

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia

INGRID FERREIRA METZGER

**“Influência de haplótipos da sintase endotelial do óxido
nítrico (NO) sobre a biodisponibilidade sistêmica de NO.”**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

INGRID FERREIRA METZGER

“Influência de haplótipos da sintase endotelial do óxido nítrico (NO) sobre a biodisponibilidade sistêmica de NO.”

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

**RIBEIRÃO PRETO – SP
2006**

FICHA CATALOGRÁFICA

Metzger, Ingrid Ferreira

Influência de haplótipos da sintase endotelial do óxido nítrico (NO) sobre a biodisponibilidade sistêmica de NO. Ribeirão Preto, 2006.

86 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Tanus-Santos, José Eduardo.

1. Sintase endotelial do óxido nítrico. 2. Polimorfismo. 3. Haplótipo. 4. Nitrato.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ingrid Ferreira Metzger

“Influência de haplótipos da sintase endotelial do óxido nítrico (NO) sobre a biodisponibilidade sistêmica de NO.”

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Farmacologia

Aprovada em: 21 de junho de 2006

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Instituição: FMRP – USP Assinatura: _____

Prof. Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata

Instituição: FCF – USP Assinatura: _____

Prof. Dr. José Antonio Marin-Neto

Instituição: FMRP – USP Assinatura: _____

**Dedico este trabalho às pessoas que mais amo,
minha família querida (Ana Maria, César, Kelen e Gláucia),
que sempre me apoiaram e estão presentes em todos os momentos
de minha vida.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, a razão maior de nossa existência, nosso criador amado, pai e amigo mais fiel.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos, pela grande oportunidade que me proporcionou como orientador, afinal é verdadeiramente um orientador, que incentiva o crescimento profissional e pessoal de seus alunos. Sendo um dos professores mais presentes que já conheci, inclusive como conselheiro e amigo. Como me fizeram bem nossas longas conversas e divagações.

À minha família querida e amada: meus pais, Ana Maria e César, e minhas irmãs Kelen e Gláucia. Obviamente não estaria aqui hoje se não fosse graças a eles. Agradeço por terem me agüentado, me acalmando e dado todo apoio frente ao menor sinal de problema ou insegurança. Vocês são meu porto seguro.

Aos meus padrinhos, tio Evaldo e tia Elsie que vem acompanhando todos os meus passos desde que me conhecem.

Agradeço muito a Deus por ter colocado em minha vida pessoas tão especiais, amigos sinceros, que em minha vida estiveram presentes e atuantes.

À minha amiga, mais que especial, Valéria David, não tenho palavras para expressar o quanto você foi e é importante em minha vida. Simplesmente me acompanha desde a infância. Você é minha irmã de coração.

Aos grandes amigos Henrique, Valéria, Thais, Débora, Kátia e Karla, companheiros de todas as horas, que acompanharam de perto todos as etapas deste trabalho e tudo o que se passou em paralelo a ele.

Às minhas amigas Sarinha, Paulinha e Dri, que agora estão mais distantes (geograficamente), mas sempre presentes de alguma forma, me ouvindo e ajudando nas dificuldades, além de compartilhar todos os momentos.

A todos os integrantes do laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Farmacogenética, que em conjunto proporcionam um ambiente tão agradável de trabalho e convivência.

A todos os professores do Departamento de Farmacologia, em especial a professora Dr^a. Glória Emília Petto de Souza e professor Dr. Francisco Silveira Guimarães pela maravilhosa orientação e atenção dedicados.

Aos secretários Sônia, José Ramon e Fátima pela paciência e ajuda com os assuntos burocráticos vários que não conseguimos fugir.

Aos voluntários, afinal sem a colaboração deles não poderíamos realizar este trabalho.

Aos colegas dos laboratórios do Departamento de Farmacologia, e às pessoas que contribuíram de alguma forma para que este trabalho se realizasse.

Ao CNPq (Conselho nacional de pesquisa) a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante o período do mestrado.

Aos membros julgadores dessa dissertação.

“Bendito o homem que confia no Senhor, e cuja esperança é o Senhor.

