces nitrite to NO gas, which is detected by the NO analyzer.

To measure nitrite concentrations in whole blood, the samples were deproteinated with a 1:1 volume of cold methanol and centrifuged at 14,000 g for 5 min. Nitrite was measured by injecting 200 μ l of the supernatant into a solution of acidified tri-iodide, purged with nitrogen in-line with a gas-phase chemiluminescence NO analyzer as described above.

Statistical analysis

The clinical and laboratory characteristics are expressed as mean $\pm$ SD. Comparisons between groups were performed with unpaired Student's t test. The other biochemical parameters were represented as box and whisker plots showing range, quartiles, and the median. These parameters were compared between groups with Mann-Whitney tests. The effects of treatment (in hypertensives) or of time (in normotensives) were evaluated by Friedman test. A probability value <0.05 was considered the minimum level of statistical significance.

Results

Clinical and laboratory characteristics of healthy controls and hypertensive patients are shown in Table 1. As expected, hypertensive patients had higher systolic and diastolic blood pressure than normotensive controls ($P<0.05$; Table 1). No other significant differences were found between the two study groups (Table 1).

Treatment with enalapril decreased both systolic and diastolic blood pressure in hypertensive patients, and this effect was significant after 30 days of treatment ($P<0.005$; Fig. 1). Because we found no significant differences in the responses of hypertensive patients to enalapril 10 or 20 mg/day (data not shown), we reported all the results together (Figs. 1, 2, and 3).

We found no significant differences between groups and no significant changes in plasma levels of markers of oxidative stress (TBARS and 8-isoprostane) in either normotensive controls or in hypertensive patients treated with enalapril for 60 days (Fig. 2a, b, respectively; both $P>0.05$).

Table 1 Clinical and laboratory characteristics of study subjects

	Normotensives	Hypertensives
Number	18	18
Age (years)	45 $\pm$ 14	45 $\pm$ 13
BMI (kg/m ²)	27.5 $\pm$ 5.4	29.3 $\pm$ 6.0
SBP (mmHg)	121 $\pm$ 9	145 $\pm$ 11*
DBP (mmHg)	77 $\pm$ 10	92 $\pm$ 8*
HR (beats/min)	78 $\pm$ 12	74 $\pm$ 8
Total cholesterol (mg/dL)	213 $\pm$ 55	194 $\pm$ 44
LDL cholesterol (mg/dL)	137 $\pm$ 49	125 $\pm$ 34
HDL cholesterol (mg/dL)	51 $\pm$ 12	46 $\pm$ 9
Triglycerides (mg/dL)	122 $\pm$ 60	157 $\pm$ 63
Glucose (mg/dL)	87 $\pm$ 11	90 $\pm$ 7
Creatinine (mg/dL)	0.73 $\pm$ 0.11	0.83 $\pm$ 0.13
Potassium (mEq/L)	4.0 $\pm$ 0.4	4.0 $\pm$ 0.2

BMI Body mass index, SBP systolic blood pressure, DBP diastolic blood pressure, HR heart rate

Values are mean $\pm$ S.D.

* $P<0.001$ vs. normotensives

In parallel with oxidative stress markers, we found no significant differences between groups and no significant changes in plasma NOx and nitrite and in whole blood nitrite concentrations in both normotensive controls and in hypertensive patients treated with enalapril for 60 days (Fig. 3a–c, respectively; all $P>0.05$).

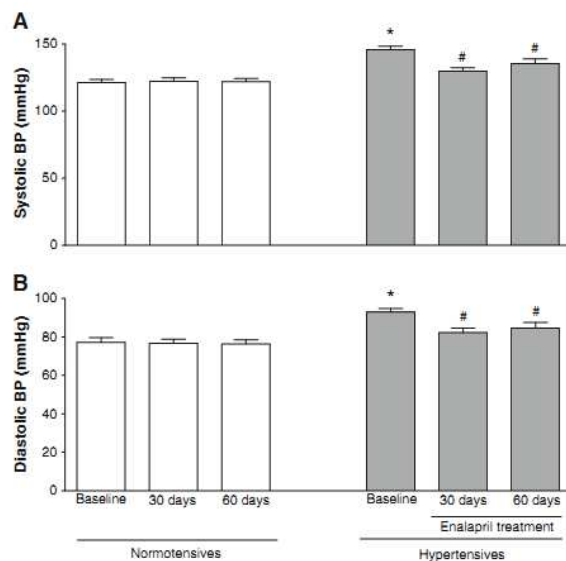


Fig. 1 Systolic (a) and diastolic (b) blood pressure (BP) in normotensives (open bars) and hypertensives (filled bars) at baseline, and after 30 and 60 days of treatment with enalapril. * $P<0.0001$ vs. baseline values in normotensives. # $P<0.005$ vs baseline values in hypertensives

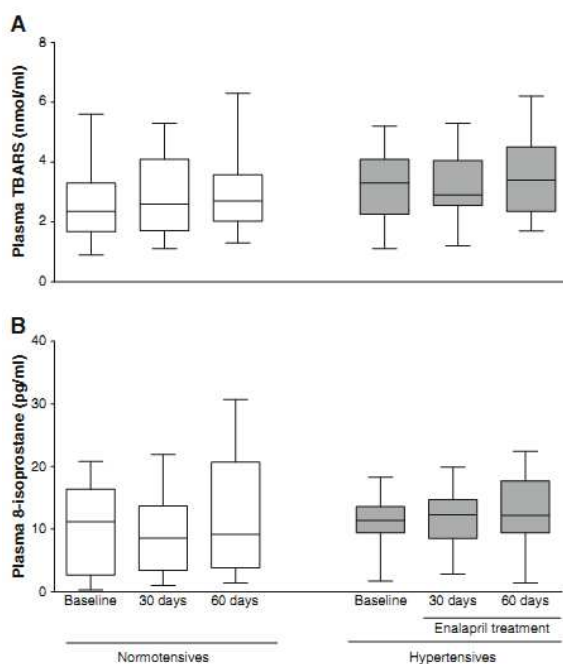


Fig. 2 Plasma thiobarbituric acid-reactive species (TBARS; **a**) and 8-isoprostane (**b**) concentrations in normotensives (*open boxes*) and hypertensives (*filled boxes*) at baseline, and after 30 and 60 days of treatment with enalapril. The box and whisker plots show range and quartiles. The *boxes* extend from the 25th percentile to the 75th percentile, with a *line* at the median. The *whiskers* show the highest and the lowest values

Discussion

To our knowledge, this is the first study investigating the possible effects of treatment with an ACEi on the nitrite concentrations in plasma and in whole blood samples from hypertensive patients. While the drug exerted antihypertensive effects, we found no significant effects of treatment with enalapril for 60 days on these markers of endogenous NO formation. In parallel with these findings, we found no effects on markers of oxidative stress.

Previous clinical studies examining the effects of ACEi on the circulating levels of nitrates or NOx have shown conflicting results. Some studies showed higher NOx levels [7, 9–12], whereas others studies showed lower NOx levels [8, 24, 25] after therapy with ACEi. It is possible that differences in study designs, lack of control for potential confounders affecting NOx levels including smoking, severity of hypertension, concomitant diseases, and other drugs used by the patients may have led to inconsistent conclusions. We found that enalapril produced no effects on NOx levels in a relatively homogeneous group of patients not receiving any other drugs and not affected by other diseases. More importantly, the lack of effects of enalapril

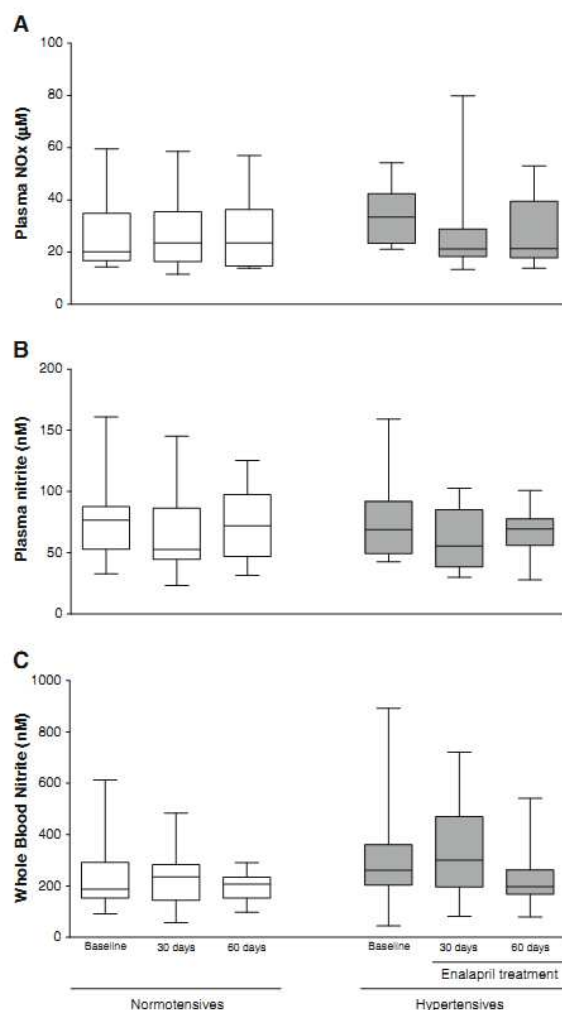


Fig. 3 Plasma NOx (nitrites+nitrates; **a**) and nitrite (**b**) concentrations and whole blood nitrite concentrations (**c**) in normotensives (*open boxes*) and hypertensives (*filled boxes*) at baseline, and after 30 and 60 days of treatment with enalapril. The box and whisker plots show range and quartiles. The *boxes* extend from the 25th percentile to the 75th percentile, with a *line* at the median. The *whiskers* show the highest and the lowest values

on plasma nitrite and on whole blood nitrite levels strongly suggests that the doses of enalapril used in the present study do not modify the circulating levels of relevant markers of endogenous NO formation [14–18].

Some issues regarding indexes of NO production must be taken into consideration to interpret the results reported here. Firstly, the clinical utility of plasma nitrate as a marker of NO formation has been challenged by interference of other confounding factors such as bacterial nitrate synthesis in the bowels, denitrifying liver enzymes, saliva formation, and environmental nitrogen oxides [13, 26]. In addition, the

high background concentration of nitrate in plasma may hamper the detection of small changes in NO bioavailability [26]. Conversely, the assessment of plasma and whole blood nitrite concentrations has been shown to reflect endogenous NO formation [14–18]. In fact, these markers are associated with NO synthase activity [27]. Therefore, our results indicate that treatment of mild to moderately hypertensive patients with enalapril does not affect NO formation significantly, even though significant reductions in blood pressure were found. Giving further support to these findings, we found that treatment with enalapril had no effects on two circulating markers of oxidative stress (TBARS and 8-isoprostane plasma concentrations).

ACEi were shown to upregulate eNOS protein expression and activity in different experimental studies [28–31]. Although we have no precise explanation for the lack of significant effects of enalapril on NO formation in the present study, it is possible that treatment with enalapril promotes increased NO formation at tissue levels that are not reflected by assessing the circulating levels of relevant markers of NO formation. Indeed, the protective effects of ACEi may occur locally, as previously demonstrated in some studies using isolated cardiomyocytes [32]. Moreover, the protective effects of ACEi are diminished or absent in eNOS knockout mice [33]. Therefore, it is possible that the circulating NO makers may not precisely reproduce NO levels at tissue level.

We found no significant differences between normotensive controls and hypertensive patients when we compared both NO formation biomarkers and oxidative stress biomarkers. Therefore, it is possible that the group of hypertensive patients included in the present study had only minor changes in both endogenous NO formation and oxidative stress levels compared with healthy volunteers. Although untested, we believe that different results could be found in the present study if we had included more severely hypertensive patients. Such patients may have more severely impaired NO levels and increased oxidative stress.

Previous studies have shown that eNOS polymorphisms may modify NO levels, both in healthy subjects [23, 34] and in hypertensive patients [35, 36]. Interestingly, eNOS polymorphisms may modify the responses of some cardiovascular drugs that increase NO formation [37–39], thus suggesting that eNOS polymorphisms may modify the responses to ACEi. However, this hypothesis remains to be tested.

In conclusion, our data show that enalapril 10–20 mg/day does not significantly affect the concentrations of relevant markers of NO formation or markers of oxidative stress in mild to moderately hypertensive subjects, despite satisfactory blood pressure control. Our findings do not rule out the possibility that these ACEi may produce

such effects in more severely hypertensive patients treated with higher doses of enalapril, and this possibility deserves further investigation.

Acknowledgments This study was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We thank the staff from the Centro de Saúde de Araçatuba and Laboratório Exame (Araçatuba - Brazil) for technical support.

References

1. Hanif K, Bid HK, Konwar R (2010) Reinventing the ACE inhibitors: some old and new implications of ACE inhibition. *Hypertens Res* 33(1):11–21
2. Gainer JV, Morrow JD, Loveland A, King DJ, Brown NJ (1998) Effect of bradykinin-receptor blockade on the response to angiotensin-converting-enzyme inhibitor in normotensive and hypertensive subjects. *N Engl J Med* 339(18):1285–1292
3. Linz W, Wohlfart P, Scholkens BA, Malinski T, Wiemer G (1999) Interactions among ACE, kinins and NO. *Cardiovasc Res* 43(3):549–561
4. Mancini GB, Henry GC, Macaya C, O'Neill BJ, Pucillo AL, Carere RG, Wargovich TJ, Mudra H, Luscher TF, Klibaner MI, Haber HE, Uprichard AC, Pepine CJ, Pitt B (1996) Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) Study. *Circulation* 94(3):258–265
5. Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, Brown NJ, Marceau F, Adam A (2005) The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci* 99(1):6–38
6. Tschope C, Schultheiss HP, Walther T (2002) Multiple interactions between the renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems: role of ACE inhibition and AT1 receptor blockade. *J Cardiovasc Pharmacol* 39(4):478–487
7. Ceconi C, Fox KM, Remme WJ, Simoons ML, Bertrand M, Parrinello G, Kluft C, Blann A, Cokkino D, Ferrari R (2007) ACE inhibition with perindopril and endothelial function. Results of a substudy of the EUROPA study: PERTINENT. *Cardiovasc Res* 73(1):237–246
8. Di Girolamo G, Gonzalez E, Livio D, de los Santos AR, Marti ML, de Gimeno MA (2002) The effect of enalapril on PGI(2) and NO levels in hypertensive patients. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66(5–6):493–498
9. Kohno M, Yokokawa K, Minami M, Yasunari K, Maeda K, Kano H, Hanehira T, Yoshikawa J (1999) Plasma levels of nitric oxide and related vasoactive factors following long-term treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitor in patients with essential hypertension. *Metabolism* 48(10):1256–1259
10. Suda O, Tsutsui M, Morishita T, Horiuchi M, Nakata S, Kouzuma R, Okazaki M, Sumiyama-Fujinishi A, Mizuki T, Yanagihara N, Tasaki H, Nakashima Y (2006) Long-term treatment with imidapril but not with nifedipine enhances plasma NOx concentration in patients with essential hypertension. *J Pharmacol Sci* 101(2):159–165
11. Takase H, Sugiyama M, Nakazawa A, Sato K, Ueda R, Dohi Y (2000) Long-term effect of antihypertensive therapy with calcium antagonist or angiotensin converting enzyme inhibitor on serum nitrite/nitrate levels in human essential hypertension. *Arzneimittelforschung* 50(6):530–534
12. Yavuz D, Koc M, Toprak A, Akpınar I, Velioglu A, Deyneli O, Haklar G, Akalin S (2003) Effects of ACE inhibition and AT1-

- receptor antagonism on endothelial function and insulin sensitivity in essential hypertensive patients. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 4(3):197–203
13. Ellis G, Adatia I, Yazdanpanah M, Makela SK (1998) Nitrite and nitrate analyses: a clinical biochemistry perspective. *Clin Biochem* 31(4):195–220
 14. Kelm M, Preik-Steinhoff H, Preik M, Strauer BE (1999) Serum nitrite sensitively reflects endothelial NO formation in human forearm vasculature: evidence for biochemical assessment of the endothelial L-arginine-NO pathway. *Cardiovasc Res* 41(3):765–772
 15. Metzger IF, Sertorio JT, Tanus-Santos JE (2006) Relationship between systemic nitric oxide metabolites and cyclic GMP in healthy male volunteers. *Acta Physiol Oxf* 188(2):123–127
 16. Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Jax T, Kerber S, Gharini P, Balzer J, Zotz RB, Scharf RE, Willers R, Schechter AN, Feelisch M, Kelm M (2006) Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans. *Free Radic Biol Med* 40(2):295–302
 17. Rassaf T, Heiss C, Hendgen-Cotta U, Balzer J, Matern S, Kleinbongard P, Lee A, Lauer T, Kelm M (2006) Plasma nitrite reserve and endothelial function in the human forearm circulation. *Free Radic Biol Med* 41(2):295–301
 18. Lauer T, Preik M, Rassaf T, Strauer BE, Deussen A, Feelisch M, Kelm M (2001) Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(22):12814–12819
 19. Nagassaki S, Sertorio JT, Metzger IF, Bem AF, Rocha JB, Tanus-Santos JE (2006) eNOS gene T-786 C polymorphism modulates atorvastatin-induced increase in blood nitrite. *Free Radic Biol Med* 41(7):1044–1049
 20. Cau SB, Dias-Junior CA, Montenegro MF, de Nucci G, Antunes E, Tanus-Santos JE (2008) Dose-dependent beneficial hemodynamic effects of BAY 41-2272 in a canine model of acute pulmonary thromboembolism. *Eur J Pharmacol* 581(1–2):132–137
 21. Sandrim VC, Montenegro MF, Palei AC, Metzger IF, Sertorio JT, Cavalli RC, Tanus-Santos JE (2010) Increased circulating cell-free hemoglobin levels reduce nitric oxide bioavailability in pre-eclampsia. *Free Radic Biol Med* 49(3):493–500
 22. Montenegro MF, Pessa LR, Gomes VA, Desta Z, Flockhart DA, Tanus-Santos JE (2009) Assessment of vascular effects of tamoxifen and its metabolites on the rat perfused hindquarter vascular bed. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 104(5):400–407
 23. Metzger IF, Sertorio JT, Tanus-Santos JE (2007) Modulation of nitric oxide formation by endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes. *Free Radic Biol Med* 43(6):987–992
 24. Napoli C, Bruzzese G, Ignarro LJ, Crimi E, de Nigris F, Williams-Ignarro S, Libardi S, Sommesse L, Fiorito C, Mancini FP, Cacciatore F, Liguori A (2008) Long-term treatment with sulphydryl angiotensin-converting enzyme inhibition reduces carotid intima-media thickening and improves the nitric oxide/oxidative stress pathways in newly diagnosed patients with mild to moderate primary hypertension. *Am Heart J* 156(6):1154 e1151–1158
 25. Napoli C, Sica V, de Nigris F, Pignatola O, Condorelli M, Ignarro LJ, Liguori A (2004) Sulphydryl angiotensin-converting enzyme inhibition induces sustained reduction of systemic oxidative stress and improves the nitric oxide pathway in patients with essential hypertension. *Am Heart J* 148(1):e5
 26. Lauer T, Kleinbongard P, Kelm M (2002) Indexes of NO bioavailability in human blood. *News Physiol Sci* 17:251–255
 27. Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Rassaf T, Schindler A, Picker O, Scheeren T, Godecke A, Schrader J, Schulz R, Heusch G, Schaub GA, Bryan NS, Feelisch M, Kelm M (2003) Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic Biol Med* 35(7):790–796
 28. Bachetti T, Comini L, Pasini E, Cargnoni A, Curello S, Ferrari R (2001) ACE-inhibition with quinapril modulates the nitric oxide pathway in normotensive rats. *J Mol Cell Cardiol* 33(3):395–403
 29. Comini L, Bachetti T, Cargnoni A, Bastianon D, Gitti GL, Ceconi C, Ferrari R (2007) Therapeutic modulation of the nitric oxide: all ace inhibitors are not equivalent. *Pharmacol Res* 56(1):42–48
 30. De Gennaro CV, Rigamonti A, Fioretti S, Bonomo S, Manfredi B, Ferrario P, Bianchi M, Berti F, Muller EE, Rossoni G (2005) Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin AT1-receptor antagonism equally improve endothelial vasodilator function in L-NAME-induced hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 516(3):253–259
 31. Miguel-Carrasco JL, Monserrat MT, Mate A, Vazquez CM (2010) Comparative effects of captopril and l-carnitine on blood pressure and antioxidant enzyme gene expression in the heart of spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 632(1–3):65–72
 32. Hartman JC (1995) The role of bradykinin and nitric oxide in the cardioprotective action of ACE inhibitors. *Ann Thorac Surg* 60(3):789–792
 33. Yang XP, Liu YH, Shesely EG, Bulagannawar M, Liu F, Carretero OA (1999) Endothelial nitric oxide gene knockout mice: cardiac phenotypes and the effect of angiotensin-converting enzyme inhibitor on myocardial ischemia/reperfusion injury. *Hypertension* 34(1):24–30
 34. Metzger IF, Souza-Costa DC, Marroni AS, Nagassaki S, Desta Z, Flockhart DA, Tanus-Santos JE (2005) Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes associated with circulating concentrations of nitric oxide products in healthy men. *Pharmacogenet Genomics* 15(8):565–570
 35. Sandrim VC, de Syllos RW, Lisboa HR, Tres GS, Tanus-Santos JE (2007) Influence of eNOS haplotypes on the plasma nitric oxide products concentrations in hypertensive and type 2 diabetes mellitus patients. *Nitric Oxide* 16(3):348–355
 36. Sandrim VC, Palei AC, Sertorio JT, Cavalli RC, Duarte G, Tanus-Santos JE (2010) Effects of eNOS polymorphisms on nitric oxide formation in healthy pregnancy and in pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 16(7):506–510
 37. Lacchini R, Silva PS, Tanus-Santos JE (2010) A pharmacogenetics-based approach to reduce cardiovascular mortality with the prophylactic use of statins. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 106(5):357–361
 38. Nagassaki S, Herculano RD, Graeff CF, Tanus-Santos JE (2009) eNOS T-786 C polymorphism affects atorvastatin-induced changes in erythrocyte membrane fluidity. *Eur J Clin Pharmacol* 65(4):385–392
 39. Souza-Costa DC, Sandrim VC, Lopes LF, Gerlach RF, Rego EM, Tanus-Santos JE (2007) Anti-inflammatory effects of atorvastatin: modulation by the T-786 C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene. *Atherosclerosis* 193(2):438–444

CAPÍTULO 2

IMPLICAÇÕES FARMACOGENÉTICAS DE POLIMORFISMOS DA eNOS PARA DROGAS DE AÇÃO CARDIOVASCULAR

Implicações Farmacogenéticas de Polimorfismos da eNOS para Drogas de Ação Cardiovascular

Pharmacogenetic Implications of the eNOS Polymorphisms for Cardiovascular Action Drugs

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

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

Resumo

A farmacogenética é um dos campos mais promissores da medicina. A conclusão do Projeto Genoma permitiu que esse campo começasse a descobrir fatores complexos modulando a resposta às drogas, e novas tecnologias estão a poucos passos de permitir uma grande expansão da área. As doenças cardiovasculares estão atualmente entre as maiores causas de internações hospitalares e morte, e têm sido alvo de grande parte dos estudos genéticos de doenças complexas. Paralelamente à identificação de marcadores de suscetibilidade à doença, é necessária a investigação de como perfis genéticos diferentes podem alterar respostas aos fármacos atualmente empregados. O sistema biológico que controla a produção endotelial do óxido nítrico tem sido um dos grandes alvos nas respostas farmacológicas aos fármacos usados na terapia de doenças cardiovasculares. Esta revisão tem como objetivo abordar os conhecimentos correntes da interação entre as variações genéticas da eNOS e as respostas farmacológicas aos fármacos empregados no sistema cardiovascular.

Introdução

Os resultados iniciais do Projeto Genoma foram publicados em 2001¹ e, nestes últimos oito anos, houve um grande avanço no entendimento dos mecanismos moleculares que permeiam as influências genéticas no ser humano. Uma das principais implicações do conhecimento acumulado do genoma humano é a investigação de características genéticas e suas associações a fenômenos até então não explicados.

As características genéticas variáveis (polimorfismos) estudadas se dividem em três grandes grupos: polimorfismos de base única (*single nucleotide polymorphisms* - SNPs),

variação no número de repetições de sequências específicas (microsatélites e *variable number of tandem repeats*) e inserções/deleções de sequências gênicas específicas. Para serem caracterizadas como polimorfismos, essas características devem ter uma frequência estável em pelo menos 1% na população e, por si só, não serem capazes de causar alguma doença genética. Esses polimorfismos são responsáveis pelas diferenças de características individuais em cada ser humano em nossa população.

Recentemente foi disponibilizada a base de dados do *International HapMap Project*, que disponibiliza os chamados "tagSNPs" (SNPs que sinalizam a presença de um conjunto específico de alelos em outros polimorfismos próximos). Polimorfismos situados muito próximos entre si tendem a segregar em conjunto dos pais para os filhos, formando haplótipos. A ideia dos "tagSNPs" é genotipar apenas alguns polimorfismos representantes desses haplótipos e inferir os demais por probabilidade. Cada população tem seu conjunto de "tagSNPs", contempladas em grande parte pelo *HapMap Project*².

Inerentes a todos os tratamentos farmacológicos existem situações de não resposta e toxicidade a doses usuais de fármacos, que não podem ser explicadas por comorbidades, situações fisiológicas específicas ou hábitos dos pacientes. A farmacogenética é o campo do conhecimento focado no estudo de interações de polimorfismos genéticos com a farmacologia, tratando tanto de alterações na cinética dos fármacos (absorção, transporte, metabolização e eliminação) como na dinâmica da interação dos fármacos com seus receptores³.

A farmacogenética visa detectar previamente características individuais dos pacientes que possam identificá-los como "bons respondedores", ou "maus respondedores", a cada tratamento farmacológico. Milhões de dólares são gastos anualmente em todo o mundo com tratamentos ineficazes (incapazes de tirar o paciente de uma situação de risco), ou com internações por intoxicações farmacológicas; situações que poderiam ser evitadas otimizando a prática da "tentativa e erro" usada na clínica⁴. Os dados são de fato alarmantes: em torno de 7% do total de internações nos Estados Unidos em 2006 e de 6,5% no Reino Unido em 2004 foram decorrentes de reações adversas a medicamentos^{5,6}. Esses números mostram a grande importância da personalização e racionalização no uso dos medicamentos.

Basicamente, o objetivo maior da farmacogenética é individualizar os tratamentos farmacológicos de maneira racional, direcionada, e, sobretudo, com fortes bases

Correspondência: José Eduardo Tanus-Santos •

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

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

Artigo recebido em 08/07/09; revisado recebido em 08/07/09; aceito em 25/01/10.

científicas para reduzir os efeitos colaterais; a ineficácia terapêutica e seus desdobramentos.

Os avanços na biologia molecular e na bioquímica têm evidenciado o real desafio da farmacogenética: cada via fisiológica tem dezenas de proteínas que interagem entre si; cada proteína, codificada por seu gene (com polimorfismos), pode ter sua transcrição regulada por diversas outras proteínas, cujos genes também têm polimorfismos. Adicionando complexidade a isso, as vias bioquímicas interagem entre si de maneiras complexas (muitas delas ainda desconhecidas), de forma que às vezes o real causador de uma alteração na resposta ao fármaco não é, de forma alguma, óbvio.

Tal complexidade leva a duas correntes genéricas para o estudo da farmacogenética: os estudos baseados em *Genome Wide Association Studies* (GWAS), e os estudos baseados nas vias fisiológicas e fisiopatológicas dos sistemas biológicos.

Genome Wide Association Studies são estudos grandes que usam técnicas de genotipagem em larga escala, capazes de caracterizar milhares de polimorfismos em todo o genoma em um único experimento. Esse tipo de ensaio permite a geração de resultados sem hipóteses preconcebidas. A ideia por trás da utilização desses estudos na farmacogenética é que a resposta às drogas muitas vezes envolve vias ainda desconhecidas, dificultando a geração de hipóteses *a priori*⁷. Dessa maneira, tornam-se possíveis estudos clínicos em larga escala sem a necessidade de escolher anteriormente polimorfismos candidatos para associação com determinado fenótipo. GWAS têm um enorme potencial de gerar novas hipóteses, e provavelmente serão capazes de alavancar o desenvolvimento do conhecimento na farmacogenética⁴ em médio prazo. Contudo, existem sérias limitações nesse tipo de estudo: a necessidade de grandes números de pacientes ou de um grande efeito clínico por parte desses polimorfismos, para que o estudo tenha poder estatístico suficiente para detectar diferenças significativas. GWAS envolvem custos altíssimos, na ordem de milhões de dólares cada⁸; além disso, os grandes esforços de recrutamento de pacientes (os quais não tendem a reduzir de custo como as tecnologias empregadas atualmente⁴) dão um indicativo de que GWAS provavelmente se restringirão a grandes centros ricos em financiamentos⁷.

Por definição, GWAS testam apenas variantes comuns dos genes, ignorando completamente variantes raras (que podem, potencialmente, exercer grandes efeitos na resposta a fármacos)^{9,10}; além disso, os chips atuais se baseiam nos painéis do *HapMap Project* para cobrir praticamente a totalidade dos SNPs comuns no genoma, de forma que populações não representadas nesses painéis podem ter erros nas inferências dos haplótipos, em razão de diferenças nos "tagSNPs", não sendo contempladas atualmente nesse tipo de estudo¹¹. Existem também limitações técnicas nos estudos por chips de DNA. Para se ter uma ideia, de 83 variantes gênicas com grande importância clínica estudadas por Peters⁷, apenas 45 são contempladas nos painéis do *HapMap Project* por causa de dificuldades técnicas (impossibilidade de determinar grandes inserções/deleções), mostrando que essa tecnologia pode estar longe de ser a ferramenta definitiva para estudos em farmacogenética.

Outro desafio nos GWAS é a interpretação dos dados; em alguns casos, ocorrem relações que se demonstram

nitidamente artefatos por flutuações estatísticas⁸. Até o momento, a maioria dos GWAS se concentrou nos polimorfismos para suscetibilidade a doenças, existindo apenas poucos estudos em farmacogenética, de forma que ainda existe um grande campo para a expansão desse tipo de estudo na resposta diferenciada aos fármacos⁶.

Existe uma outra abordagem, talvez tão eficiente quanto os GWAS, para se estudarem genes que participam de mecanismos fisiológicos já conhecidos⁸. Essa visão baseia-se na sugestão de que se um gene é implicado na causa de uma doença, ou é capaz de influenciar a resposta a um fármaco, provavelmente outros genes na mesma via também podem estar envolvidos⁸. Idealmente, estudos prévios determinam o efeito dos polimorfismos por ensaios moleculares de expressão e/ou atividade enzimática, e os resultados encontrados podem então ser verificados em seres humanos em estudos clínicos¹⁰. Nesses, a genotipagem é realizada por métodos comuns, e é acompanhada pela análise de marcadores bioquímicos relacionados à proteína afetada, e pela associação com o fenótipo final (doença ou resposta ao tratamento). Essa abordagem genótipo-bioquímica-fenótipo final é de grande valia, pois polimorfismos genéticos podem causar alteração na atividade ou expressão de proteínas. Essas, por sua vez, podem alterar as concentrações plasmáticas de algum produto bioquímico envolvido em um processo fisiopatológico. Dessa forma, tais polimorfismos podem ter grande valor preditivo na clínica médica. Dois exemplos recentes de estudos que podemos citar são: i) o estudo de polimorfismos no gene da aldosterona sintase, com posterior quantificação da concentração de aldosterona circulante, e avaliação da associação com hipertensão resistente¹²; ii) o estudo de polimorfismos na eNOS, quantificação de níveis plasmáticos de nitrito, e investigação da associação com pré-eclâmpsia¹³. Essa abordagem não necessita de recursos humanos e financeiros tão grandes e, por suas características, possui um grande potencial de gerar resultados mais focados nos problemas clínicos, com aplicabilidade em curto prazo.

Provavelmente, o ideal seria buscar a complementação de GWAS com estudos tradicionais, unindo a grande abrangência dos GWAS com as vantagens de se ter o foco em hipóteses de grande interesse. Essa combinação poderia levar a conclusões mais sólidas, sem negligenciar achados importantes⁷.

Enfim, a farmacogenética é uma ciência nova, que promete grandes impactos na maneira como as doenças serão tratadas. Esta revisão abordará os mecanismos da interação de polimorfismos no gene da sintase endotelial de óxido nítrico com as respostas farmacológicas às drogas cardiovasculares em uso corrente.

Relevância do óxido nítrico para o aparelho cardiovascular

O endotélio tem um papel importante na regulação da homeostase vascular e na manutenção do tônus vascular, estando envolvido com vias fisiológicas importantes no controle da resistência arterial ao fluxo sanguíneo. Entre diversos mediadores liberados pelo endotélio, o óxido nítrico (NO) exerce papel fundamental na regulação do sistema cardiovascular. Após sua formação pelo endotélio,

Atualização Clínica

o NO difunde-se para o músculo liso e interage com o grupo heme da guanilato ciclase solúvel (sGC) tornando-a ativa. Essa enzima sintetiza guanosina monofosfato cíclica (GMPc) a partir da guanosina trifosfato (GTP), levando a um acúmulo de GMPc nessas células. Isso ativa vias de sinalização intracelulares que diminuem o grau de contração do músculo liso vascular, levando ao relaxamento do vaso¹⁴. Além desses efeitos vasculares, o NO também está envolvido na inibição da agregação e adesão plaquetária.

O NO é formado pelas enzimas NO-sintases (NOS), que catalisam a conversão de L-arginina em L-citrulina e NO. Existem três isoformas dessa enzima: neuronal (nNOS ou NOSI), induzida (iNOS ou NOSII) e endotelial (eNOS ou NOSIII)¹⁵. A nNOS é encontrada em uma variedade de células que incluem os neurônios e células endoteliais. Tanto a nNOS quanto a eNOS são isoformas constitutivas e são cálcio-dependentes, necessitando do aumento dos níveis de cálcio intracelular e consequente ligação desse com a calmodulina (CaM) para a ativação dessas enzimas. A iNOS não é constitutiva e é expressa em processos inflamatórios.

No sistema cardiovascular, a eNOS é a principal responsável pela síntese de NO^{14,16}. A eNOS localiza-se nas invaginações da membrana plasmática de células endoteliais, denominadas caveólas. A interação da eNOS com uma proteína chamada caveolina resulta na inatividade da eNOS que se deve, em parte, pela ocupação do sítio de ligação da calmodulina¹⁷.

A redução da expressão ou da atividade da eNOS pode resultar em menor produção de NO. Diversos estudos têm sugerido que o desequilíbrio na biodisponibilidade do NO exerce papel significativo na disfunção endotelial. Várias doenças estão associadas com disfunção endotelial e redução da biodisponibilidade do NO, entre elas, hipertensão¹⁸, pré-eclâmpsia¹⁹ e síndrome metabólica²⁰.

O estresse oxidativo está envolvido em processos fisiopatológicos de inúmeras doenças cardiovasculares, e existem evidências que demonstram sua contribuição na disfunção endotelial. As espécies reativas do oxigênio (ROS), como o ânion superóxido, reagem com o NO resultando na formação de peroxinitrito. O aumento na produção de ROS leva, portanto, a uma redução da biodisponibilidade do NO²¹, podendo favorecer o surgimento de diversas doenças cardiovasculares. O aumento das ROS também pode levar à oxidação do cofator BH4 da eNOS, levando a um desacoplamento dessa enzima. Dessa forma, a eNOS passa a produzir ânion superóxido em vez de NO²², levando a um ciclo vicioso que aumenta cada vez mais o estresse oxidativo e reduz cada vez mais a disponibilidade de NO.

Relevância do óxido nítrico para as respostas às drogas de ação cardiovascular

Diversos grupos de drogas usadas no tratamento de doenças cardiovasculares aumentam a biodisponibilidade do NO. Dentre elas, temos os inibidores da enzima conversora de Angiotensina (iECA), antagonistas dos receptores de Angiotensina II (Ang II) e os bloqueadores dos canais de cálcio (BCC)²³. Além desses anti-hipertensivos, diversos estudos têm evidenciado o aumento do NO causados por inibidores da 3-metilglutaril coenzima A redutase (estatinas),

provavelmente de forma independente da redução dos níveis de lipídeos^{24,25}.

Inibidores da ECA atuam reduzindo as concentrações de Ang II, um potente vasoconstritor endógeno. Paralelamente, ocorre um aumento das concentrações de cininas (cujo efeito predominante é oposto à AngII), e isso contribui para os efeitos cardiovasculares dessas drogas²⁶. Os iECA parecem também estimular a expressão e atividade da eNOS^{27,28}, provavelmente envolvendo a ligação das cininas aos seus receptores²⁹⁻³¹. Esses efeitos são inibidos pelo tratamento concomitante com HOE-140, um antagonista do receptor B₂ de cinina^{27,32}.

Os inibidores dos receptores de Ang II são utilizados por inibirem competitivamente a ligação da Ang II ao receptor AT1, atenuando os efeitos vasoconstritores da Ang II. Essas drogas também atuam aumentando a biodisponibilidade de NO, provavelmente pelo aumento da expressão proteína eNOS ou ativação de outros receptores que levam à ativação da eNOS^{23,33}.

Os bloqueadores de canais de cálcio (BCC) inibem a entrada de cálcio nas células musculares lisas, e dessa forma levam a uma menor contratilidade e débito cardíaco. Existem evidências de que essa classe também aumenta a biodisponibilidade do NO^{23,34}. Estudos clínicos evidenciaram significativa melhora da vasodilatação endotélio-dependente em pacientes hipertensos e hipercolesterolêmicos tratados com BCC, mostrando reversão da disfunção endotelial²³. Provavelmente o aumento do NO é decorrente do aumento da atividade e expressão da eNOS associado a essas drogas³⁵.

As estatinas estão entre as drogas mais amplamente usadas e efetivas para prevenção de doenças cardiovasculares³⁶, especialmente quando se consideram suas ações sobre as concentrações circulantes de lipoproteínas e seus efeitos cardioprotetores de longo prazo. Alguns dos efeitos pleiotrópicos observados parecem estar associados ao aumento da produção endógena de NO^{37,38}, possivelmente atribuídos ao aumento expressão e atividade da eNOS^{39,40}.

A disfunção erétil é uma desordem de origem neuronal e vascular, e vem sendo vista como um fator de risco precoce para outras doenças cardiovasculares⁴¹. Os inibidores da fosfodiesterase 5 (IPDE-5) são fármacos empregados na disfunção erétil e na hipertensão pulmonar por agirem por meio da inibição da degradação de GMPc, levando a um relaxamento da musculatura lisa dos vasos. No caso da hipertensão pulmonar isso levaria a uma normalização da pressão, e na disfunção erétil facilitaria o intumescimento do pênis decorrente do estímulo neurogênico⁴¹. Síndromes em que a síntese de NO está comprometida, como diabetes e falência cardíaca, reduzem a eficácia dos IPDE-5 atuais em induzir vasodilatação^{42,43} e alterar a função cardíaca⁴⁴.

Polimorfismos genéticos da eNOS

O gene da eNOS (localizado na região 7q35-7q36) contém 26 exons, 25 introns e aproximadamente 21 a 22 Kb^{45,46}. Desde a sua caracterização no início dos anos 1990, grande número de sítios polimórficos foi identificado, incluindo VNTRs, repetições de dinucleotídeos (CA)_n e SNPs⁴⁷. Vários desses polimorfismos têm sido associados a doenças cardiovasculares, tais como hipertensão, pré-eclâmpsia, entre outras⁴⁷⁻⁴⁹.

Atualização Clínica

Um dos polimorfismos clinicamente relevantes mais estudados é um SNP na região promotora (T^{-786C}), frequentemente associado ao desenvolvimento de doença coronariana^{50,51}. Estudos *in vitro* indicam que a substituição da timina pela citosina na posição -786 reduz em cerca de 50% a atividade transcricional^{51,52} (fig. 1A e 1B). Provavelmente, esse efeito ocorre por uma maior ligação da RPA1 (replication protein A1), que atua como uma proteína repressora gênica⁵¹ em indivíduos com o alelo raro (fig. 1B).