***Porque ele é como a árvore plantada junto às águas,
que estende as suas raízes para o ribeiro
e não receia quando vem o calor, mas sua folha fica verde,
e no ano de sequeidão não se perturba
nem deixa de dar fruto”***

JEREMIAS 17:7-8

RESUMO

RESUMO

Associações entre polimorfismos no gene da eNOS e as concentrações plasmáticas de nitratos e nitritos (NOx) ainda apresentam controversias. No presente trabalho comparamos a distribuição dos haplótipos envolvendo três polimorfismos relevantes do gene da eNOS (T⁻⁷⁸⁶C na região promotora; 4b/4a Intron 4, e Glu298Asp no Exon 7) em indivíduos saudáveis com concentrações plasmáticas de NOx altos e baixos. Estudamos um grupo homogêneo de 154 voluntários (homens, brancos, em jejum, não fumantes, com idade entre 18-60 anos de idade, e que não faziam uso de qualquer medicamento). O DNA genômico foi extraído das amostras de sangue total, a genotipagem foi realizada por PCR seguido de digestão com enzima de restrição. O NOx circulante foi determinado pela técnica de quimioluminescência. As frequências haplotípicas foram comparadas entre dois grupos de voluntários: os 30 indivíduos com baixas concentrações plasmáticas de NOx (grupo L) e os 30 indivíduos com altas concentrações de NOx plasmático (Grupo H). Os concentrações de NOx nos grupos L e H foram de 24,2±4,5 µM e 80,9±8,9 µM, respectivamente. As frequências genotípicas para os três polimorfismos não apresentaram diferenças significativas comparando-se os grupos (todos com P > 0,05, no teste χ^2). Entretanto, o haplótipo incluindo o alelo "C" (promotor), 4b (intron 4) e Glu (Exon 7) mostrou-se significativamente mais comum no grupo L (16%) do que no grupo H (4%) (P=0,0047). As frequências dos demais haplótipos não apresentaram diferenças entre os grupos. Enquanto que, ao avaliar a existência de associação entre genótipos da eNOS com NOx circulante, não encontramos diferenças entre os grupos L e H, o haplótipo específico incluindo os alelos "C", "4b" e "Glu" apresentou associação com baixas concentrações de NOx circulante.

Palavras chaves: Sintase endotelial do óxido nítrico, Genótipos, Haplótipos, Óxido nítrico, Polimorfismos.

ABSTRACT

ABSTRACT

Controversy exists regarding the effects of polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene on nitrites/nitrates (NOx) plasma concentrations. In this study we compared the distribution of haplotypes involving three relevant eNOS polymorphisms (T⁻⁷⁸⁶C in the promoter region; 4b/4a in intron 4, and Glu298Asp in Exon 7) in healthy subjects with low and high circulating NOx levels. We studied 154 subjects (fasting, white males, who were non-smokers, 18-60 years of age, and not taking any medication). Genomic DNA was isolated from blood samples and genotypes were determined by PCR and restriction fragment length digestion. Circulating NOx was determined by chemiluminescence. Results: Haplotypes frequencies were compared in two groups of subjects: those with the 30 lowest NOx levels (group L) and those with the 30 highest NOx levels (group H). NOx levels in group L and H were 24.2±4.5 µM and 80.9±8.9 µM, respectively. Genotypes frequencies for the three polymorphisms were not different when the two groups were compared (all P>0.05, χ^2 -test). However, the haplotype including the alleles C (promoter), 4b (intron 4), and Glu (exon 7) was significantly more common in group L (16%) than in group H (4%) (P=0.0047). The frequencies of the remaining haplotypes were not different among group L and H. While eNOS genotypes are not significantly associated with changes in the circulating NOx concentrations, the specific eNOS haplotype that includes the “C”, “4b”, and “Glu” alleles is associated with lower circulating NOx concentrations.