Outro polimorfismo no gene da eNOS amplamente estudado é um VNTR localizado no intron 4 (repetição de 27pb). Os alelos mais encontrados apresentam quatro cópias (variante a, mais rara) ou cinco cópias (variante b, mais comum). Os estudos de funcionalidade e de associação desse polimorfismo com eventos cardiovasculares têm demonstrado resultados conflitantes^{47,53,54}. Recentemente tem sido proposto que esse polimorfismo regularia a expressão da eNOS pela formação de pequenos RNAs (sirRNA). Células endoteliais contendo cinco cópias apresentam quantidades maiores de sirRNA e menores níveis de mRNA da eNOS do que células contendo quatro cópias^{55,56} (fig. 1C e 1D), o que poderia explicar a associação desse polimorfismo com risco cardiovascular.

Um terceiro polimorfismo, um SNP localizado no exon 7 do gene da eNOS tem sido associado com risco

cardiovascular^{47,57}. Esse polimorfismo é caracterizado por uma conversão da guanina pela timina na posição 894 do gene, e consequente substituição da glutamina (alelo mais comum) pelo aspartato (alelo mais raro) no resíduo 298 da eNOS (Glu298Asp)⁴⁵. Evidências apontam para menores formações de NO em indivíduos portadores do alelo Asp, levando a possíveis alterações funcionais^{58,59}. Células endoteliais portadoras desse alelo parecem produzir menos NO, por uma diminuição na disponibilidade da eNOS na caveola dessas células⁶⁰ (fig. 1E e 1F). A localização celular da eNOS e sua ligação à caveolina 1 desempenham papel fundamental para atividade da enzima.

Apesar das evidências discutidas anteriormente, existe certa controvérsia na influência genética da eNOS sobre as doenças cardiovasculares⁴⁷. Uma possível explicação para esses resultados discrepantes pode ser que simples associações clínicas feitas a partir da análise de um único marcador genético (genótipo) com um fenótipo clínico não tenham um poder suficiente para detecção de seus efeitos pequenos. Uma abordagem alternativa seria a análise da combinação de vários marcadores genéticos em paralelo (haplótipo)^{48,61}. Por exemplo, Sandrim e cols.⁶² avaliaram a influência dos genótipos/haplótipos da eNOS na elevação da pressão arterial utilizando os três polimorfismos mais comuns (T^{-786C}; Glu298Asp e 4b/a). A análise de genótipos

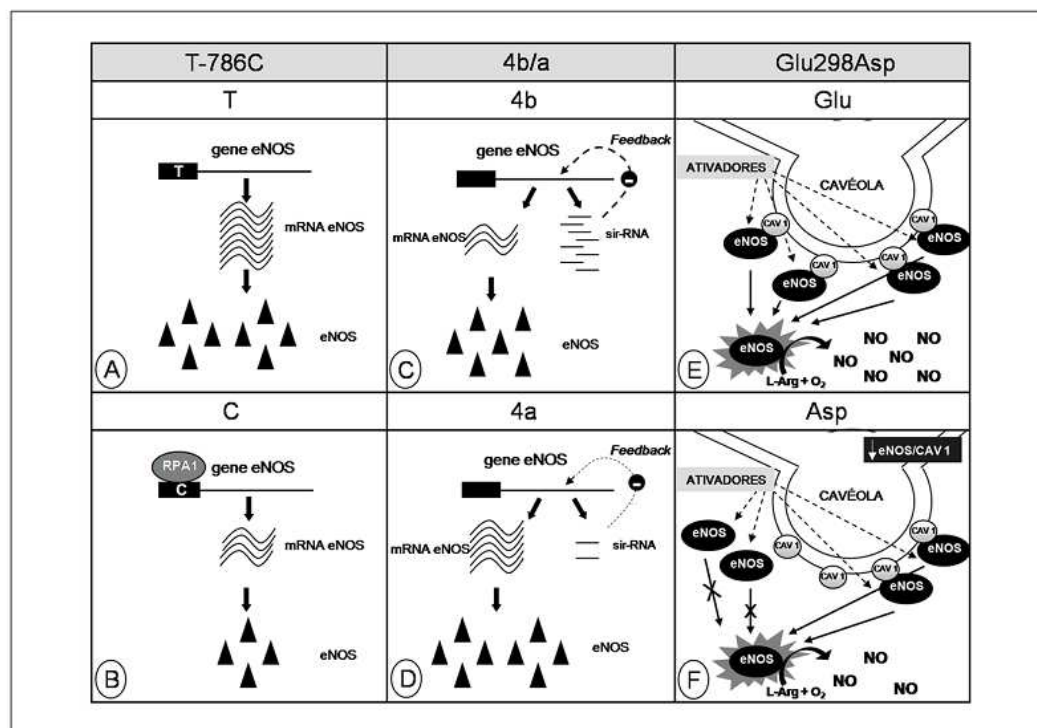


Fig. 1 - Representação dos possíveis mecanismos explicando as associações dos polimorfismos no gene da síntase endotelial do óxido nítrico (eNOS) com variações na sua ação. A e B: polimorfismo na região promotora (T-786C); C e D: polimorfismo no intron 4 (4b/a); E e F: polimorfismo no exon 7 (Glu298Asp). RPA1 (Replication Protein A1), MP (Membrana Plasmática), CAV 1 (Caveolina 1) e sir-RNA (short intronic repeat RNA). Ver detalhes no texto.

Atualização Clínica

não evidenciou haver diferenças significativas entre normotensos e hipertensos. Entretanto, a análise haplotípica mostrou claramente a existência de diferenças significativas entre os dois grupos experimentais. Ainda, outros estudos mostraram associação de haplótipos da eNOS com diferentes concentrações circulantes de nitrito, o que sugere que esses haplótipos possam ter implicações funcionais que propiciem risco variado de desenvolvimento de doenças cardiovasculares^{63,64}. Essa abordagem haplotípica parece ser mais promissora que a análise de apenas um polimorfismo por vez, especialmente no estudo de doenças complexas.

Estudos de respostas a drogas de ação cardiovascular sendo afetadas por polimorfismos da eNOS

Estudos têm mostrado relações entre polimorfismos do gene da eNOS com respostas diferenciadas a diversas classes de drogas utilizadas no tratamento de doenças cardiovasculares.

Evidências recentes sugerem uma modulação dos efeitos das estatinas por polimorfismos genéticos da eNOS. Curiosamente, um estudo com células endoteliais em cultura, tratadas com estatinas, mostrou que esses fármacos induzem maiores aumentos dos níveis de mRNA da eNOS em células endoteliais com genótipo CC quando comparadas a células TT para o polimorfismo T⁷⁸⁶C⁶⁵. Isso se deve, provavelmente, à maior atividade transcricional, aumento da estabilidade do mRNA e diminuição da expressão de RPA1⁶⁵. Confirmando esses achados em culturas de células endoteliais, um estudo clínico mostrou efeitos similares com a atorvastatina⁶⁶. Nesse estudo, demonstrou-se que o tratamento com estatina aumentou a biodisponibilidade do NO e diminuiu o estresse oxidativo apenas em indivíduos homozigotos CC para o polimorfismo T⁷⁸⁶C⁶⁶. Note-se que foram estudados indivíduos saudáveis, fazendo que a droga tivesse muito menos chance de produzir efeitos significativos⁶⁶. Posteriormente, foi observado que os efeitos anti-inflamatórios da atorvastatina são modulados pelo mesmo polimorfismo, levando a uma redução significativa nas concentrações de citocinas inflamatórias (CD40L, VCAM-1, P-selectina e MMP-9) em indivíduos com genótipo CC, mas não nos indivíduos TT⁶⁷. Estudos funcionais demonstraram subsequentemente que o tratamento de curto prazo com estatinas é capaz de reduzir a fluidez da membrana plasmática de hemácias em indivíduos com genótipo CC, mas não com genótipo TT, durante tratamento com atorvastatina⁶⁸. Juntos, esses achados indicam que a atorvastatina poderia ser mais útil para a prevenção de eventos cardiovasculares em indivíduos com o genótipo CC (cujo risco cardiovascular tem se demonstrado aumentado) do que em indivíduos com genótipo TT.

De qualquer forma, os resultados dos estudos com atorvastatina mencionados devem ser interpretados com cautela, pois não foram avaliados eventos clinicamente relevantes e a simples medida de marcadores bioquímicos pode não ser efetiva para indicar novos usos de drogas. Estudos clínicos enfocando eventos clinicamente relevantes deveriam ser feitos para comprovar os resultados discutidos antes.

Ainda que a maioria dos estudos farmacogenéticos das estatinas relacionados a eNOS centre-se no polimorfismo na região promotora da eNOS, o polimorfismo no íntron

4 também parece modular a resposta às estatinas. Kunnas e cols.⁶⁹ avaliaram a vasodilatação coronariana induzida por adenosina em indivíduos saudáveis após seis meses de tratamento com pravastatina. Os indivíduos portadores do alelo "a" mostraram significativa melhora da vasodilatação quando comparados aos indivíduos com genótipo "bb", possivelmente pelo maior aumento da produção endotelial de NO nos indivíduos com o alelo raro⁶⁹.

Outro polimorfismo no gene da eNOS, Glu298Asp no exon 7, parece modular os efeitos do estradiol na função plaquetária. O pré-tratamento com 17 β -estradiol aumentou de forma significativa a taxa de agregação plaquetária, acompanhada pela elevação da liberação de íons superóxido pelas plaquetas apenas em indivíduos homozigotos para o alelo Asp298. A liberação de NO derivado das plaquetas não foi alterada pelos polimorfismos Glu298Asp, T⁷⁸⁶C e 4b/a após tratamento. Adicionalmente, o efeito do hormônio na função plaquetária não foi afetado pelos polimorfismos na região promotora e íntron 4⁶⁸.

Uma das classes de fármacos mais importantes no controle da hipertensão, especialmente no caso de excesso de volume, é a dos diuréticos tiazídicos. A hidroclorotiazida (HCTZ) é seu representante mais utilizado na clínica médica. Foi demonstrado que o polimorfismo Glu298Asp no gene da eNOS é capaz de modular a resposta à HCTZ, de maneira que indivíduos homozigotos para o alelo Glu tem uma redução nos níveis de pressão arterial significativamente maior do que indivíduos portadores do alelo Asp⁷⁰. Apesar do efeito ser significativo, ele é pequeno, o que evidencia que dificilmente um único polimorfismo será capaz de explicar todo o *background* genético por trás de variações nas respostas farmacológicas de uma classe de medicamentos.

Outras classes de anti-hipertensivos de grande importância são os betabloqueadores e os inibidores do receptor AT-1 de angiotensina 2. Um estudo usando técnicas análogas aos GWAS mostrou resultados promissores associando polimorfismos menos estudados da eNOS a variações nas respostas farmacológicas de propranolol e irbesartan (betabloqueador e inibidor do receptor AT-1 de angiotensina 2, respectivamente). O alelo G do polimorfismo A²⁹⁹⁶G foi associado com uma maior diminuição da pressão arterial decorrente do efeito do betabloqueador atenolol em relação ao alelo A⁷¹. O alelo A do polimorfismo C⁴⁹⁸A foi associado a uma melhor resposta tanto ante o betabloqueador quanto ante o irbesartan⁷¹. A presença dos alelos 2996G e do alelo 498A poderia incorrer em um benefício maior aos portadores desses alelos tratados com esses anti-hipertensivos. Esses resultados, apesar de promissores, ainda devem ser confirmados em estudos com maior número de pacientes, de diferentes populações.

A hipertensão normalmente é tratada com a adição de diferentes classes de anti-hipertensivos até a redução da pressão arterial aos níveis preconizados⁷². Hipertensos resistentes são indivíduos que mantêm seus níveis de pressão arterial acima de 140/90 mmHg apesar do uso de três classes diferentes de anti-hipertensivos, incluindo um diurético. Nesse contexto, foi demonstrada uma tendência não significativa de associação entre o alelo Asp (Glu298Asp) e hipertensão resistente⁷³. Estudos posteriores analisando haplótipos da eNOS não confirmaram nenhuma associação com a resistência à terapia anti-hipertensiva⁶².

A disponibilidade de NO afeta a predisposição à disfunção erétil de forma análoga à hipertensão. As classes dos fármacos utilizados no tratamento da disfunção erétil, os IPE-5, também sofre influência de polimorfismos na sua resposta terapêutica. Como comentado anteriormente, a disponibilidade de NO é um fator determinante para a atividade dos IPDE-5⁴². Foi demonstrado que homens homozigotos para o alelo Asp (associado à menor produção de NO) obtiveram menor resposta ao sildenafil quando comparados aos indivíduos com genótipo Glu/Glu⁷⁴.

Conclusões gerais

A farmacogenética é uma área da farmacologia bastante recente, e ainda tem muito a crescer. Os resultados do projeto genoma causaram uma promoção e popularização da área, e estamos vivendo atualmente um momento prestes a uma grande expansão, graças aos *Genome Wide Association Studies*. Apesar disso, a maioria dos estudos ainda se foca nas bases genéticas de doenças complexas, sem grande atenção às respostas farmacológicas. Em relação aos sistemas de produção do óxido nítrico, importantes passos iniciais foram dados, e hoje existem fortes indícios que estatinas e estradiol de fato podem sofrer modulação pelo *background* genético do gene da eNOS em suas funções farmacológicas. Ainda são necessários estudos mais aprofundados em relação aos anti-hipertensivos, e demais medicamentos que atuam sobre o sistema cardiovascular.

É importante frisar que os avanços prometidos pela farmacogenética, infelizmente, ainda estão longe da prática clínica e do paciente.

Perspectivas

O futuro da medicina caminha cada vez mais para a personalização das terapias, e para o uso racional de

tratamentos farmacológicos. A farmacogenética tem um grande espaço nesse cenário hipotético. A ideia, levada a um extremo utópico, seria identificar os polimorfismos genéticos importantes logo ao nascimento, de modo a escolher *a priori* todos os possíveis futuros tratamentos do indivíduo, adequando as doses ao perfil metabólico predito pelo seu DNA.

A hipertensão, um dos maiores males do mundo moderno, poderia ser tratada de maneira mais eficaz, possivelmente até prevenida, mediante a identificação precoce de marcadores de risco, e do tratamento profilático.

De maneira geral, os avanços genéticos prometem revolucionar a medicina nas próximas décadas; resta avaliar quais das grandes promessas do fim do século XX (terapia gênica, células tronco, farmacogenética) vão realmente dar frutos, e em que proporção.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio financeiro da Fapesp, do CNPq e da Capes.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado pela FAPESP, CAPES e CNPq.

Vinculação Acadêmica

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

Referências

1. 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.
2. The International HapMap Project. *Nature*. 2003; 426 (6968): 789-96.
3. Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics—drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med*. 2003; 348 (6): 538-49.
4. Gurwitz D, McLeod HL. Genome-wide association studies: powerful tools for improving drug safety and efficacy. *Pharmacogenomics*. 2009; 10 (2): 157-9.
5. Budnitz DS, Pollock DA, Weidenbach KN, Mendelsohn AB, Schroeder TJ, Annet JL. National surveillance of emergency department visits for outpatient adverse drug events. *JAMA*. 2006; 296 (15): 1858-66.
6. Pirmohamed M, James S, Meakin S, Green C, Scott AK, Walley TJ, et al. Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: prospective analysis of 18 820 patients. *BMJ*. 2004; 329 (7456): 15-9.
7. Peters EJ, McLeod HL. Ability of whole-genome SNP arrays to capture 'must have' pharmacogenomic variants. *Pharmacogenomics*. 2008; 9 (11): 1573-7.
8. Bader JS. Systems approaches for pharmacogenetics and pharmacogenomics. *Pharmacogenomics*. 2008; 9 (3): 257-62.
9. Topol EJ, Frazer KA. The resequencing imperative. *Nat Genet*. 2007; 39 (4): 439-40.
10. Dorn CW 2nd, Cresci S. The mechanistic imperative for pharmacogenomics. *Pharmacogenomics*. 2008; 9 (7): 801-3.
11. Marsh S. Pharmacogenetics: global clinical markers. *Pharmacogenomics*. 2008; 9 (4): 371-3.
12. Lacchini R, Sabha M, Coeli FB, Favero FF, Yugar-Toledo J, Izidoro-Toledo TC, et al. T allele of -344C/T polymorphism in aldosterone synthase gene is not associated with resistant hypertension. *Hypertens Res*. 2009; 32 (2): 159-62.
13. Sandrim VC, Palei AC, Cavalli RC, Araujo FM, Ramos ES, Duarte G, et al. eNOS haplotypes associated with gestational hypertension or preeclampsia. *Pharmacogenomics*. 2008; 9 (10): 1467-73.
14. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993; 329 (27): 2002-12.
15. Kiechle FL, Malinski T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology, and detection. *Am J Clin Pathol*. 1993; 100 (5): 567-75.
16. Cooke JP, Dzau VJ. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med*. 1997; 48: 489-509.