Key words: Endothelial Nitric Oxide Synthase, Genotypes, Haplotypes, Nitric Oxide, Polymorphisms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

FIGURAS:

Figura 1 - Representação esquemática das eNOS	20
Figura 2 - Dimerização da eNOS.....	21
Figura 3 - NO circulante.....	23
Figura 4 - Potenciais vias de decomposição do NO no sangue humano.....	25
Figura 5 - Organização do gene da eNOS e a localização dos polimorfismos estudados.....	29
Figura 6 - Fluoxograma simplificado dos experimentos realizados	40
Figura 7 - Genotipagem para o polimorfismo T ⁻⁷⁸⁶ C na região promotora, do 4a/4b Intron 4 e do polimorfismo Glu298Asp no exon 7 do gene da eNOS	45
Figura 8 - Construção da curva de calibração.....	47
Figura 9 - Gráfico da Curva de Calibração de dosagem de NOx, em amostras de plasma.....	48

TABELAS:

Tabela 1 - Características demográficas dos participantes do estudo.....	52
Tabela 2 - Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos T ⁻⁷⁸⁶ C, Glu298Asp e Intron 4, na população em estudo, comparando-se os grupos L e H	55
Tabela 3 - Estimativa da frequência de haplótipos na população estudada.....	56

GRÁFICOS:

Gráfico 1 - Concentrações plasmáticas de NOx dos 154 voluntários sadios agrupados por polimorfismos e genótipos.....	54
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - Porcentagem

Asp - Aspartato

BanII - Enzima de restrição utilizada para genotipagem para o polimorfismo Glu298Asp no exon 7 da eNOS

BH₄ - Tetraidrobiopterina

bpm - Batimentos por minuto

CAD - Doença arterial coronariana

CaM - Complexo cálcio-calmodulina

cGMP - 3',5', guanosina monofosfato cíclica

CysNO - S-nitrosocisteína

DP - Desvio Padrão

e⁻ - elétron

eNOS - Sintase endotelial do óxido nítrico

FAD - Flavina-adenina dinucleotídeo

FC - Frequência Cardíaca

FMN - Flavina mono nucleotídeo

FMRP - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Glu - Glutamato

Grupo H - Altas plasmáticas de NOx

Grupo L - Baixas concentrações plasmáticas de NOx

GSNO - S-nitrosoglutamina

GTP - Guanosina trifosfato

H⁺ - Radical hidreto

Haplótipo - Combinação de alelos de polimorfismos em um mesmo gene

HapMap - Mapa de haplótipos humano

Hb - deoxihemoglobina

HCl - Ácido clorídrico

HCRP - Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto

IMC - Índice de Massa Corpórea (peso em quilogramas / (Altura em Metro)²)

iNOS - Sintase induzida do óxido nítrico

L- Arg - L-Arginina

metHb - metahemoglobina

MspI - Enzima de restrição utilizada para genotipagem para o polimorfismo T⁻⁷⁸⁶C na região promotora da eNOS

N - Número

NADPH - Nicotinamida-adenina dinucleotídeo

NaOH - Hidróxido de sódio

nNOS - Sintase neuronal do óxido nítrico

NO - Óxido Nítrico

NO₂⁻ - Nitrito

NO₃⁻ - Nitrato

NOHb - nitrosilhemoglobina

NOSI - Sintase neuronal do óxido nítrico

NOSIII - Sintase endotelial do óxido nítrico

NOx - Espécies relacionadas ao óxido nítrico (nitrato + nitrito)

NS - não significativo

O₂ - Oxigênio molecular

O₂⁻ - Superóxido

OONO⁻ - Peroxinitrito

PAD - Pressão Arterial Diastólica

PAS - Pressão Arterial Sistólica

pb - pares de base

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

RNA_m – RNA mensageiro

RSH - Grupo sulfidril

RSNO - Nitrosotióis

sGC - Guanilato ciclase solúvel

SNOA_{1b} - S-nitrosilalbumina

SNP - *Single nucleotide polymorphism* (Polimorfismo de única base)

TA - Tampão de amostra

TBE - Tris-Ácido Bórico-EDTA

Teste χ^2 - teste qui-quadrado

USP - Universidade de São Paulo

VNTR - *Variable number of tandem repeats* (variado número de repetições em tandem)

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMO.....	6
ABSTRACT	8
LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. Óxido nítrico.....	19
2.2. Os papéis fisiológicos do óxido nítrico.....	23
2.3. NOx plasmático refletem a atividade da eNOS.....	24
2.4. Polimorfismos genéticos.....	25
2.5. Polimorfismos no gene da eNOS e sua relevância clínica.....	27
3. HIPÓTESE	33
4. OBJETIVO	35
5. MATERIAIS.....	37
5.1. Seleção dos voluntários.....	38
5.2. Soluções e tampões utilizados nos protocolos experimentais.....	38
5.3. Equipamentos utilizados nos protocolos experimentais.....	39
6. MÉTODOS.....	40
6.1. Processamento das amostras.....	40
6.2. Extração do DNA genômico.....	40
6.3. Genotipagem para o polimorfismo da região Promotora (T-786C) do gene da eNOS	41
6.3.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	41
6.3.2. Digestão com enzima de restrição MspI.....	42

6.3.3. Separação dos produtos de digestão	42
6.3.4. Coloração por Nitrato de Prata 0,2%	42
6.4. Genotipagem para o polimorfismo Glu298Asp no Exon 7 do gene da eNOS...	43
6.4.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	43
6.4.2. Digestão com enzima de restrição BanII	43
6.5. Genotipagem para o polimorfismo do intron 4 do gene da eNOS.....	44
6.6. Biodisponibilidade de NO.....	46
6.6.1. Desproteíntização das amostras de plasma (Dosagem de NOx)	46
6.6.2. Curva padrão (com nitrato de sódio) para dosagem de NOx plasmático.....	46
6.6.3. Quantificação de Nitrato	48
6.7. Dosagem de Triglicérides e Colesterol Total	49
6.8. Análise estatística dos resultados e estimativa da Frequência de Haplótipos ..	49
7. RESULTADOS.....	51
7.1. Características dos participantes do estudo	52
7.2. Genotipagem para os polimorfismo do gene da eNOS.....	52
7.3. Nitrato plasmático versus características genéticas.....	54
8. DISCUSSÃO	57
9. CONCLUSÕES	63
ANEXO A - Termo de Consentimento do Voluntário.....	65
ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP/USP ..	67
ANEXO C - Artigo (Pharmacogenetics and Genomics 2005, 15:565–570).....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O óxido nítrico (NO) é conhecido como um importante regulador do sistema cardiovascular (IGNARRO et al. 1987; PALMER et al. 1987). É uma molécula altamente reativa (LANCASTER 1997), produzida pela sintase endotelial do óxido nítrico (eNOS), principalmente em células endoteliais e plaquetas, sendo responsável pela manutenção basal do tônus vascular, inibição da agregação plaquetária, atenuação da adesão leucocitária ao endotélio e modulação da proliferação das células musculares lisas (COOKE et al. 1997). Devido a estas características, um grande número de estudos tem focado a investigação de como polimorfismos do gene da eNOS podem estar associados a doenças cardiovasculares (HINGORANI 2001).

Dentre os polimorfismos existentes no gene da eNOS, três tem sido mais estudados: o polimorfismo de base única (SNP - *single nucleotide polymorphism*) na região promotora (T⁻⁷⁸⁶C), o SNP no exon 7 (Glu298Asp) e um polimorfismo de “variado número de repetições em tandem” (VNTR - *variable number of tandem repeats*) no intron 4 (HINGORANI 2001; TANUS-SANTOS et al. 2001). Entretanto alguns estudos buscaram determinar os mecanismos de como essas variações genéticas podem afetar a atividade enzimática da eNOS. Até o momento são limitadas as evidências associando a produção de NO com o polimorfismo no exon 7 (FAIRCHILD et al. 2001), e não existem evidências de alterações associadas ao VNTR no intron 4 (HINGORANI 2001). Já o polimorfismo T⁻⁷⁸⁶C foi associado com uma redução de aproximadamente 50 % da atividade enzimática da região promotora (MIYAMOTO et al. 2000; NAKAYAMA et al. 1999), demonstrando experimentalmente que esta variação genética apresenta uma função fisiológica relevante.