Atualização Clínica

17. Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2006; 46: 235-76.
18. Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, et al. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation*. 2001; 104 (2): 191-6.
19. Sandrim VC, Palei AC, Metzger IF, Gomes VA, Cavalli RC, Tanus-Santos JE. Nitric oxide formation is inversely related to serum levels of antiangiogenic factors soluble fms-like tyrosine kinase-1 and soluble endogline in preeclampsia. *Hypertension*. 2008; 52 (2): 402-7.
20. Gomes VA, Casella-Filho A, Chagas AC, Tanus-Santos JE. Enhanced concentrations of relevant markers of nitric oxide formation after exercise training in patients with metabolic syndrome. *Nitric Oxide*. 2008; 19 (4): 345-50.
21. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*. 1986; 320 (6061): 454-6.
22. Vazquez-Vivar J, Kalyanaram B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95 (16): 9220-5.
23. Mason RP, Cockcroft JR. Targeting nitric oxide with drug therapy. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2006; 8 (12 Suppl 4): 40-52.
24. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005; 45: 89-118.
25. Palinski W. New evidence for beneficial effects of statins unrelated to lipid lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21 (1): 3-5.
26. Sharma JN, Abbas SA. Effect of captopril in the presence of kinin B2 receptor antagonist on duration of survival after prolonged coronary artery ligation in hypertensive rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2006; 28 (4): 217-21.
27. Cargnoni A, Comini L, Bernocchi P, Baccetti T, Ceconi C, Curello S, et al. Role of bradykinin and eNOS in the anti-ischaemic effect of trandolapril. *Br J Pharmacol*. 2001; 133 (1): 145-53.
28. Wiemer C, Linz W, Hatrik S, Scholkens BA, Malinski T. Angiotensin-converting enzyme inhibition alters nitric oxide and superoxide release in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*. 1997; 30 (5): 1183-90.
29. Zhuo JL, Mendelsohn FA, Ohishi M. Perindopril alters vascular angiotensin-converting enzyme, AT(1) receptor, and nitric oxide synthase expression in patients with coronary heart disease. *Hypertension*. 2002; 39 (2 Pt 2): 634-8.
30. Silvestre JS, Bergaya S, Tamarat R, Duriez M, Boulanger CM, Levy BI. Proangiogenic effect of angiotensin-converting enzyme inhibition is mediated by the bradykinin B(2) receptor pathway. *Circ Res*. 2001; 89 (8): 678-83.
31. Veeravalli KK, Akula A. Involvement of nitric oxide and prostaglandin pathways in the cardioprotective actions of bradykinin in rats with experimental myocardial infarction. *Pharmacol Res*. 2004; 49 (1): 23-9.
32. Baccetti T, Comini L, Pasini E, Cargnoni A, Curello S, Ferrari R. ACE-inhibition with quinapril modulates the nitric oxide pathway in normotensive rats. *J Mol Cell Cardiol*. 2001; 33 (3): 395-403.
33. Thai H, Wollmuth J, Goldman S, Caballa M. Angiotensin subtype 1 receptor (AT1) blockade improves vasorelaxation in heart failure by up-regulation of endothelial nitric-oxide synthase via activation of the AT2 receptor. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 307 (3): 1171-8.
34. Mason RP, Marche P, Hintze TH. Novel vascular biology of third-generation L-type calcium channel antagonists: ancillary actions of amlodipine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23 (12): 2155-63.
35. Kobayashi N, Yanaka H, Tojo A, Kobayashi K, Matsuoaka H. Effects of amlodipine on nitric oxide synthase mRNA expression and coronary microcirculation in prolonged nitric oxide blockade-induced hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999; 34 (2): 173-81.
36. Zineh I. Pharmacogenetics of response to statins. *Curr Atheroscler Rep*. 2007; 9 (3): 187-94.
37. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004; 109 (23 Suppl 1): III27-32.
38. Wolfrum S, Jensen KS, Liao JK. Endothelium-dependent effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23 (5): 729-36.
39. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation*. 1998; 97 (12): 1129-35.
40. Sumi D, Hayashi T, Thakur NK, Jayachandran M, Asai Y, Kano H, et al. A HMG-CoA reductase inhibitor possesses a potent anti-atherosclerotic effect other than serum lipid lowering effects--the relevance of endothelial nitric oxide synthase and superoxide anion scavenging action. *Atherosclerosis*. 2001; 155 (2): 347-57.
41. Jackson G. Treatment of erectile dysfunction in patients with cardiovascular disease: guide to drug selection. *Drugs*. 2004; 64 (14): 1533-45.
42. Bivalacqua TJ, Usta MF, Champion HC, Leungwattanakij S, Dabisch PA, McNamara DB, et al. Effect of combination endothelial nitric oxide synthase gene therapy and sildenafil on erectile function in diabetic rats. *Int J Impot Res*. 2004; 16 (1): 21-9.
43. Nagayama T, Zhang M, Hsu S, Takimoto E, Kass DA. Sustained soluble guanylate cyclase stimulation offsets nitric-oxide synthase inhibition to restore acute cardiac modulation by sildenafil. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008; 326 (2): 380-7.
44. Senzaki H, Smith CJ, Juang GJ, Isoda T, Mayer SP, Ohler A, et al. Cardiac phosphodiesterase 5 (cGMP-specific) modulates beta-adrenergic signaling in vivo and is down-regulated in heart failure. *FASEB J*. 2001; 15 (10): 1718-26.
45. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem*. 1993; 268 (23): 17478-88.
46. Miyahara K, Kawamoto T, Sase K, Yui Y, Toda K, Yang LX, et al. Cloning and structural characterization of the human endothelial nitric-oxide-synthase gene. *Eur J Biochem*. 1994; 223 (3): 719-26.
47. Cooke CE, Doshi A, Binkley PF. Endothelial nitric oxide synthase gene: prospects for treatment of heart disease. *Pharmacogenomics*. 2007; 8 (12): 1723-34.
48. Pereira TV, Rudnicki M, Cheung BM, Baum L, Yamada Y, Oliveira PS, et al. Three endothelial nitric oxide (NOS3) gene polymorphisms in hypertensive and normotensive individuals: meta-analysis of 53 studies reveals evidence of publication bias. *J Hypertens*. 2007; 25 (9): 1763-74.
49. Sandrim VC, Palei AC, Cavalli RC, Araujo FM, Ramos ES, Duarte C, et al. Vascular endothelial growth factor genotypes and haplotypes are associated with pre-eclampsia but not with gestational hypertension. *Mol Hum Reprod*. 2009; 15 (2): 115-20.
50. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Ogawa H, Kugiyama K, et al. T(-786)--> C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with myocardial infarction, especially without coronary organic stenosis. *Am J Cardiol*. 2000; 86 (6): 628-34.
51. Miyamoto Y, Saito Y, Nakayama M, Shimasaki Y, Yoshimura T, Yoshimura M, et al. Replication of A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T--> C mutation associated with coronary spastic angina. *Hum Mol Genet*. 2000; 9 (18): 2629-37.
52. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, et al. T-786--> C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation*. 1999; 99 (22): 2864-70.
53. Wang XL, Mahaney MC, Sim AS, Wang J, Wang J, Blangero J, et al. Genetic contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17 (11): 3147-53.
54. Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, Takemoto F, Hara S, Yamada A, et al. Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 245 (1): 190-3.
55. Zhang MX, Zhang C, Shen YH, Wang J, Li XN, Chen L, et al. Effect of 27 nt small RNA on endothelial nitric-oxide synthase expression. *Mol Biol Cell*. 2008; 19 (9): 3997-4005.
56. Zhang MX, Zhang C, Shen YH, Wang J, Li XN, Zhang Y, et al. Biogenesis of short intronic repeat 27-nucleotide small RNA from endothelial nitric-oxide synthase gene. *J Biol Chem*. 2008; 283 (21): 14685-93.
57. Casas JP, Bautista LE, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation*. 2004; 109 (11): 1359-65.
58. Tanus-Santos JE, Desai M, Deak LR, Pezzullo JC, Abernethy DR, Flockhart DA, et al. Effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms

- on platelet function, nitric oxide release, and interactions with estradiol. *Pharmacogenetics*. 2002; 12 (5): 407-13.
59. Godfrey V, Chan SL, Cassidy A, Butler R, Choy A, Fardon T, et al. The functional consequence of the Glu298Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene in young healthy volunteers. *Cardiovasc Drug Rev*. 2007; 25 (3): 280-8.
60. Joshi MS, Mineo C, Shaul PW, Bauer JA. Biochemical consequences of the NOS3 Glu298Asp variation in human endothelium: altered caveolar localization and impaired response to shear. *FASEB J*. 2007; 21 (11): 2655-63.
61. Crawford DC, Nickerson DA. Definition and clinical importance of haplotypes. *Annu Rev Med*. 2005; 56:303-20.
62. Sandrim VC, Yugar-Toledo JC, Desta Z, Flockhart DA, Moreno H Jr, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase haplotypes are related to blood pressure elevation, but not to resistance to antihypertensive drug therapy. *J Hypertens*. 2006; 24 (12): 2393-7.
63. Metzger IF, Sertorio JT, Tanus-Santos JE. Modulation of nitric oxide formation by endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes. *Free Radic Biol Med*. 2007; 43 (6): 987-92.
64. Metzger IF, Souza-Costa DC, Marroni AS, Nagassaki S, Desta Z, Flockhart DA, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes associated with circulating concentrations of nitric oxide products in healthy men. *Pharmacogenet Genomics*. 2005; 15 (8): 565-70.
65. Abe K, Nakayama M, Yoshimura M, Nakamura S, Ito T, Yamamuro M, et al. Increase in the transcriptional activity of the endothelial nitric oxide synthase gene with fluvastatin: a relation with the -786T>C polymorphism. *Pharmacogenet Genomics*. 2005; 15 (5): 329-36.
66. Nagassaki S, Sertorio JT, Metzger IF, Bem AF, Rocha JB, Tanus-Santos JE. eNOS gene T-786C polymorphism modulates atorvastatin-induced increase in blood nitrite. *Free Radic Biol Med*. 2006; 41 (7): 1044-9.
67. Souza-Costa DC, Sandrim VC, Lopes LF, Gerlach RF, Rego EM, Tanus-Santos JE. Anti-inflammatory effects of atorvastatin: modulation by the T-786C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene. *Atherosclerosis*. 2007; 193 (2): 438-44.
68. Nagassaki S, Herculano RD, Graeff CF, Tanus-Santos JE. eNOS T-786C polymorphism affects atorvastatin-induced changes in erythrocyte membrane fluidity. *Eur J Clin Pharmacol*. 2009; 65 (4): 385-92.
69. Kunas TA, Lehtimäki T, Laaksonen R, Ilveskoski E, Janatuinen T, Vesalainen R, et al. Endothelial nitric oxide synthase genotype modulates the improvement of coronary blood flow by pravastatin: a placebo-controlled PET study. *J Mol Med*. 2002; 80 (12): 802-7.
70. Turner ST, Chapman AB, Schwartz GL, Boerwinkle E. Effects of endothelial nitric oxide synthase, alpha-adducin, and other candidate gene polymorphisms on blood pressure response to hydrochlorothiazide. *Am J Hypertens*. 2003; 16 (10): 834-9.
71. Liljedahl U, Karlsson J, Melhus H, Kurland L, Lindersson M, Kahan T, et al. A microarray minisequencing system for pharmacogenetic profiling of antihypertensive drug response. *Pharmacogenetics*. 2003; 13 (1): 7-17.
72. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA*. 2003; 289 (19): 2560-72.
73. Jachymova M, Horky K, Bultas J, Kozich V, Jindra A, Peleska J, et al. Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension resistant to conventional therapy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 284 (2): 426-30.
74. Eisenhardt A, Sperling H, Hauck E, Porst H, Stief C, Rubben H, et al. ACE gene I/D and NOS3 C894T polymorphisms and response to sildenafil in men with erectile dysfunction. *Urology*. 2003; 62 (1): 152-7.

CAPÍTULO 3

eNOS AND BDKRB2 GENOTYPES INFLUENCE THE ANTIHYPERTENSIVE RESPONSE TO ENALAPRIL

eNOS AND BDKRB2 GENOTYPES INFLUENCE THE ANTIHYPERTENSIVE RESPONSE TO ENALAPRIL

Running title: eNOS AND BDKRB2 GENE AND RESPONSE TO ENALAPRIL

**Pâmela S. Silva^a, Vanessa Fontana^b, Riccardo Lacchini^b, Wilson A. Silva Jr.^c,
Celso Biagi^d, and Jose E. Tanus-Santos^{b,*}**

^aDepartment of Pharmacology, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

^bDepartment of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of
Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP, Brazil

^cDepartment of Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, Ribeirao Preto,
SP, Brazil

^dSanta Casa of Araçatuba, Araçatuba, SP, Brazil

*Corresponding author: Jose Eduardo Tanus-Santos, MD, PhD.

Department of Pharmacology - Faculty of Medicine of Ribeirao Preto

University of Sao Paulo

Av. Bandeirantes, 3900 - 14049-900 - Ribeirao Preto, SP, Brazil

Phone: +55 16 3602 3163 - FAX: +55 16 3633 2301

e-mail: tanus@fmrp.usp.br; tanussantos@yahoo.com

Abstract

The antihypertensive effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEi) is attributed partially to increased bioavailability of nitric oxide. Then, it is possible that polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and bradykinin receptor B2 (BDKRB2) genes, two important genes in the NO formation pathway, may affect the antihypertensive response to enalapril. We evaluated 106 hypertensive patients treated with enalapril for 60 days. The difference between the mean arterial pressure (MAP) before and after the antihypertensive treatment was defined as Δ MAP. If Δ MAP were below or above the median value, the patients were classified as poor responders (PR) or good responders (GR), respectively. The genotypes for eNOS were determined by PCR followed by electrophoresis for 4b/4a polymorphism and by real time PCR for T⁻⁷⁸⁶C and G894T polymorphisms, and the eNOS haplotype frequencies were estimated by the programs PHASE 2.1. The C⁻⁵⁸T and BE1 +9/-9 polymorphisms of BDKRB2 gene and their haplotypes were determined by DNA sequencing. The TC/CC genotypes and the C allele for the T⁻⁷⁸⁶C polymorphism of eNOS gene were more frequent in GR, compared with PR patients. Furthermore, the TT genotype for the C⁻⁵⁸T polymorphism of BDKRB2 gene was more frequent in PR when compared with GR. No other significant differences in genotypes or haplotypes were found. These findings suggest that the T⁻⁷⁸⁶C polymorphism of eNOS gene and C⁻⁵⁸T polymorphism of BDKRB2 gene affect the antihypertensive response to enalapril.

Key words: eNOS, BDKRB2, polymorphisms, hypertension, enalapril.

Introduction

Hypertension is a multifactorial disease which represents important cause of morbidity and mortality worldwide [1]. The antihypertensive treatment includes extensive use of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors that decrease angiotensin (Ang) II formation and increase bradykinin levels. The reduction of blood pressure by this class of drugs is assigned partially to vasodilation and improved endothelial function promoted by increase NO bioavailability [2-4].

ACE inhibitors were shown to improve endothelial biosynthesis of NO due to upregulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) protein expression and activity [5-8]. However, these effects were partially counteracted when a bradykinin receptor B2 (BDKRB2) antagonist HOE 140 was given simultaneously to ACEi [5]. Additionally, the antihypertensive effect and increased flow-dependent dilation of the radial artery by ACE inhibitors were reversed during the coadministration with HOE 140 [7,9]. Taken together, these findings show the impact of eNOS-derived NO production through bradykinin receptor B2 activation by ACE inhibitors. Then, it is expected that variations in genes encoding eNOS and BDKRB2 may influence the antihypertensive response to ACE inhibitors.

Three eNOS polymorphisms have been widely studied: a T⁷⁸⁶C substitution in the promoter region, an insertion-deletion in the intron 4 (the allele 4b has five 27-bp tandem repeats while the allele 4a has four repeats) and G⁸⁹⁴T substitution in exon 7 resulting in a Glu to Asp substitution at position 298 of eNOS. Functional studies strongly suggest that eNOS gene polymorphisms are associated with changes in eNOS expression and activity and consequently, in NO production [10-14]. Recent findings have shown the correlation between these polymorphisms and the endogenous NO formation in human [15-17], which could explain their association with the risk of hypertension [18-21] and other cardiovascular diseases (CD) [22-25]. Importantly, variations on the BDKRB2 gene also have been associated with CD [26-28]. Two common polymorphisms in

BDKRB2 are a C⁻⁵⁸T substitution in the promoter region and an insertion-deletion in the noncoding exon 1 BE1 +9/-9 (the allele +9 has three 9-bp tandem repeats while the allele -9 has two repeats) [29,30]. These polymorphisms have been associated with modifications in the transcription rate of the bradykinin receptor B2 gene [29]. Although eNOS and BDKRB2 gene polymorphisms may affect the responses of some drugs that increase NO bioavailability [31-35], no previous study have examined if these polymorphisms modulate the antihypertensive response to ACE inhibitors.

In the present study, our main goal was to evaluate if eNOS and BDKRB2 gene polymorphisms could affect the responses to enalapril, a known ACE inhibitor, in hypertensive patients.

Methods

Subjects and study design

The present work was approved by the Institutional Review Board at the Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, and each subject provided written informed consent. This study was carried out in accordance with the ethics standards of the Helsinki Declaration. We recruited 106 subjects diagnosed with mild to moderate hypertension from Cardiology Division of the Araçatuba Health Center (Araçatuba, SP, Brazil). The hypertensive patients were never-treated or they didn't take antihypertensive medications for at least 2 weeks. The complete health history was provided by patients and underwent physical examination and laboratory analysis to exclude subjects with evidence of severe or secondary hypertension, other concomitant cardiovascular diseases, or respiratory, hepatic, renal, or hematological dysfunction. After these evaluations, patients were treated with enalapril 10 mg/day (n=48) or 20 mg/day (n=58) for 60 days. A semi-automatic blood pressure monitor (OMRON[®] - HEM-433 INT, Bannockburn, Illinois, USA) was used for blood pressure measurements before and after the use of enalapril.

We recorded, at least, three times the systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) and the mean value was used to calculate the mean arterial pressure (MAP) determined from: $MAP = (SBP + 2 \times DBP) / 3$. The responsiveness to enalapril was assessed by the ΔMAP obtained from difference between the MAP before and after treatment with enalapril. According to the response to enalapril, patients were classified as poor responders (PR) or good responders (GR) when their ΔMAP were below or above the median value, respectively.

Venous blood samples were collected and genomic DNA was extracted by salting-out method and it was stored at -20°C until analysis.

Genotyping

Genotypes for the eNOS T⁻⁷⁸⁶C (rs2070744) and Glu298Asp (rs1799983) polymorphisms were determined by Taqman Allele Discrimination assay using real-time polymerase chain reaction (PCR) on a Chromo 4 Detector (Bio-Rad Laboratories, USA). Genotypes for the variable number of tandem repeats polymorphism in the eNOS gene were determined by PCR and fragment separation by electrophoresis in 8% polyacrylamide gels as previously described [32,36].

The C⁻⁵⁸T (rs1799722) and BE1 +9/-9 polymorphisms in the BDKRB2 gene were determined using PCR amplification followed by DNA sequencing as described earlier [37].

Statistical analysis

The clinical and laboratory characteristics of the studied groups were compared by unpaired t test (parametric data), by Mann Whitney test (non-parametric data), by chi-square test or Fisher's test where appropriate (categorical variables). Differences in allele and genotypes distributions and

deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium were tested by chi squared test. A p value <0.05 was considered statistically significant. Given the sample size of this study, we obtained a statistical power of 80% with an alpha of 0.05, calculated using the PGA Matlab software [38].

eNOS haplotypes were estimated using the program PHASE version 2.1 (<http://www.stat.washington.edu/stephens/software.html>). The possible haplotypes including genetic variants of the three polymorphisms studied here in the eNOS gene (T⁻⁷⁸⁶C, intron 4 and Glu298Asp) were H1 (T 4b Glu), H2 (T 4a Glu), H3 (T 4b Asp), H4 (T 4a Asp), H5 (C 4b Glu), H6 (C 4a Glu), H7 (C 4b Asp), H8 (C 4a Asp). Only the haplotypes with observed frequencies >2% were included in subsequent analysis. Additionally, BDKRB2 haplotypes including two polymorphisms (C⁻⁵⁸T and BE1 +9/-9) were determined by DNA sequencing: H1 (C -9), H2 (T -9), H3 (C +9) and H4 (T +9). Differences in haplotype frequencies among groups were further tested using chi squared test, considering P<0.00833 or P<0.0125 as statistically significant (after Bonferroni's correction: 0.05/number of observed haplotypes) for eNOS or BDKRB2 haplotypes, respectively.

Results

Clinical and laboratory characteristics of 106 hypertensive patients studied are shown in Table 1. As expected, both systolic and diastolic blood pressure was lower after treatment with enalapril (p<0.001). However, to evaluate if eNOS and B2 receptor gene polymorphisms/haplotypes could affect the antihypertensive response to enalapril, these patients were grouped according to responsiveness to antihypertensive therapy: poor responders (PR) or good responders (GR) (see Methods section for details).

There were no differences in sex, ethnicity, age, body mass index or any laboratory parameters between PR and GR groups (Table 1; p>0.05). However, baseline systolic and diastolic blood pressure and heart rate was higher in GR (p<0.05). Although blood pressure was lower after treatment with enalapril in

both PR and GR groups ($p < 0.001$), patients who responded better to enalapril had lower systolic and diastolic blood pressure after antihypertensive treatment compared to PR ($p < 0.05$).

The genotypes distributions for all eNOS and B2 receptor gene polymorphisms did not deviate from Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$). Figure 1 shows the results of a single-locus and haplotype analysis for eNOS gene. Interestingly, good responders showed higher frequencies of the TC and CC genotypes, and of the C allele for the T⁻⁷⁸⁶C polymorphism than PR (all $P < 0.05$; and TT vs. TC, $P = 0.0005$, Odds ratio (OR)=0.35, 95% confidence interval (CI)=0.19-0.63; and TT vs. CC, $P = 0.0424$, Odds ratio=0.38, 95% CI=0.14-0.99).

No other significant differences in genotypes/alleles were found with respect to the 4b/4a polymorphism in intron 4 or Glu298Asp in exon 7 (all $p > 0.05$). Additionally, we found that the H7 haplotype (C 4b Asp) is more frequent in GR than in PR patients ($P = 0.0272$; Figure 1), however this result did not resist to the Bonferroni's correction for multiple comparisons.

The results for *BDKRB2* polymorphisms showed higher frequencies of the TT genotype for the C⁻⁵⁸T polymorphism in PR compared with GR (all $P < 0.05$, Figure 2; TT vs. CT, $P = 0.0106$, OR=3.06, 95% CI=1.27-7.35; and TT vs. CT+CC, $P = 0.0175$, OR=2.69, 95% CI=1.16-6.21).

However, no significant differences were seen in the genotype/allele frequencies of BE 1 +9/-9 polymorphisms between groups. We have also not found significant differences in *BDKRB2* haplotype distribution when poor responders and good responders were compared ($P > 0.05$).

When poor and good responders were stratified according to the dose of enalapril used (Table 2 and 3), we found similar results those shown above. Interestingly, although the number of patients in each group have reduced, significant differences in genotype distributions for the T⁻⁷⁸⁶C polymorphism in eNOS gene (Table 2, $P < 0.05$) and C⁻⁵⁸T polymorphism in *BDKRB2* gene (Table 3, $P < 0.05$) were found between poor and good responders.