O NO é rapidamente oxidado a nitrito e nitrato (NOx) *in vivo* e *in vitro*, porém, a quantificação de NOx plasmático, proveniente de sangue coletado após 12h de jejum, reflete a produção endógena de NO (BAYLIS et al. 1998; HIBBS et al. 1992; ROSSELLI et al. 1995; WANG et al. 1997). Alguns estudos averiguaram como os polimorfismos no gene da eNOS podem afetar as concentrações plasmáticas de NOx, sendo que muitos desses não levaram em consideração a influência de fatores que podem alterar o NOx plasmático, como dieta, sexo, etnicidade, condições clínicas, uso de medicamentos, tabagismo e contaminação química ambiental (ELLIS et al. 1998). Além do mais, a maioria desses estudos privilegiou o efeito de um único polimorfismo sobre as concentrações de NOx circulantes (ADACHI et al. 1998; MOON et al. 2002; NAGASSAKI et al. 2005; WANG et al. 1997), o que pode levar a conclusões limitadas, já que isto gera uma diminuição no poder para detecção de efeitos modestos. Devido a estas limitações, encontramos, nos estudos anteriores, muitos resultados controversos associando possíveis efeitos de polimorfismos no gene da eNOS sobre as concentrações de NOx circulante. Por exemplo, foi relatado que o alelo “C” do polimorfismo na região promotora está associado com concentrações de NOx plasmático baixas (MIYAMOTO et al. 2000), semelhantes (JEEROOBURKHAN et al. 2001; NASREEN et al. 2002), ou altas (HASSAN et al. 2004). Ainda, a presença do alelo “4a” para o polimorfismo no intron 4 também foi associado com concentrações de NOx plasmático baixas (TSUKADA et al. 1998), semelhantes (KIMURA et al. 2003; Yoon et al. 2000), ou altas (WANG et al. 1997). Finalmente, o alelo “Asp” do polimorfismo no exon 7 foi associado com concentrações de NOx semelhantes (MOON et al. 2002) ou altas (YOON et al. 2000).

No presente estudo, nós avaliamos, simultaneamente, o efeito dos três polimorfismos do gene da eNOS citados acima sobre o NOx plasmático, em um grupo 154 voluntários relativamente homogêneos, do qual foram excluídos todos os fatores que poderiam interferir na quantificação de NOx. Nós comparamos a distribuição dos haplótipos envolvendo os três polimorfismos relevantes da eNOS nos voluntários com concentrações baixas e altas de NOx plasmático.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) é uma molécula altamente difusível cuja estabilidade é limitada pela baixa meia-vida (apenas alguns segundos), além de participar de uma variedade de reações químicas com metais, tióis e espécies reativas de oxigênio (BECKMAN et al. 1996).

O NO é sintetizado a partir da L-arginina através da atividade catalítica de três isoformas da óxido nítrico sintase (NOS) presente em vários tecidos (EC 1.14.13.39, catálogo enzimático). As três isoformas da NOS são: neuronal (nNOS ou NOSI), induzida (iNOS ou NOSII) e endotelial (eNOS ou NOSIII), sendo esta última codificada pelo gene localizado na região 7q35-36 (CHRISTOPHERSON et al. 1997; DAVIS et al. 2001; NATHAN et al. 1994; SASE et al. 1995). Essas três isoenzimas apresentam grande homologia estrutural, podendo ser divididas em dois domínios: um redutor, na parte C-terminal, e outro oxidante, na parte N-terminal. No domínio redutor estão os sítios de ligação para o nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NADPH) e os cofatores flavina-adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN), os quais transferem elétrons para o grupo heme, localizado no domínio oxidante, onde também se ligam o tetraidrobiopterina (BH₄) e o substrato L-Arg (Figura 1) (BARRETO et al. 2005; COOKE et al. 1997).

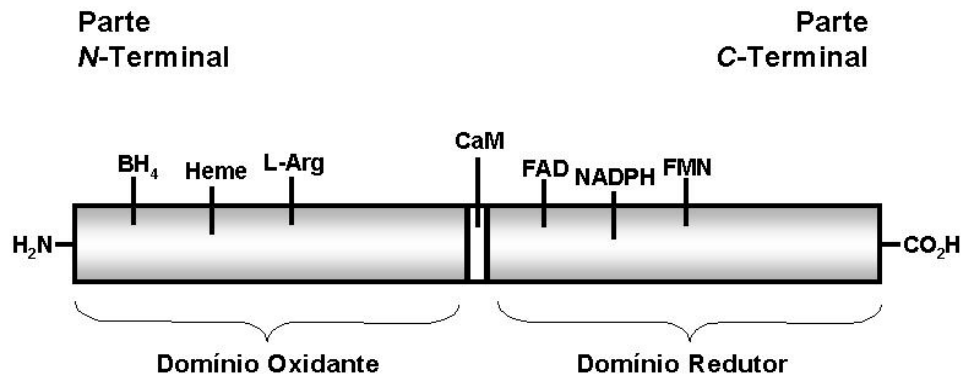


Figura 1 – Representação esquemática das eNOS (BARRETO et al. 2005).

As três isoformas são funcionais somente como estruturas diméricas, ocorrendo à interação entre seus domínios. É importante observar que entre os domínios *N*-terminal e *C*-terminal, fica situado o sítio de ligação do Ca⁺² à calmodulina (CaM). Este serve num mecanismo alostérico (em que a interação de um ligante num sítio específico é influenciada pela interação de um outro ligante em sítio distinto), responsável pelo alinhamento do domínio redutor com o domínio oxidante, o que permite a transferência de elétron das flavinas para o grupo heme (Figura 2) (ABU-SOUD et al. 1993).