Discussion

To our knowledge, this is the first study to investigate the association between eNOS and BDKRB2 gene polymorphisms and antihypertensive response to enalapril. The main findings of this study were that the C allele for T⁻⁷⁸⁶C polymorphism in eNOS gene is associated with better antihypertensive response to enalapril, whereas the TT genotype for C⁻⁵⁸T polymorphism in BDKRB2 gene is associated with worse antihypertensive response to enalapril in hypertensive patients.

Previous *in vitro* and clinical studies showed the T⁻⁷⁸⁶C polymorphism in eNOS gene can modify the responses to cardiovascular drugs [32,33,39-41]. Endothelial cells with CC genotypes treated with statins showed higher eNOS mRNA level than cells with the TT genotype [39]. This effect was attributed to increased transcriptional activity of the eNOS gene and mRNA stability, and to decreased expression of the transcriptional repressor factor (RPA-1) in cells carrying the C allele. Subsequently, results from a clinical study suggested that individuals with CC genotypes are more favored by treatment with atorvastatin regarding to increased NO bioavailability and attenuated oxidative stress [33]. Indeed, the anti-inflammatory effects of atorvastatin are modulated by this polymorphism [41]. While treatment with statin reduced the circulating concentrations of CD40L, VCAM-1, P-selectin and matrix metalloproteinase-9 in individuals with the CC genotype, no effects were found in these pro-inflammatory mediators in subjects with the TT genotype. Recent findings have suggested that eNOS polymorphisms also may modulate the response to angiotensin receptor blockers (ARBs) [40]. Olmesartan and the other ARBs produced higher NO release from homozygous for C allele endothelial cells compared to cells heterozygous for T⁻⁷⁸⁶C polymorphism. Additionally, the response to phosphodiesterase type 5 (PDE-5) inhibitors was modified by this individual polymorphism in eNOS gene [32]. The authors found that C allele apparently improves the responses to sildenafil in postoperative erectile dysfunction patients as compared to the T allele.

Taken together, these findings provide growing evidence indicating that the treatment with statins, ARBs, PDE-5 inhibitors and now, enalapril, may be more beneficial in subjects with the -786C allele.

Good responders to enalapril, the group with higher C allele frequency for T⁻⁷⁸⁶C polymorphism, had lower systolic and diastolic blood pressure after antihypertensive treatment compared to PR but, interestingly, GR were higher baseline systolic and diastolic blood pressure than PR. These results are in agreement with previous studies, which also showed that individuals carrying the variant C for the same polymorphism had increased risk of developing cardiovascular diseases, including hypertension [18,19]. The C allele in the promoter region of the eNOS gene is associated with a decrease of 50% of promoter activity [12]. This rare variant was also associated with decreased NO release by platelets from healthy subjects [42] and lower plasma concentrations of NO metabolites in pre-hypertensive individuals [43].

On the other hand, we didn't find other significant differences in genotype nor allele frequencies with respect to both 4b/4a and Glu298Asp polymorphisms in the eNOS gene between poor and good responders. Whereas eNOS haplotypes had been associated with modulation of pharmacologic treatment in patients with preeclampsia [44] and erectile dysfunction [32], our findings in hypertensive subjects indicate that the haplotypes in the eNOS gene does not affect the antihypertensive response to enalapril.

In addition of the eNOS gene, the BDKRB2 gene is other good candidate for pharmacogenetic studies as predictor of the ACE inhibitor response because the activation of this receptor is related to NO formation pathway [45]. In this regard, ours results suggest that the C⁻⁵⁸T polymorphism in the BDKRB2 gene modifies the antihypertensive response to enalapril. Individuals with TT genotype were associated with worse responsiveness to antihypertensive therapy. This polymorphism located in the promoter region also is suggested as possibly involved in ACE inhibitor-induced adverse effects. Interestingly,

two studies in the Japanese population found an association between TT genotype and occurrence of ACE inhibitor-related cough [46,47].

Conversely, the T allele has been associated with increased BDKRB2 gene transcription *in vitro* [29], which is in line with a protective effect on hypertension exhibited by this genetic variant in Asians and African-Americans [28,46]. Our findings showed that subjects with higher TT genotype frequency for C⁻⁵⁸T polymorphism also had lower baseline systolic and diastolic blood pressure, however, this hypertensive patients group (poor responders) was higher systolic and diastolic blood pressure after enalapril treatment than the group of patients with higher TC + CC genotypes frequencies (good responders). In other words, although individuals carrying C allele may be increased risk to hypertension, they seem to be more favored by treatment with enalapril. Nevertheless, we didn't find any other association between antihypertensive response to enalapril and BE1 +9/-9 polymorphism nor BDKRB2 haplotypes.

The present study was designed to evaluate if polymorphisms in two important genes in the NO pathway could affect the response to enalapril, a known ACE inhibitor, in hypertensive patients treated exclusively with enalapril. Although we have included a considerable number of patients, we couldn't subdivide theirs according to ethnicity in function of the small number of black subjects recruited. This is a limitation of our study because there are clear differences in eNOS and BDKRB2 genotypes distributions between white and black subjects [37,48]. However, there were no interethnic differences between poor and good responders to enalapril.

In conclusion, our findings suggest that both eNOS and BDKRB2 genotypes may modulate the antihypertensive response to enalapril. The TC/CC genotypes for eNOS gene are associated with better antihypertensive response to enalapril, while the TT genotype for BDKRB2 gene is associated with worse response to this ACE inhibitor.

References

- 1- Lawes CM, Vander Hoorn S, Rodgers A. Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. *Lancet* 2008; 371(9623): 1513-1518.
- 2- Linz W, Wohlfart P, Scholkens BA, Malinski T, Wiemer G. Interactions among ACE, kinins and NO. *Cardiovasc Res* 1999; 43(3): 549-561.
- 3- Mason RP, Cockcroft JR. Targeting nitric oxide with drug therapy. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2006; 8(12 Suppl 4): 40-52.
- 4- Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, Brown NJ, Marceau F, Adam A. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci* 2005; 99(1): 6-38.
- 5- Bachetti T, Comini L, Pasini E, Cargnoni A, Curello S, Ferrari R. Ace-inhibition with quinapril modulates the nitric oxide pathway in normotensive rats. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33(3): 395-403.
- 6- Comini L, Bachetti T, Cargnoni A, Bastianon D, Gitti GL, Ceconi C, et al. Therapeutic modulation of the nitric oxide: all ace inhibitors are not equivalent. *Pharmacol Res* 2007; 56(1): 42-48.
- 7- De Gennaro Colonna V, Rigamonti A, Fioretti S, Bonomo S, Manfredi B, Ferrario P, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin AT1-receptor antagonism equally improve endothelial vasodilator function in L-NAME-induced hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 2005; 516(3): 253-259.
- 8- Miguel-Carrasco JL, Monserrat MT, Mate A, Vazquez CM. Comparative effects of captopril and l-carnitine on blood pressure and antioxidant enzyme gene expression in the heart of spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 2010; 632(1-3): 65-72.
- 9- Hornig B, Kohler C, Drexler H. Role of bradykinin in mediating vascular effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors in humans. *Circulation* 1997; 95(5): 1115-1118.

- 10- 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): 2655-2663.
- 11- Miyamoto Y, Saito Y, Nakayama M, Shimasaki Y, Yoshimura T, Yoshimura M, et al. Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T-->C mutation associated with coronary spastic angina. *Hum Mol Genet* 2000; 9(18): 2629-2637.
- 12- 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): 2864-2870.
- 13- 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.
- 14- 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): 14685-14693.
- 15- Metzger IF, Ishizawa MH, Rios-Santos F, Carvalho WA, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes affect nitrite levels in black subjects. *Pharmacogenomics J* 2011; 11(6): 393-399.
- 16- Metzger IF, Sertorio JT, Tanus-Santos JE. Modulation of nitric oxide formation by endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes. *Free Radic Biol Med* 2007; 43(6): 987-992.
- 17- Metzger IF, Souza-Costa DC, Marroni AS, Nagassaki S, Desta Z, Flockhart DA, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes associated with circulating concentrations of nitric oxide products in healthy men. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15(8): 565-570.

- 18- 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): 919-922.
- 19- Nejatizadeh A, Kumar R, Stobdan T, Goyal AK, Sikdar S, Gupta M, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes and circulating nitric oxide levels significantly associate with risk of essential hypertension. *Free Radic Biol Med* 2008; 44(11): 1912-1918.
- 20- Sandrim VC, Palei AC, Cavalli RC, Araujo FM, Ramos ES, Duarte G, et al. eNOS haplotypes associated with gestational hypertension or preeclampsia. *Pharmacogenomics* 2008; 9(10): 1467-1473.
- 21- 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): 171-176.
- 22- Lee YC, Wu WJ, Liu CC, Wang CJ, Li WM, Huang CH, et al. The associations among eNOS G894T gene polymorphism, erectile dysfunction, and benign prostate hyperplasia-related lower urinary tract symptoms. *J Sex Med* 2009; 6(11): 3158-3165.
- 23- Napoli C, Ignarro LJ. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and carotid artery atherosclerosis. *J Clin Pathol* 2007; 60(4): 341-344.
- 24- 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): 428-432.
- 25- 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): 241-246.

- 26- Dhamrait SS, Payne JR, Li P, Jones A, Toor IS, Cooper JA, et al. Variation in bradykinin receptor genes increases the cardiovascular risk associated with hypertension. *Eur Heart J* 2003; 24(18): 1672-1680.
- 27- Hallberg P, Lind L, Michaelsson K, Karlsson J, Kurland L, Kahan T, et al. B2 bradykinin receptor (B2BKR) polymorphism and change in left ventricular mass in response to antihypertensive treatment: results from the Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation versus Atenolol (SILVHIA) trial. *J Hypertens* 2003; 21(3): 621-624.
- 28- Niu W, Qi Y, Gao P, Zhu D. A meta-analysis of the bradykinin B2 receptor gene --58C/T polymorphism with hypertension. *Clin Chim Acta* 2010; 411(5-6): 324-328.
- 29- Braun A, Kammerer S, Maier E, Bohme E, Roscher AA. Polymorphisms in the gene for the human B2-bradykinin receptor. New tools in assessing a genetic risk for bradykinin-associated diseases. *Immunopharmacology* 1996; 33(1-3): 32-35.
- 30- Braun A, Maier E, Kammerer S, Muller B, Roscher AA. A novel sequence polymorphism in the promoter region of the human B2-bradykinin receptor gene. *Hum Genet* 1996; 97(5): 688-689.
- 31- 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): 357-361.
- 32- 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* 2011.

- 33- Nagassaki S, Sertorio JT, Metzger IF, Bem AF, Rocha JB, Tanus-Santos JE. eNOS gene T-786C polymorphism modulates atorvastatin-induced increase in blood nitrite. *Free Radic Biol Med* 2006; 41(7): 1044-1049.
- 34- 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 ecNOS gene and sildenafil responsiveness in patients with erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 2007; 19(2): 149-153.
- 35- Van Guilder GP, Pretorius M, Luther JM, Byrd JB, Hill K, Gainer JV, et al. Bradykinin type 2 receptor BE1 genotype influences bradykinin-dependent vasodilation during angiotensin-converting enzyme inhibition. *Hypertension* 2008; 51(2): 454-459.
- 36- Tanus-Santos JE, Desai M, Flockhart DA. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. *Pharmacogenetics* 2001; 11(8): 719-725.
- 37- Pretorius MM, Gainer JV, Van Guilder GP, Coelho EB, Luther JM, Fong P, et al. The bradykinin type 2 receptor BE1 polymorphism and ethnicity influence systolic blood pressure and vascular resistance. *Clin Pharmacol Ther* 2008; 83(1): 122-129.
- 38- Menashe I, Rosenberg PS, Chen BE. PGA: power calculator for case-control genetic association analyses. *BMC Genet* 2008; 9: 36.
- 39- 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): 329-336.
- 40- Mason RP, Jacob RF, Kubant R, Jacoby A, Louka F, Corbalan JJ, et al. Effects of Angiotensin Receptor Blockers on Endothelial Nitric Oxide Release - The Role of eNOS Variants. *Br J Clin Pharmacol* 2012.

- 41- Souza-Costa DC, Sandrim VC, Lopes LF, Gerlach RF, Rego EM, Tanus-Santos JE. Anti-inflammatory effects of atorvastatin: modulation by the T-786C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene. *Atherosclerosis* 2007; 193(2): 438-444.
- 42- Tanus-Santos JE, Desai M, Deak LR, Pezzullo JC, Abernethy DR, Flockhart DA, et al. Effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on platelet function, nitric oxide release, and interactions with estradiol. *Pharmacogenetics* 2002; 12(5): 407-413.
- 43- Zago AS, Kokubun E, Fenty-Stewart N, Park JY, Attipoe S, Hagberg J, et al. [Effect of physical activity and t-786C polymorphism in blood pressure and blood flow in the elderly]. *Arq Bras Cardiol* 2010; 95(4): 510-516.
- 44- Sandrim VC, Palei AC, Luizon MR, Izidoro-Toledo TC, Cavalli RC, Tanus-Santos JE. eNOS haplotypes affect the responsiveness to antihypertensive therapy in preeclampsia but not in gestational hypertension. *Pharmacogenomics J* 2010; 10(1): 40-45.
- 45- Erdos EG, Tan F, Skidgel RA. Angiotensin I-converting enzyme inhibitors are allosteric enhancers of kinin B1 and B2 receptor function. *Hypertension* 2010; 55(2): 214-220.
- 46- Mukae S, Aoki S, Itoh S, Iwata T, Ueda H, Katagiri T. Bradykinin B(2) receptor gene polymorphism is associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor-related cough. *Hypertension* 2000; 36(1): 127-131.
- 47- Mukae S, Itoh S, Aoki S, Iwata T, Nishio K, Sato R, et al. Association of polymorphisms of the renin-angiotensin system and bradykinin B2 receptor with ACE-inhibitor-related cough. *J Hum Hypertens* 2002; 16(12): 857-863.
- 48- Marroni AS, Metzger IF, Souza-Costa DC, Nagassaki S, Sandrim VC, Correa RX, et al. Consistent interethnic differences in the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide synthase genetic polymorphisms. *Nitric Oxide* 2005; 12(3): 177-182.

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We thank the staff from the Centro de Saúde de Araçatuba and Laboratório Exame (Araçatuba - Brazil) for technical support.

Conflict of interest: none declared.

Figure 1- Genotype, allele and haplotype frequencies distributions (%) for endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene polymorphisms in hypertensive patients classified as poor responders (n=53) or good responders (n=53) to enalapril. **Panel A:** T⁻⁷⁸⁶C polymorphism; **Panel B:** 4b/4a polymorphism; **Panel C:** Glu298Asp and **Panel D:** eNOS haplotypes. *P<0.05 vs. reference genotypes/alleles. #P<0.05, however, not statistically significant after Bonferroni's correction for multiple comparisons

Figure 2- Genotype, allele and haplotype frequencies distributions (%) for bradykinin receptor B2 (BDKRB2) gene polymorphisms in hypertensive patients classified as poor responders (n=53) or good responders (n=53) to enalapril. **Panel A:** C⁻⁵⁸T polymorphism; **Panel B:** BE1 +9/-9 polymorphism and **Panel C:** B2 receptor haplotypes. *P< 0.05 vs. TC genotype.

Table 1- Clinical and laboratory characteristics of hypertensive patients classified as poor or good responders to enalapril

	All	Poor responders	Good responders
<i>N</i>	106	53	53
Sex (% male)	68	75	60
Ethnicity (% non-Black)	85	83	86
Age (years)	47 ± 12	47 ± 13	48 ± 11
BMI (Kg/m ²)	29.4 ± 5.4	30.0 ± 6.0	28.8 ± 4.7
Total cholesterol (mg/dL)	206 ± 43	200 ± 38	211 ± 48
LDL cholesterol (mg/dL)	129 ± 38	123 ± 24	135 ± 48
HDL cholesterol (mg/dL)	46 ± 14	47 ± 19	44 ± 8
Triglycerides (mg/dL)	152 ± 72	150 ± 69	154 ± 76
Glucose (mg/dL)	91 ± 13	91 ± 16	91 ± 10
Creatinine (mg/dL)	0.91 ± 0.14	0.89 ± 0.11	0.92 ± 0.17
Potassium (mEq/L)	4.2 ± 0.3	4.2 ± 0.3	4.2 ± 0.4
SBP (mm Hg)			
Baseline	149 ± 9	146 ± 8	152 ± 10 [#]
After enalapril treatment	129 ± 9*	133 ± 8*	125 ± 9* [#]
DBP (mm Hg)			
Baseline	93 ± 9	89 ± 8	97 ± 8 [#]
After enalapril treatment	80 ± 7*	82 ± 8*	78 ± 6* [#]
HR (beats/min)			
Baseline	78 ± 12	81 ± 12	75 ± 11 [#]
After enalapril treatment	77 ± 11	78 ± 12	77 ± 9

BMI=body mass index; **HDL**=High-density lipoprotein; **LDL**=Low-density lipoprotein

SBP=systolic blood pressure; **DBP**=diastolic blood pressure; **HR**=heart rate.

Values are the mean±S.D. *P<0.001 vs. baseline; [#]P<0.05 vs. poor responders.

Table 2- Genotype, allele and haplotype frequencies distributions for eNOS gene in hypertensive patients classified as poor or good responders to enalapril 10 or 20 mg/day

		Enalapril 10 mg		P-value	Enalapril 20 mg		P-value
		PR (n=24)	GR (n=24)		PR (n=29)	GR (n=29)	
T ⁻⁷⁸⁶ C	TT	50 (12)	33 (8)	-	59 (17)	28 (8)	-
	TC	42 (10)	58 (14)	0.0140	31 (9)	55 (16)	<0.0001
	CC	8 (2)	8 (2)	NS	10 (3)	17 (5)	0.0043
	χ^2 -test	6.04		0.0489	19.56		<0.0001
	T	71 (34)	63 (30)	-	74 (43)	55 (32)	
	C	29 (14)	38 (18)	NS	26 (15)	45 (26)	0.0050
Intron 4	4b4b	67 (16)	71 (17)	-	62 (18)	59 (17)	-
	4b4a	33 (8)	25 (6)	NS	38 (11)	38 (11)	NS
	4a4a	0 (0)	4 (1)	NS	0 (0)	3 (1)	NS
	χ^2 -test	5.21		NS	3.07		NS
	4b	83 (40)	83 (40)	-	81 (47)	78 (45)	-
	4a	17 (8)	17 (8)	NS	19 (11)	22 (13)	NS
Exon 7	GluGlu	67 (16)	54 (13)	-	62 (18)	48 (14)	-
	GluAsp	29 (7)	38 (9)	NS	31 (9)	41 (12)	NS
	AspAsp	4 (1)	8 (2)	NS	7 (2)	10 (3)	NS
	χ^2 -test	3.93		NS	3.69		NS
	Glu	81 (39)	73 (35)	-	78 (45)	69 (40)	-
	Asp	19 (9)	27 (13)	NS	22 (13)	31 (18)	NS
Haplotypes							
	T 4b Glu	60 (29)	52 (25)	NS	59 (34)	43 (25)	NS
	T 4a Glu	2 (1)	6 (3)	NS	7 (4)	5 (3)	NS
	T 4b Asp	8 (4)	4 (2)	NS	9 (5)	7 (4)	NS
	C 4b Glu	4 (2)	4 (2)	NS	0 (0)	3 (2)	NS
	C 4a Glu	15 (7)	10 (5)	NS	12 (7)	17 (10)	NS
	C 4b Asp	10 (5)	23 (11)	NS	14 (8)	24 (14)	NS
	χ^2 -test	10.03		NS	9.57		NS

Abbreviations: **PR**=poor responders; **GR**=good responders. The frequencies are shown as % (n). P were considered significant when <0.05 (genotypes/alleles) or <0.0063 (haplotypes).