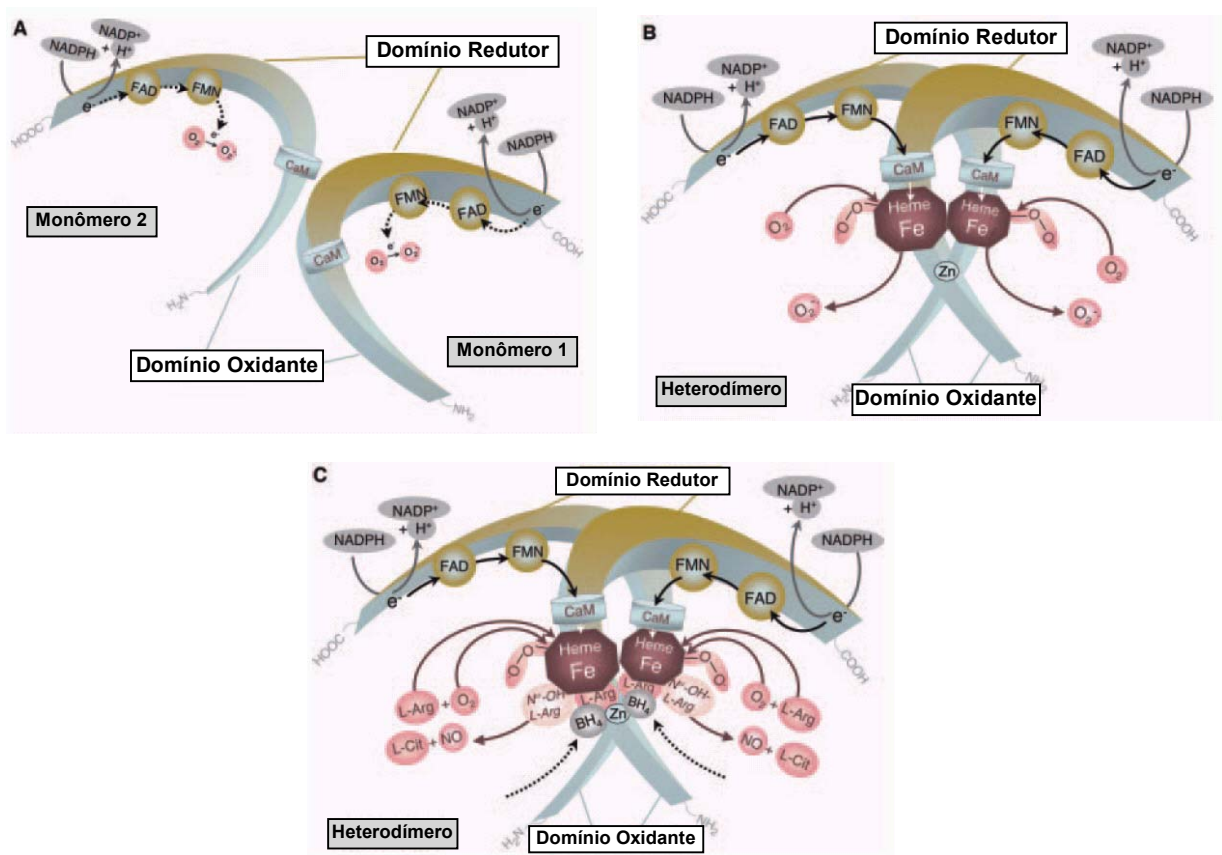


Figura 2 – Dimerização da eNOS: (A) Estrutura básica da eNOS e esquema da catálise pela NOS. Todas as NOS são sintetizadas como monômeros. Cada subunidade é composta de um domínio redutor e um oxidante. Os monômeros apresentam os domínios redutores que são capazes de transferir elétrons do NADPH para as flavinas FAD e FMN, sendo esta capacidade limitada pela para a redução de oxigênio molecular a O_2^- . Os monômeros e seus domínios redutores se ligam à calmodulina (CaM), estimulando a transferência de elétrons no domínio redutor. (B) A presença do heme na dimerização da NOS; de fato o heme é o único cofator absolutamente requerido para a formação dos dímeros ativos da NOS. O heme é essencial para a interação entre os domínios oxidantes e redutores, e para a transferência de elétrons inter-domínios, das flavinas para o heme do monômero adjacente. (C) Quando existem em quantidade suficiente o substrato L-Arg e o cofator BH_4 , e o dímero de NOS encontra-se formado, ocorre à redução do heme pelo O_2 , sintetizando o NO, a L-citrulina é formada a partir do produto intermediário dN^O -hidroxi-L-arginine (FORSTERMANN et al. 2006).

A eNOS é uma isoforma da NOS dependente do complexo cálcio-calmodulina, tem como substratos oxigênio molecular (O_2) e fosfato de NADPH, e como cofatores a BH_4 , FAD, FMN e protoporfirina IX (heme) (COOKE & DZAU 1997; STUEHR et al. 1992). A eNOS encontra-se principalmente em células endoteliais vasculares e nas plaquetas, e é a principal responsável pela síntese de NO no sistema cardiovascular (CHRISTOPHERSON & BREDT 1997; DAVIS et al. 2001; NATHAN & XIE 1994; SASE & MICHEL 1995).

Resumidamente, os efeitos do NO podem ser definidos em duas categorias quanto ao mecanismo de ação:

1) Independente de GMP cíclico (3',5', guanosina monofosfato cíclica; cGMP), onde as espécies reativas de nitrogênio são produzidas como resultado da interação do NO com o oxigênio ou radicais superóxido, e podem causar oxidação, nitração, nitrosilação, nitração e deaminação de DNA (ANDREOPOULOS et al. 2000; DAVIS et al. 2001; MONCADA et al. 1993; MORO et al. 1996).

2) Dependente de cGMP, envolvendo a produção deste pela ativação da guanilato ciclase solúvel (sGC) pelo NO, ao ligar-se à porção heme desta enzima, a partir da guanosina trifosfato (GTP) (ANDREOPOULOS & PAPAPETROPOULOS 2000; DAVIS et al. 2001; MONCADA & HIGGS 1993; MORO et al. 1996).

Vários dos efeitos fisiológicos do NO dependem do aumento das concentrações de cGMP. Por exemplo, está claramente demonstrado que a ação vasodilatadora do NO, bem como sua ação anti-agregante plaquetária são mediadas, ao menos em parte, pelo aumento das concentrações de cGMP (MONCADA & HIGGS 1993; MORO et al. 1996).