Table 3- Genotype, allele and haplotype frequencies distributions for BDKRB2 gene in hypertensive patients classified as poor or good responders to enalapril 10 or 20 mg/day

		Enalapril 10 mg		P-value	Enalapril 20 mg		P-value
		PR (n=24)	GR (n=24)		PR (n=29)	GR (n=29)	
C ⁻⁵⁸ T	CC	33 (8)	33 (8)	-	41 (12)	38 (11)	-
	CT	46 (11)	58 (14)	NS	38 (11)	52 (15)	NS
	TT	21 (5)	8 (2)	0.0208	21 (6)	10 (3)	NS
	χ^2 -test	7.21		0.0272	6.20		0.0452
	C	56 (27)	63 (30)	-	60 (35)	64 (37)	-
	T	44 (21)	38 (18)	NS	40 (23)	36 (21)	NS
Exon 1 +9/-9	+9/+9	29 (7)	25 (6)	-	28 (8)	28 (8)	-
	+9/-9	38 (9)	54 (13)	NS	52 (15)	59 (17)	NS
	-9/-9	33 (8)	21 (5)	NS	21 (6)	14 (4)	NS
	χ^2 -test	5.75		NS	1.841		NS
	+9	48 (23)	52 (25)	-	53 (31)	57 (33)	-
	- 9	52 (25)	48 (23)	NS	47 (27)	43 (25)	NS
Haplotypes							
	C -9	31 (15)	35 (17)	NS	34 (20)	28 (16)	NS
	T -9	21 (10)	13 (6)	NS	12 (7)	16 (9)	NS
	C +9	25 (12)	27 (13)	NS	26 (15)	36 (21)	NS
	T +9	23 (11)	25 (12)	NS	28 (16)	21 (12)	NS
	χ^2 -test	2.29		NS	3.76		NS

Abbreviations: **PR**= poor responders; **GR**= good responders.

The frequencies are shown as % (n).

P were considered significant when <0.05 (genotypes/alleles) or <0.0063 (haplotypes).

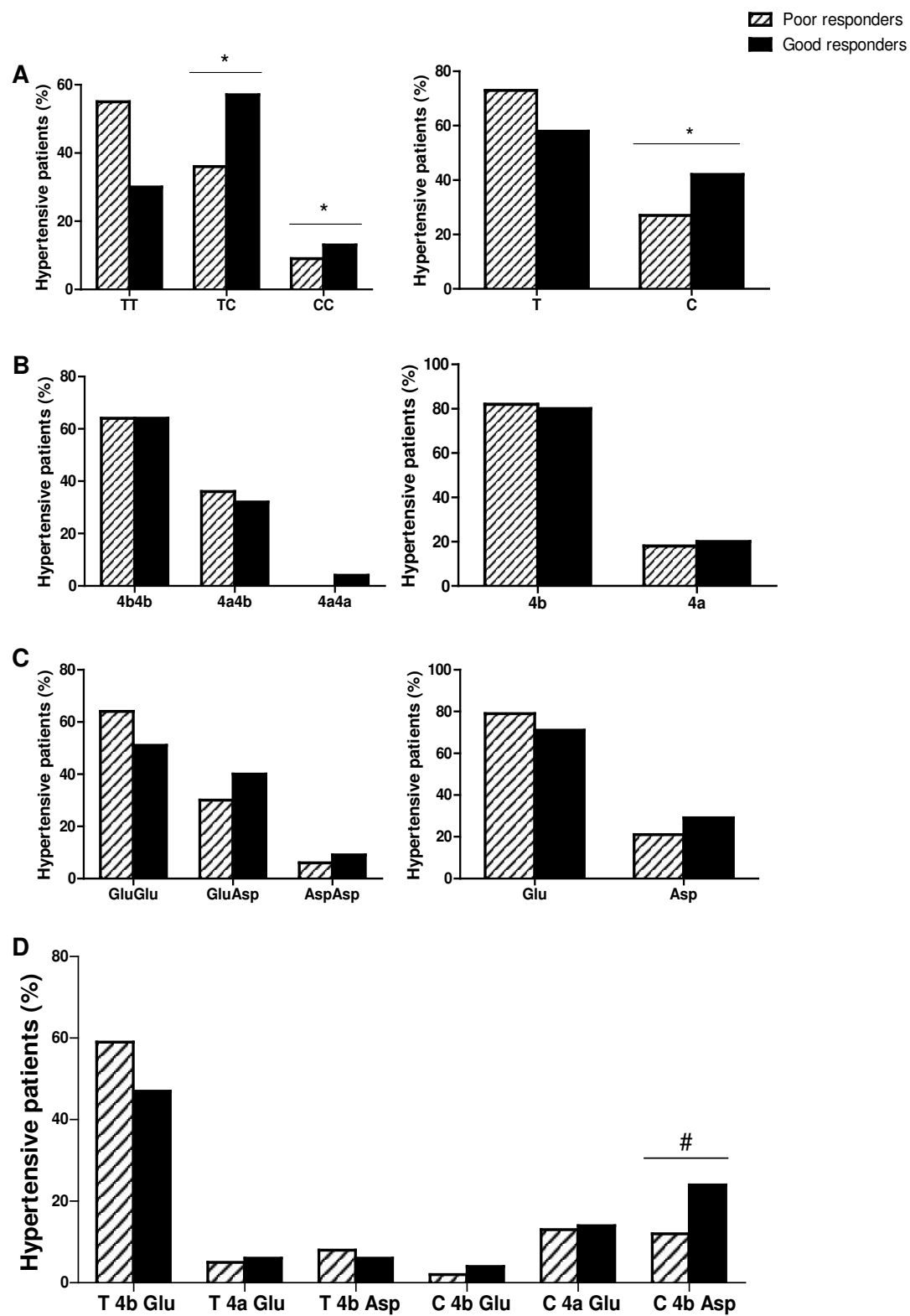


Figure 1

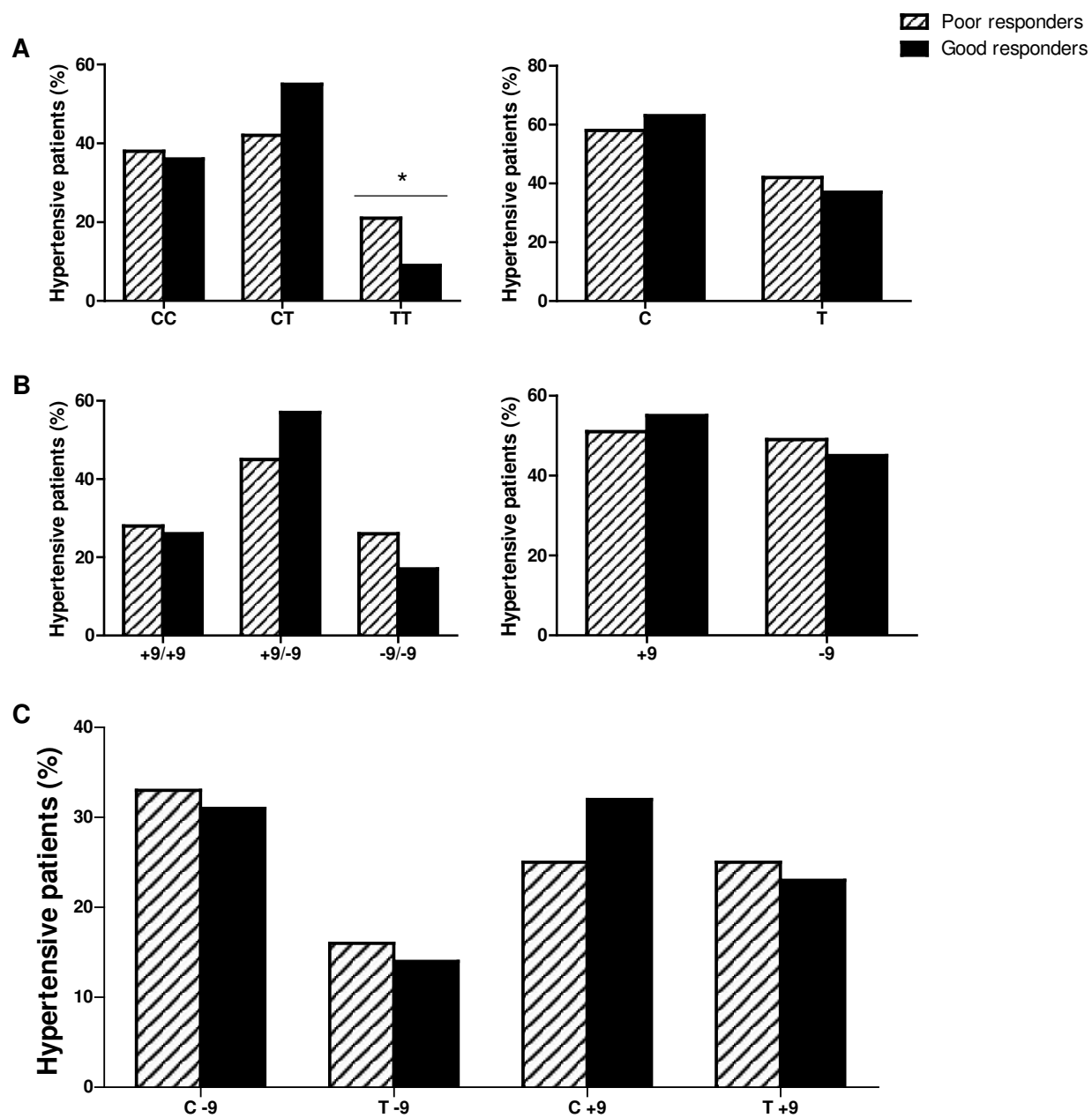
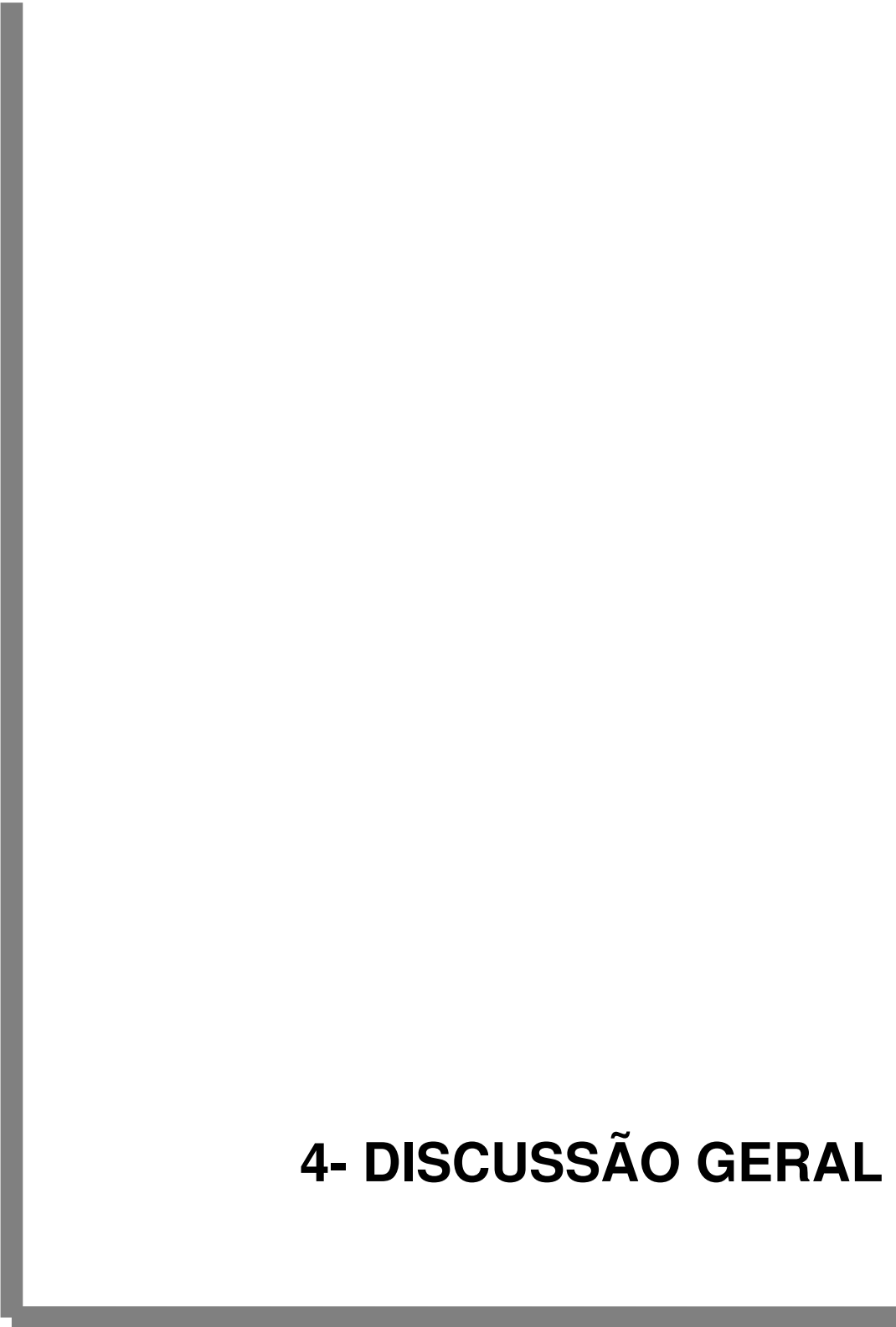


Figure 2



4- DISCUSSÃO GERAL

O artigo apresentado no Capítulo 1 foi o primeiro estudo a investigar o possível efeito do tratamento com um iECA nas concentrações de nitrito no plasma e no sangue total de pacientes hipertensos. Embora observado o efeito anti-hipertensivo do enalapril a partir de 30 dias de tratamento, nós não encontramos diferença estatística significativa nesses marcadores de formação de NO endógeno em nenhum dos tempos analisados. Adicionalmente, também não encontramos nenhuma alteração nos marcadores de estresse oxidativo ao longo do tratamento.

Diversos estudos clínicos anteriores que avaliaram o efeito de iECA nos níveis circulantes de nitrato ou NOx apresentam resultados conflitantes. Alguns estudos mostram aumento desses metabólitos do NO [35-39], enquanto outros trabalhos mostram sua diminuição [40-42] após terapia com iECA. A inconsistência de tais achados pode se dever a diversos fatores de confusão, como diferença no desenho experimental dos estudos, no grau de hipertensão dos pacientes, na existência de doenças concomitantes, no hábito de fumar dos voluntários, nas diferentes doses do iECA utilizado e no uso de outras drogas além do anti-hipertensivo em estudo. Nossos achados demonstram que o tratamento com enalapril não alterou as concentrações de NOx em um grupo relativamente homogêneo de pacientes, os quais não receberam nenhuma outra droga além do anti-hipertensivo e não apresentavam outra doença além da hipertensão.

Além disso, a maior parte dos trabalhos existentes utiliza o nitrato plasmático com marcador da formação de NO. No entanto, a utilidade clínica desse marcador vem sendo questionada ao longo dos anos, uma vez que as concentrações de nitrato podem ser influenciadas por uma variedade de fatores, como a síntese de nitrato por bactérias no intestino, enzimas desnitrificantes hepáticas, formação de saliva e óxidos de nitrogênio do ambiente [76,77]. Além disso, as altas concentrações basais de nitrato no plasma podem dificultar a detecção de pequenas mudanças na biodisponibilidade de NO [76]. Por outro lado, as concentrações de nitrito plasmáticas e no sangue total parecem

melhor refletir a formação de NO endógeno, uma vez que estão associados à atividade da NO sintase [78-82]. Portanto, nossos resultados indicam que o tratamento com enalapril (10-20mg/dia) de pacientes com hipertensão leve a moderada não afeta significativamente a formação de NO, apesar de reduzir significativamente a pressão arterial. Adicionalmente, o tratamento com enalapril não alterou dois importantes marcadores circulantes de estresse oxidativo (TBARS e 8-isoprostano plasmáticos).

Diferentes estudos experimentais demonstram o aumento da expressão e da atividade da eNOS pelos iECA [33,83-85]. E, embora não tenhamos uma explicação precisa para a ausência de efeitos significativos do enalapril na formação de NO conforme nossos resultados revelaram, é possível que o tratamento com esse iECA promova aumento da formação tecidual de NO, o que não foi refletido através da avaliação dos níveis circulantes dos metabólitos do NO. De fato, os efeitos protetores dos iECA parecem ocorrer localmente conforme demonstrado em estudos com cardiomiócitos isolados [86]. Além disso, tais efeitos protetores dessa classe de drogas são diminuídos ou ausentes em animais *knockout* para eNOS [87]. Ao que nos parece, os níveis circulantes de marcadores do NO não refletem com precisão os níveis de NO teciduais.

Em adição, não encontramos diferença significativa entre normotensos e hipertensos quanto aos biomarcadores de formação do NO e de estresse oxidativo. Possivelmente, isso deve ao fato de os pacientes incluídos no estudo terem sido diagnosticados com hipertensão leve ou moderada, provavelmente, com sutis alterações dos marcadores anteriormente citados em relação aos controles. Embora não testado, parece-nos razoável supor que diferenças nesses marcadores iriam surgir entre os grupos se incluíssemos pacientes com hipertensão mais severa, uma vez que tais pacientes podem ter os níveis de NO mais gravemente prejudicados e maior estresse oxidativo.

Posteriormente, nossos estudos realizados durante a segunda fase do projeto (Capítulo 3) se constituem no primeiro relato da investigação da possível associação entre os polimorfismos/haplótipos no gene da eNOS e do BDKRB2

com o efeito anti-hipertensivo promovido pelo enalapril. Nossos achados revelam que o alelo C para o polimorfismo T⁻⁷⁸⁶C no gene da eNOS está associado à melhor resposta ao enalapril. Por outro lado, os pacientes com genótipo TT responderam de forma menos efetiva ao tratamento anti-hipertensivo com o iECA.

Polimorfismos/haplótipos no gene da eNOS parecem estar associados ao aumento do risco cardiovascular, incluindo a hipertensão [51,88,89]. Para o polimorfismo T⁻⁷⁸⁶C, a frequência do alelo C é maior entre pacientes hipertensos quando comparado ao grupo de voluntários normotensos [88]. Experimentos *in vitro* demonstraram diminuição de 50% da taxa transcricional para a eNOS e, conseqüentemente, da enzima, em células portadoras do alelo raro em relação às portadoras do alelo T [55,56]. Adicionalmente, menor produção de NO foi observada a partir de plaquetas provenientes de indivíduos portadores do alelo C que àquelas obtidas de indivíduos não portadores deste alelo [57]. Menor concentração plasmática de metabólitos do NO também foram encontradas em pacientes pré-hipertensos portadores do alelo menos comum [90].

Interessantemente, nós observamos que o grupo com maior frequência de portadores do alelo C (respondedores bons) também apresentou maior PAS e PAD antes do tratamento anti-hipertensivo quando comparado ao grupo com maior frequência de portadores do alelo T (respondedores pobres). Apesar disso, o primeiro grupo foi o mais favorecido do tratamento anti-hipertensivo, apresentando valores menores de PAS e PAD após 60 dias de tratamento com enalapril que aqueles observados no grupo dos respondedores pobres.

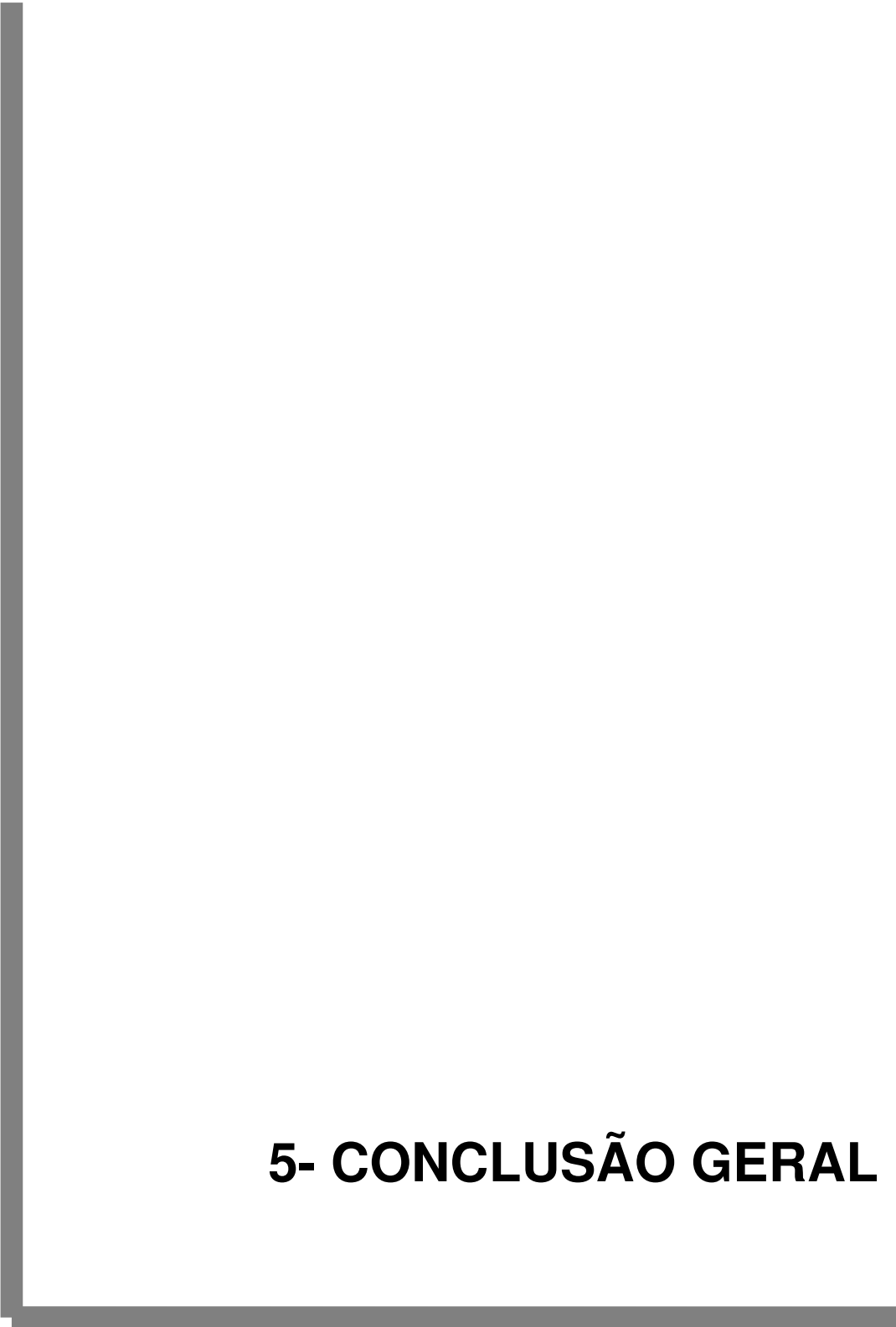
Diversos trabalhos sugerem que os polimorfismos no gene da eNOS modulam a resposta de algumas drogas de ação cardiovascular [60,62,91-94]. Células endoteliais com o genótipo CC tratadas com estatinas apresentaram maiores níveis de mRNA para eNOS que as células portadoras do genótipo TT [58]. Tal fato deve-se, provavelmente, ao 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 alelo C. Corroborando os achados *in vitro*, voluntários sadios portadores do alelo raro tratados com atorvastatina tiveram maior aumento da biodisponibilidade do NO, diminuição do estresse oxidativo e redução significativa de marcadores inflamatórios (CD40L, VCAM-1, P-selectina e MMP-9) que os indivíduos TT [59,60]. Posteriormente, foi observado que o tratamento de curto prazo com atorvastatina reduz a fluidez da membrana eritrocitária em indivíduos com genótipo CC, mas não naqueles com o genótipo TT [92]. Mais recentemente, foi demonstrado que indivíduos com disfunção erétil pós-operatória portadores do alelo C respondem melhor ao tratamento com sildenafil que os voluntários portadores do alelo T [93].

Polimorfismos no gene do BDKRB2 parecem também estar associados a alterações cardiovasculares [74,75,95-97]. Dados provenientes de uma recente meta-análise sugerem a associação entre do polimorfismo C⁻⁵⁸T com a hipertensão em asiáticos e africano-americanos, mas não em caucasianos [98]. Indivíduos portadores do alelo T foram menos comuns entre os pacientes hipertensos, sugerindo, assim, seu efeito protetor. Apesar de o efeito funcional desse polimorfismo não estar completamente claro, parece estar associado a alterações na taxa de transcrição gênica [71]. Experimentos de transfecção *in vitro* indicam maior taxa de transcrição em células portadoras do alelo T que naquelas portadoras do alelo C. Por outro lado, nossos dados revelaram que pacientes portadores do genótipo TT responderam de forma menos efetiva ao tratamento com enalapril que os indivíduos portadores do alelo C (genótipo CC + CT). Interessantemente, esse genótipo também parece estar associado à ocorrência de um efeito adverso comum durante tratamento com iECA, a tosse [99,100].

Tomados juntos, esses achados indicam que os polimorfismos T⁻⁷⁸⁶C na eNOS e C⁻⁵⁸T no BDKRB2 afetam a resposta ao enalapril, assim como sugerem alguns trabalhos com outras drogas de ação cardiovascular que atuam na via de formação do NO. Apesar de os estudos apontarem para o fato de que portadores do alelo C para o polimorfismo na região promotora da eNOS apresentarem risco cardiovascular aumentando, eles parecem se favorecer mais

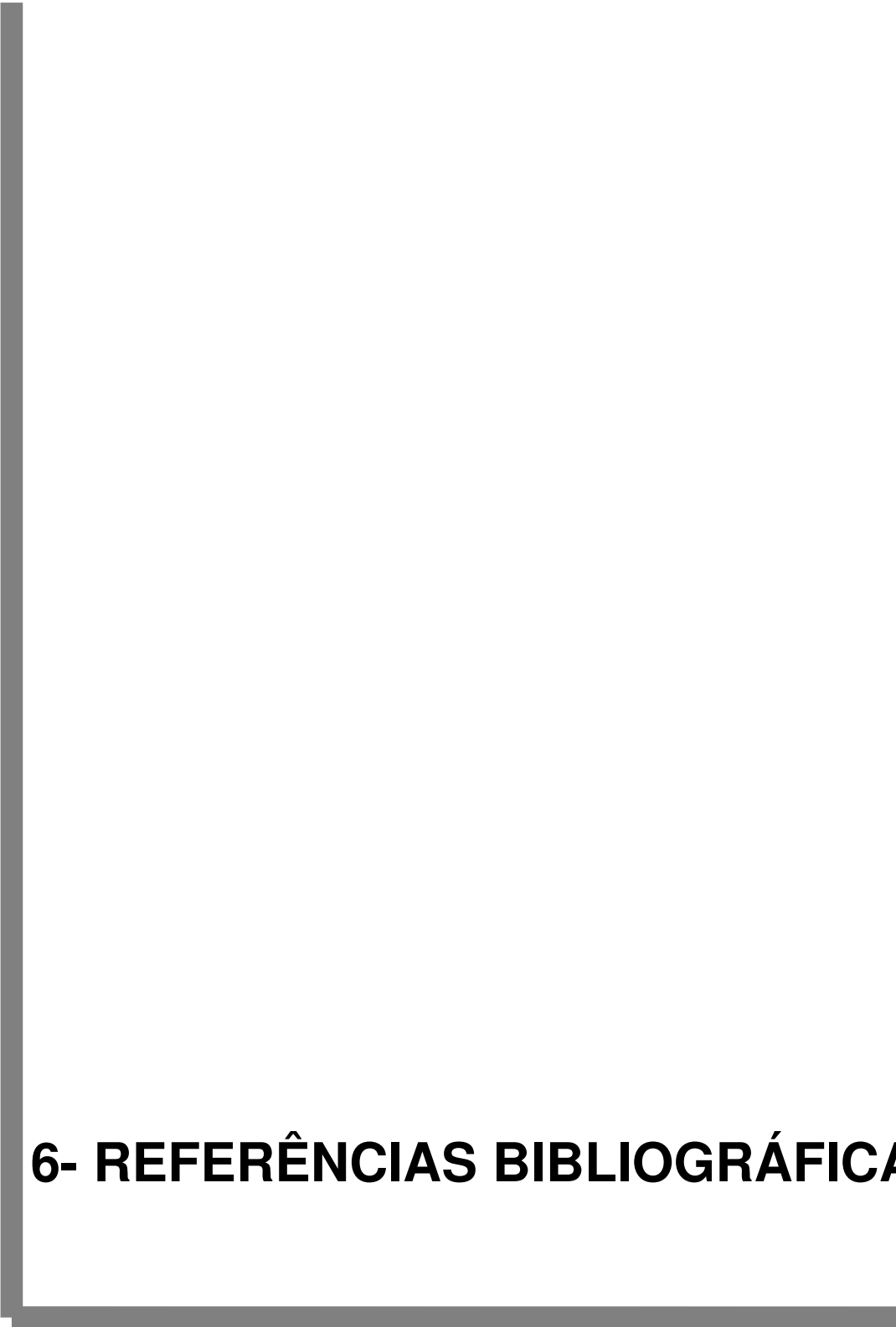
do tratamento farmacológico. Adicionalmente, indivíduos portadores do genótipo TT para o polimorfismo C⁻⁵⁸T no BDKRB2 teriam menor risco cardiovascular associado, porém, seriam menos favorecidos do tratamento com iECA que portadores do alelo C.



5- CONCLUSÃO GERAL

Em conclusão, nossos dados demonstram que o tratamento com enalapril 10-20mg/dia não altera significativamente os marcadores relevantes de formação de NO e de estresse oxidativo em pacientes com hipertensão leve a moderada, apesar de satisfatoriamente controlar a pressão arterial. No entanto, nossos achados não descartam a possibilidade de que os iECA possam produzir efeitos significativos em pacientes com hipertensão mais severa ou utilizando doses maiores de enalapril, no entanto, tal possibilidade necessita ser futuramente investigada.

Em adição, o polimorfismo T⁻⁷⁸⁶C no gene da eNOS parece modular a resposta ao enalapril. Os genótipos TC e CC, bem como o alelo C, foram mais frequentes nos pacientes que responderam melhor ao tratamento anti-hipertensivo que nos respondedores pobres. Somados a esses achados, os pacientes com genótipo TT para o polimorfismo C⁻⁵⁸T no gene do BDKRB2 responderam de forma menos efetiva ao tratamento anti-hipertensivo que os indivíduos portadores do alelo C. Em contrapartida, não encontramos diferença significativa entre respondedores pobres e bons quanto aos demais polimorfismos da eNOS (4b/4a e Glu298Asp) e do BDKRB2 (BE1 +9/-9) avaliados, nem quanto às frequências haplotípicas para os dois genes em estudo.



6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Escosteguy CC, et al. Acute myocardial infarction: clinical and epidemiological profile and factors associated with in-hospital death in the municipality of Rio de Janeiro. *Arq Bras Cardiol*, 2003. 80(6): p. 600-6, 593-9.
- 2- National High Blood Pressure Education Program Working Group report on primary prevention of hypertension. *Arch Intern Med*, 1993. 153(2): p. 186-208.
- 3- Ezzati M, et al. Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *Lancet*, 2002. 360(9343): p. 1347-60.
- 4- Kearney PM, et al. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*, 2005. 365(9455): p. 217-23.
- 5- Shep Cooperative Research Group. Prevention of Stroke by antihypertensive drug treatment in older person with isolated systolic hypertension. *JAMA*, 1991. 265: p. 10.
- 6- Medical Research Council trial of treatment of hypertension in older adults: principal results. MRC Working Party. *BMJ*, 1992. 304(6824): p. 405-12.
- 7- Chobanian AV, et al. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*, 2003. 42(6): p. 1206-52.
- 8- Neal B, MacMahon S, Chapman N. Effects of ACE inhibitors, calcium antagonists, and other blood-pressure-lowering drugs: results of prospectively designed overviews of randomised trials. Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration. *Lancet*, 2000. 356(9246): p. 1955-64.
- 9- Turnbull F. Effects of different blood-pressure-lowering regimens on major cardiovascular events: results of prospectively-designed overviews of randomised trials. *Lancet*, 2003. 362(9395): p. 1527-35.
- 10- Garg R, Yusuf S. Overview of randomized trials of angiotensin-converting enzyme inhibitors on mortality and morbidity in patients with heart failure. Collaborative Group on ACE Inhibitor Trials. *JAMA*, 1995. 273(18): p. 1450-6.

- 11- Pfeffer MA, et al. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. N Engl J Med, 1992. 327(10): p. 669-77.
- 12- St John Sutton M, et al. Quantitative two-dimensional echocardiographic measurements are major predictors of adverse cardiovascular events after acute myocardial infarction. The protective effects of captopril. Circulation, 1994. 89(1): p. 68-75.
- 13- Vaughan DE, Pfeffer MA. Angiotensin converting enzyme inhibitors and cardiovascular remodelling. Cardiovasc Res, 1994. 28(2): p. 159-65.
- 14- Turnbull F, et al. Blood pressure-dependent and independent effects of agents that inhibit the renin-angiotensin system. J Hypertens, 2007. 25(5): p. 951-8.
- 15- Gainer JV, et al. Effect of bradykinin-receptor blockade on the response to angiotensin-converting-enzyme inhibitor in normotensive and hypertensive subjects. N Engl J Med, 1998. 339(18): p. 1285-92.
- 16- Valko M, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol, 2007. 39(1): p. 44-84.
- 17- Li H, Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. J Pathol, 2000. 190(3): p. 244-54.
- 18- Bao G, et al. Chronic kinin receptor blockade attenuates the antihypertensive effect of ramipril. Hypertension, 1992. 20(1): p. 74-9.
- 19- Benetos A, et al. Vasodepressor role of endogenous bradykinin assessed by a bradykinin antagonist. Hypertension, 1986. 8(11): p. 971-4.
- 20- Campbell DJ, Kladis A, Duncan AM. Bradykinin peptides in kidney, blood, and other tissues of the rat. Hypertension, 1993. 21(2): p. 155-65.

- 21- Carretero OA, Miyazaki S, Scicli AG. Role of kinins in the acute antihypertensive effect of the converting enzyme inhibitor, captopril. *Hypertension*, 1981. 3(1): p. 18-22.
- 22- Linz W and B.A. Scholkens. A specific B2-bradykinin receptor antagonist HOE 140 abolishes the antihypertrophic effect of ramipril. *Br J Pharmacol*, 1992. 105(4): p. 771-2.
- 23- Scholkens BA, Linz W, Konig W. Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor, ramipril, in isolated ischaemic rat heart are abolished by a bradykinin antagonist. *J Hypertens Suppl*, 1988. 6(4): p. S25-8.
- 24- Linz W, et al. Interactions among ACE, kinins and NO. *Cardiovasc Res*, 1999. 43(3): p. 549-61.
- 25- Mancini GB, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) Study. *Circulation*, 1996. 94(3): p. 258-65.
- 26- Moreau ME, et al. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci*, 2005. 99(1): p. 6-38.
- 27- Tschope C, Schultheiss HP, Walther T. Multiple interactions between the renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems: role of ACE inhibition and AT1 receptor blockade. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2002. 39(4): p. 478-87.
- 28- Kuhr F, et al. Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. *Neuropeptides*, 2010. 44(2): p. 145-54.
- 29- Desideri G, et al. Different effects of angiotensin converting enzyme inhibitors on endothelin-1 and nitric oxide balance in human vascular endothelial cells: evidence of an oxidant-sensitive pathway. *Mediators Inflamm*, 2008. 2008: p. 305087.

- 30- Zhuo JL, Mendelsohn FA, Ohishi M. Perindopril alters vascular angiotensin-converting enzyme, AT(1) receptor, and nitric oxide synthase expression in patients with coronary heart disease. *Hypertension*, 2002. 39(2 Pt 2): p. 634-8.
- 31- Silvestre JS, et al. Proangiogenic effect of angiotensin-converting enzyme inhibition is mediated by the bradykinin B(2) receptor pathway. *Circ Res*, 2001. 89(8): p. 678-83.
- 32- Veeravalli KK, Akula A. Involvement of nitric oxide and prostaglandin pathways in the cardioprotective actions of bradykinin in rats with experimental myocardial infarction. *Pharmacol Res*, 2004. 49(1): p. 23-9.
- 33- De Gennaro Colonna V, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin AT1-receptor antagonism equally improve endothelial vasodilator function in L-NAME-induced hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*, 2005. 516(3): p. 253-9.
- 34- Erdos EG, Tan F, Skidgel RA. Angiotensin I-converting enzyme inhibitors are allosteric enhancers of kinin B1 and B2 receptor function. *Hypertension*, 2010. 55(2): p. 214-20.
- 35- Ceconi C, et al. ACE inhibition with perindopril and endothelial function. Results of a substudy of the EUROPA study: PERTINENT. *Cardiovasc Res*, 2007. 73(1): p. 237-46.
- 36- Kohno M, et al. Plasma levels of nitric oxide and related vasoactive factors following long-term treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitor in patients with essential hypertension. *Metabolism*, 1999. 48(10): p. 1256-9.
- 37- Suda O. et al. Long-term treatment with imidapril but not with nifedipine enhances plasma NOx concentration in patients with essential hypertension. *J Pharmacol Sci*, 2006. 101(2): p. 159-65.

- 38- Takase H, et al. Long-term effect of antihypertensive therapy with calcium antagonist or angiotensin converting enzyme inhibitor on serum nitrite/nitrate levels in human essential hypertension. *Arzneimittelforschung*, 2000. 50(6): p. 530-4.
- 39- Yavuz D, et al. Effects of ACE inhibition and AT1-receptor antagonism on endothelial function and insulin sensitivity in essential hypertensive patients. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2003. 4(3): p. 197-203.
- 40- Di Girolamo, G., et al., The effect of Enalapril on PGI(2) and NO levels in hypertensive patients. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2002. 66(5-6): p. 493-8.
- 41- Napoli C, et al. Long-term treatment with sulfhydryl angiotensin-converting enzyme inhibition reduces carotid intima-media thickening and improves the nitric oxide/oxidative stress pathways in newly diagnosed patients with mild to moderate primary hypertension. *Am Heart J*, 2008. 156(6): p. 1154 e1-8.
- 42- Napoli C, et al. Sulfhydryl angiotensin-converting enzyme inhibition induces sustained reduction of systemic oxidative stress and improves the nitric oxide pathway in patients with essential hypertension. *Am Heart J*, 2004. 148(1): p. e5.
- 43- Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2005. 45: p. 89-118.
- 44- Mason RP, Cockcroft JR. Targeting nitric oxide with drug therapy. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 2006. 8(12 Suppl 4): p. 40-52.
- 45- Palinski W. New evidence for beneficial effects of statins unrelated to lipid lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. 21(1): p. 3-5.
- 46- Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*, 1999. 286(5439): p. 487-91.
- 47- Cooke GE, Doshi A, Binkley PF. Endothelial nitric oxide synthase gene: prospects for treatment of heart disease. *Pharmacogenomics*, 2007. 8(12): p. 1723-34.

- 48- Pereira TV, 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): p. 1763-74.
- 49- Casas JP, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol*, 2006. 164(10): p. 921-35.
- 50- Sandrim VC, 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): p. 115-20.
- 51- Sandrim VC, et al. eNOS haplotypes associated with gestational hypertension or preeclampsia. *Pharmacogenomics*, 2008. 9(10): p. 1467-73.
- 52- Wang XL, Wang J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Mol Genet Metab*, 2000. 70(4): p. 241-51.
- 53- Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and hypertension. *Curr Hypertens Rep*, 2003. 5(1): p. 19-25.
- 54- Marroni AS, et al. Consistent interethnic differences in the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide synthase genetic polymorphisms. *Nitric Oxide*, 2005. 12(3): p. 177-82.
- 55- Nakayama M, 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): p. 2864-70.
- 56- Miyamoto Y, et al. Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T-->C mutation associated with coronary spastic angina. *Hum Mol Genet*, 2000. 9(18): p. 2629-37.
- 57- Tanus-Santos JE, et al. Effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on platelet function, nitric oxide release, and interactions with estradiol. *Pharmacogenetics*, 2002. 12(5): p. 407-13.

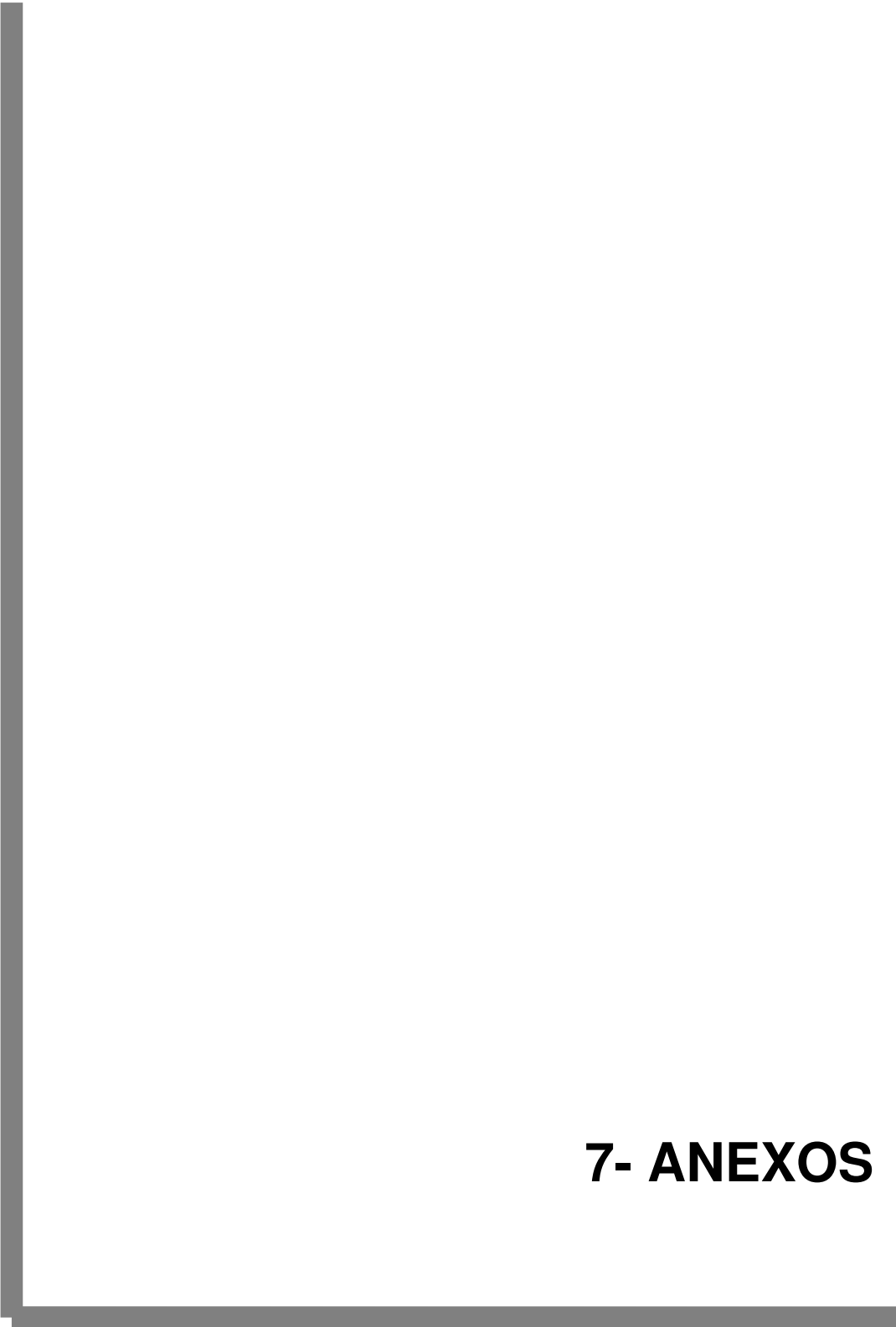
- 58- Abe K, et al. Increase in the transcriptional activity of the endothelial nitric oxide synthase gene with fluvastatin: a relation with the -786T>C polymorphism. *Pharmacogenet Genomics*, 2005. 15(5): p. 329-36.
- 59- Nagassaki S, et al. eNOS gene T-786C polymorphism modulates atorvastatin-induced increase in blood nitrite. *Free Radic Biol Med*, 2006. 41(7): p. 1044-9.
- 60- Souza-Costa DC, et al. Anti-inflammatory effects of atorvastatin: modulation by the T-786C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene. *Atherosclerosis*, 2007. 193(2): p. 438-44.
- 61- Kunnas TA, et al. Endothelial nitric oxide synthase genotype modulates the improvement of coronary blood flow by pravastatin: a placebo-controlled PET study. *J Mol Med*, 2002. 80(12): p. 802-7.
- 62- Turner ST, et al. Effects of endothelial nitric oxide synthase, alpha-adducin, and other candidate gene polymorphisms on blood pressure response to hydrochlorothiazide. *Am J Hypertens*, 2003. 16(10): p. 834-9.
- 63- Eisenhardt A, et al. ACE gene I/D and NOS3 G894T polymorphisms and response to sildenafil in men with erectile dysfunction. *Urology*, 2003. 62(1): p. 152-7.
- 64- Eisenhardt A, Siffert W. Genetic risk factors for erectile dysfunction and genetic determinants of drug response--on the way to improve drug safety? *Herz*, 2003. 28(4): p. 304-13.
- 65- Clark AG. The role of haplotypes in candidate gene studies. *Genet Epidemiol*, 2004. 27(4): p. 321-33.
- 66- Crawford DC, Nickerson DA. Definition and clinical importance of haplotypes. *Annu Rev Med*, 2005. 56: p. 303-20.

- 67- Manunta P, Tripodi G. Haplotype analysis in human hypertension. *J Hypertens*, 2005. 23(4): p. 711-2.
- 68- Salisbury BA, et al. SNP and haplotype variation in the human genome. *Mutat Res*, 2003. 526(1-2): p. 53-61.
- 69- van den Oord EJ, Neale BM. Will haplotype maps be useful for finding genes? *Mol Psychiatry*, 2004. 9(3): p. 227-36.
- 70- Zhao H, Pfeiffer R, Gail MH. Haplotype analysis in population genetics and association studies. *Pharmacogenomics*, 2003. 4(2): p. 171-8.
- 71- Braun A, et al. Polymorphisms in the gene for the human B2-bradykinin receptor. New tools in assessing a genetic risk for bradykinin-associated diseases. *Immunopharmacology*, 1996. 33(1-3): p. 32-5.
- 72- Braun A, et al. A novel sequence polymorphism in the promoter region of the human B2-bradykinin receptor gene. *Hum Genet*, 1996. 97(5): p. 688-9.
- 73- Pretorius MM, et al. The bradykinin type 2 receptor BE1 polymorphism and ethnicity influence systolic blood pressure and vascular resistance. *Clin Pharmacol Ther*, 2008. 83(1): p. 122-9.
- 74- Freitas SR, et al. Insertion/deletion polymorphism of the bradykinin type 2 receptor gene influence diastolic blood pressure. *J Hum Hypertens*, 2009. 23(8): p. 553-5.
- 75- Van Guilder GP, et al. Bradykinin type 2 receptor BE1 genotype influences bradykinin-dependent vasodilation during angiotensin-converting enzyme inhibition. *Hypertension*, 2008. 51(2): p. 454-9.
- 76- Lauer T, Kleinbongard P, Kelm M. Indexes of NO bioavailability in human blood. *News Physiol Sci*, 2002. 17: p. 251-5.

- 77- Ellis G, et al. Nitrite and nitrate analyses: a clinical biochemistry perspective. Clin Biochem, 1998. 31(4): p. 195-220.
- 78- Kelm M, et al. Serum nitrite sensitively reflects endothelial NO formation in human forearm vasculature: evidence for biochemical assessment of the endothelial L-arginine-NO pathway. Cardiovasc Res., 1999. 41(3): p. 765-72.
- 79- Metzger IF, Sertorio JT, Tanus-Santos JE. Relationship between systemic nitric oxide metabolites and cyclic GMP in healthy male volunteers. Acta Physiol (Oxf), 2006. 188(2): p. 123-7.
- 80- Kleinbongard P, et al. Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans. Free Radic Biol Med, 2006. 40(2): p. 295-302.
- 81- Rassaf T, et al. Plasma nitrite reserve and endothelial function in the human forearm circulation. Free Radic Biol Med, 2006. 41(2): p. 295-301.
- 82- Lauer T, et al. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(22): p. 12814-9.
- 83- Bachetti T, et al. Ace-inhibition with quinapril modulates the nitric oxide pathway in normotensive rats. J Mol Cell Cardiol, 2001. 33(3): p. 395-403.
- 84- Comini L, et al. Therapeutic modulation of the nitric oxide: all ace inhibitors are not equivalent. Pharmacol Res, 2007. 56(1): p. 42-8.
- 85- Miguel-Carrasco JL, et al. Comparative effects of captopril and l-carnitine on blood pressure and antioxidant enzyme gene expression in the heart of spontaneously hypertensive rats. Eur J Pharmacol, 2010. 632(1-3): p. 65-72.
- 86- Hartman JC. The role of bradykinin and nitric oxide in the cardioprotective action of ACE inhibitors. Ann Thorac Surg, 1995. 60(3): p. 789-92.

- 87- Yang XP, et al. Endothelial nitric oxide gene knockout mice: cardiac phenotypes and the effect of angiotensin-converting enzyme inhibitor on myocardial ischemia/reperfusion injury. *Hypertension*, 1999. 34(1): p. 24-30.
- 88- Nejatizadeh A, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes and circulating nitric oxide levels significantly associate with risk of essential hypertension. *Free Radic Biol Med*, 2008. 44(11): p. 1912-8.
- 89- Hyndman ME, et al. The T-786-->C mutation in endothelial nitric oxide synthase is associated with hypertension. *Hypertension*, 2002. 39(4): p. 919-22.
- 90- Zago AS, et al. [Effect of physical activity and t-786C polymorphism in blood pressure and blood flow in the elderly]. *Arq Bras Cardiol*, 2010. 95(4): p. 510-6.
- 91- 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): p. 357-61.
- 92- Nagassaki S, et al. eNOS T-786C polymorphism affects atorvastatin-induced changes in erythrocyte membrane fluidity. *Eur J Clin Pharmacol*, 2009. 65(4): p. 385-92.
- 93- Muniz JJ, et al. Endothelial nitric oxide synthase genotypes and haplotypes modify the responses to sildenafil in patients with erectile dysfunction. *Pharmacogenomics J*, 2011.
- 94- Mason RP, et al. Effects of Angiotensin Receptor Blockers on Endothelial Nitric Oxide Release - The Role of eNOS Variants. *Br J Clin Pharmacol*, 2012.
- 95- Fallo F, et al. Bradykinin B2 receptor gene C-58T polymorphism and insulin resistance. A study on obese patients. *Horm Metab Res*, 2004. 36(4): p. 243-6.
- 96- Maltais I, et al. Bradykinin B2 receptor gene polymorphism is associated with altered urinary albumin/creatinine values in diabetic patients. *Can J Physiol Pharmacol*, 2002. 80(4): p. 323-7.

- 97- Milan A, et al. Bradykinin B2 receptor gene (-58T/C) polymorphism influences baroreflex sensitivity in never-treated hypertensive patients. J Hypertens, 2005. 23(1): p. 63-9.
- 98- Niu W, et al. A meta-analysis of the bradykinin B2 receptor gene --58C/T polymorphism with hypertension. Clin Chim Acta, 2010. 411(5-6): p. 324-8.
- 99- Mukae S, et al. Bradykinin B(2) receptor gene polymorphism is associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor-related cough. Hypertension, 2000. 36(1): p. 127-31.
- 100- Mukae S, et al. Association of polymorphisms of the renin-angiotensin system and bradykinin B2 receptor with ACE-inhibitor-related cough. J Hum Hypertens, 2002. 16(12): p. 857-63.



7- ANEXOS



Ribeirão Preto, 01 de outubro de 2009

Ofício nº 3312/2009
CEP/MGV

Prezado Professor,

O trabalho intitulado **“MARCADORES GENÉTICOS E BIOQUÍMICOS ENVOLVIDOS NA RESPOSTA TERAPÊUTICA AO ENALAPRIL”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 296ª Reunião Ordinária realizada em 28/09/2009, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 9237/2009.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DR. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
PROF. DR. JOSÉ EDUARDO TANUS DOS SANTOS
DRª. ELAINE CRISTINA BELTRAMIN MARTINS
Depto. de Farmacologia da FMRP-USP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - INTERVENÇÃO

“Marcadores genéticos e bioquímicos envolvidos na resposta terapêutica ao enalapril”

Responsáveis:

Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos (FMRP-USP) (0xx16 3602 3163)

Dra. Elaine Cristina Beltramin Martins (SAMSP-HC/USP) (0xx16 3602 2330)

Dr. Celso Biagi (Santa Casa de Araçatuba) (0xx18 3622 1120)

Colaboradores:

Vanessa Fontana - Pós-graduanda (FMRP-USP) (0xx16 97944843)

Pâmela S. Silva - Pós-graduanda (FCM-Unicamp) (0xx1688211908)

Você está sendo convidado (a) a participar de um estudo cujos detalhes são:

1) Este projeto pretende basicamente estudar se algumas variações comuns de alguns dos seus genes (que transmitem características hereditárias) estão associadas à resposta ao tratamento com o anti-hipertensivo enalapril. Além disso, pretendemos estudar como estas variações podem modificar as quantidades de algumas substâncias produzidas pelo seu organismo presentes no seu sangue. Isto poderá nos auxiliar no entendimento das alterações benéficas que acontecem mediante o uso deste medicamento.

2) Sua participação neste estudo será:

Serão retirados, por 3 vezes, 30mL do seu sangue, ao longo de 2 meses, por punção venosa utilizando técnica adequada. Este volume de sangue é cerca de 20 (vinte) vezes menor do que o volume de sangue habitualmente doado quando um indivíduo doa sangue para bancos de sangue. Este sangue será utilizado para realizar todos os estudos laboratoriais mencionados acima.

3) Você terá direito a ressarcimento financeiro caso ocorram gastos gerados exclusivamente pela sua participação como voluntário desta pesquisa.

4) O paciente que venha participar dessa pesquisa em nível de pós-graduação, caso tenha algum dano decorrente da pesquisa, não abre mão dos seus direitos de indenização de acordo com as leis vigentes no país. Saliento ainda que o medicamento que será utilizado neste estudo é aprovado para uso no país, sendo preconizado para o controle da hipertensão.

5) Como qualquer outro medicamento, o tratamento com enalapril pode causar efeitos indesejáveis. Dentre eles estão: queda de pressão arterial, tontura, dor de cabeça, cansaço e fraqueza. Outros efeitos colaterais menos comuns incluem tosse seca, desmaio, náuseas, diarreia, câibras musculares, disfunção renal e manifestações alérgicas, como erupção cutânea e inchaço das extremidades, lábios, língua e/ou laringe.

Obs.: Na presença de qualquer um desses sintomas, procure o médico para que os procedimentos apropriados sejam realizados.

6) NÓS NÃO PODEMOS E NÃO GARANTIREMOS QUE VOCÊ RECEBERÁ QUALQUER BENEFÍCIO DIRETO DESTA PESQUISA.

7) Indiretamente, acreditamos que este estudo trará como benefício um entendimento dos efeitos benéficos do enalapril em pacientes hipertensos, bem como na obtenção de marcadores genéticos de resposta a este medicamento.

8) Qualquer dado que possa ser publicado posteriormente em revistas científicas, não revelará a sua identidade. Entretanto, órgãos governamentais ligados à saúde podem solicitar informações a respeito da pesquisa e identidade dos voluntários nela envolvidos.

9) Você pode retirar o seu consentimento para participar deste estudo a qualquer momento, inclusive sem justificativas e sem qualquer prejuízo para você.

10) Você terá a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa e o tratamento a que será submetido. Qualquer questão a respeito do estudo ou de sua saúde deve ser dirigida ao Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), à Dra. Elaine Cristina Beltramin Martins, médica pertencente ao SAMSP-HC/USP e ao Dr. Celso Biagi, médico da Santa Casa de Araçatuba ou às Pós-graduandas Vanessa Fontana e Pâmela S. Silva do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP). O telefone do Comitê de Ética em Pesquisa da FMRP é 016-3602-2228.

Eu, _____,
abaixo assinado, declaro que em ____/____/____ fui devidamente informado em detalhes pelo pesquisador responsável no que diz respeito ao objetivo da pesquisa, aos procedimentos que serei submetido, aos riscos e benefícios, à forma de ressarcimento no caso de eventuais despesas, bem como à indenização quanto por danos decorrentes da pesquisa. Declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram asseguradas e acima relacionadas.

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade de participar do referido projeto.

_____, _____ de _____ de _____.

Assinatura do voluntário

Assinatura do investigador/testemunha

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - CONTROLE

“Marcadores genéticos e bioquímicos envolvidos na resposta terapêutica ao enalapril”

Responsáveis:

Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos (FMRP-USP) (0xx16 3602 3163)

Dra. Elaine Cristina Beltramin Martins (SAMSP-HC/USP) (0xx16 3602 2330)

Dr. Celso Biagi (Santa Casa de Araçatuba) (0xx18 3622 1120)

Colaboradores:

Vanessa Fontana - Pós-graduanda (FMRP-USP) (0xx16 97944843)

Pâmela S. Silva - Pós-graduanda (FCM-UNICAMP) (0xx1688211908)

Você está sendo convidado (a) a participar deste estudo um voluntário (a) sadio (a). O intuito de sua participação neste estudo visa fornecer dados para serem comparados com os aqueles provenientes dos indivíduos hipertensos tratados com o enalapril.

Os detalhes do estudo são:

1) Este projeto pretende basicamente estudar se algumas variações comuns de alguns dos seus genes (que transmitem características hereditárias) estão associadas à resposta ao tratamento com o anti-hipertensivo enalapril. Além disso, pretendemos estudar como estas variações podem modificar as quantidades de algumas substâncias produzidas pelo seu organismo presentes no seu sangue. Isto poderá nos auxiliar no entendimento das alterações benéficas que acontecem mediante o uso deste medicamento.

2) Sua participação neste estudo será:

Serão retirados, por 3 vezes, 30mL do seu sangue, ao longo de 2 meses, por punção venosa utilizando técnica adequada. Este volume de sangue é cerca de 20 (vinte) vezes menor do que o volume de sangue habitualmente doado quando um indivíduo doa sangue para bancos de sangue. Este sangue será utilizado para realizar todos os estudos laboratoriais mencionados acima.

3) Você terá direito a ressarcimento financeiro caso ocorram gastos gerados exclusivamente pela sua participação como voluntário desta pesquisa.

4) O paciente que venha participar dessa pesquisa em nível de pós-graduação, caso tenha algum dano decorrente da pesquisa, não abre mão dos seus direitos de indenização de acordo com as leis vigentes no país. Saliento ainda que o medicamento que será utilizado neste estudo é aprovado para uso no país, sendo preconizado para o controle da hipertensão.

5) NÓS NÃO PODEMOS E NÃO GARANTIREMOS QUE VOCÊ RECEBERÁ QUALQUER BENEFÍCIO DIRETO DESTA PESQUISA.

6) Indiretamente, acreditamos que este estudo trará como benefício um entendimento dos efeitos benéficos do enalapril em pacientes hipertensos, bem como na obtenção de marcadores genéticos de resposta a este medicamento.

7) Qualquer dado que possa ser publicado posteriormente em revistas científicas, não revelará a sua identidade. Entretanto, órgãos governamentais ligados à saúde podem solicitar informações a respeito da pesquisa e identidade dos voluntários nela envolvidos.

8) Você pode retirar o seu consentimento para participar deste estudo a qualquer momento, inclusive sem justificativas e sem qualquer prejuízo para você.

9) Você terá a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa e o tratamento a

que será submetido. Qualquer questão a respeito do estudo ou de sua saúde deve ser dirigida ao Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), à Dra. Elaine Cristina Beltramin Martins, médica pertencente ao SAMSP-HC/USP e ao Dr. Celso Biagi, médico da Santa Casa de Araçatuba ou às Pós-graduandas Vanessa Fontana e Pâmela S. Silva do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP). O telefone do Comitê de Ética em Pesquisa da FMRP é 016-3602-2228.

Eu, _____,
abaixo assinado, declaro que em ____/____/____ fui devidamente informado em detalhes pelo pesquisador responsável no que diz respeito ao objetivo da pesquisa, aos procedimentos que serei submetido, aos riscos e benefícios, à forma de ressarcimento no caso de eventuais despesas, bem como à indenização quanto por danos decorrentes da pesquisa. Declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram asseguradas e acima relacionadas.

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade de participar do referido projeto.

_____, _____ de _____ de _____.

Assinatura do voluntário

Assinatura do investigador/testemunha