2.2. OS PAPÉIS FISIOLÓGICOS DO ÓXIDO NÍTRICO

O NO participa de vários processos fisiológicos, como relaxamento da musculatura lisa vascular, inibição do recrutamento, adesão e agregação plaquetária, neurotransmissão no SNC e periférico, e mecanismos de defesa, participando nas respostas imunológicas e no processo inflamatório (Figura 3) (COOKE & DZAU 1997; MONCADA & HIGGS 1993). Com essas propriedades e outras mais, o NO desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase cardiovascular, regulando o tônus vascular, fluxo sangüíneo regional e a pressão sangüínea sistêmica, além de conferir propriedades tromborresistente e ateroprotetora ao endotélio. Assim, prejuízos na sua produção ou biodisponibilidade contribuem para o desenvolvimento de vários estados fisiopatológicos, como a predisposição à hipertensão, aterosclerose, doença coronariana, trombose, vaso espasmos, entre outras (JEEROOBURKHAN et al. 2001; MONCADA & HIGGS 1993; WANG et al. 1997).

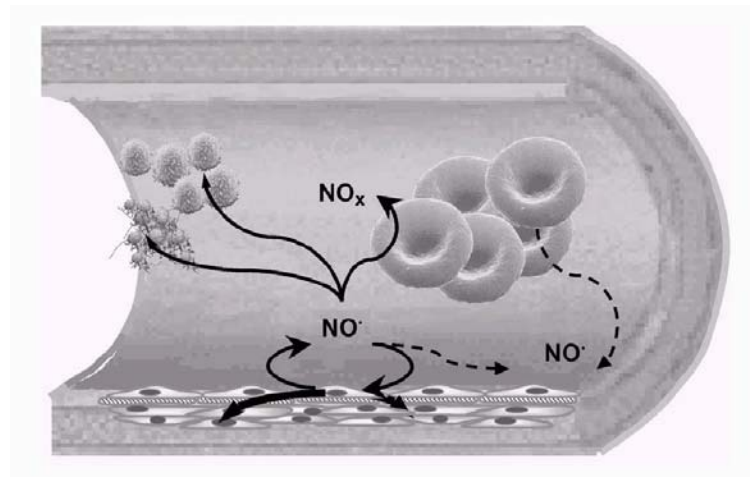


Figura 3 – NO circulante. Desde que o NO é liberado ele exerce seus efeitos sobre as células da parede vascular e também no lúmen, sendo que uma parte significativa do NO produzido pelo endotélio age diretamente sobre o sangue. O NO é então rapidamente metabolizado pela hemoglobina presente nos eritrócitos, parte do NO bioativo é conservado no sangue agindo diretamente sobre células sanguíneas incluindo plaquetas, leucócitos e eritrócitos, sofrendo reações oxidativas e nitrosativas no plasma e eritrócitos, sendo transportado através dos vasos (RASSAF et al. 2004).

2.3. NO_x PLASMÁTICO REFLETE A ATIVIDADE DA eNOS

O NO participa de várias e complexas reações químicas no organismo. Apresenta curta meia-vida e pequenas concentrações plasmáticas dificultando a avaliação quantitativa da produção de NO *in vivo* pelos tecidos. Por este motivo, quantificações de espécies relacionadas ao NO têm sido usadas para avaliar sua produção. Entre elas, a quantificação de nitritos e nitratos plasmáticos, principais produtos da oxidação do NO (NO_x), são as mais comumente utilizadas (DAVIS et al. 2001). Vale ainda ressaltar que as medidas de NO_x após 12 horas de jejum refletem a produção endógena de NO, independentemente de fatores dietéticos (BAYLIS et al. 1998; CASTILLO et al. 1996; HIBBS et al. 1992; RHODES et al. 1995; ROSSELLI et al. 1995; WANG et al. 1997).

Ao ser liberado no endotélio vascular o NO pode se difundir através das células musculares lisas levando à vasodilatação, e na luz vascular pode reagir com a oxihemoglobina dos eritrócitos, se transformado em nitrito (biologicamente ativo), que em seguida é oxidado a nitrato, um composto biologicamente inativo (Figura 4) (COSBY et al. 2003; MONCADA & HIGGS 1993; WANG et al. 2004).

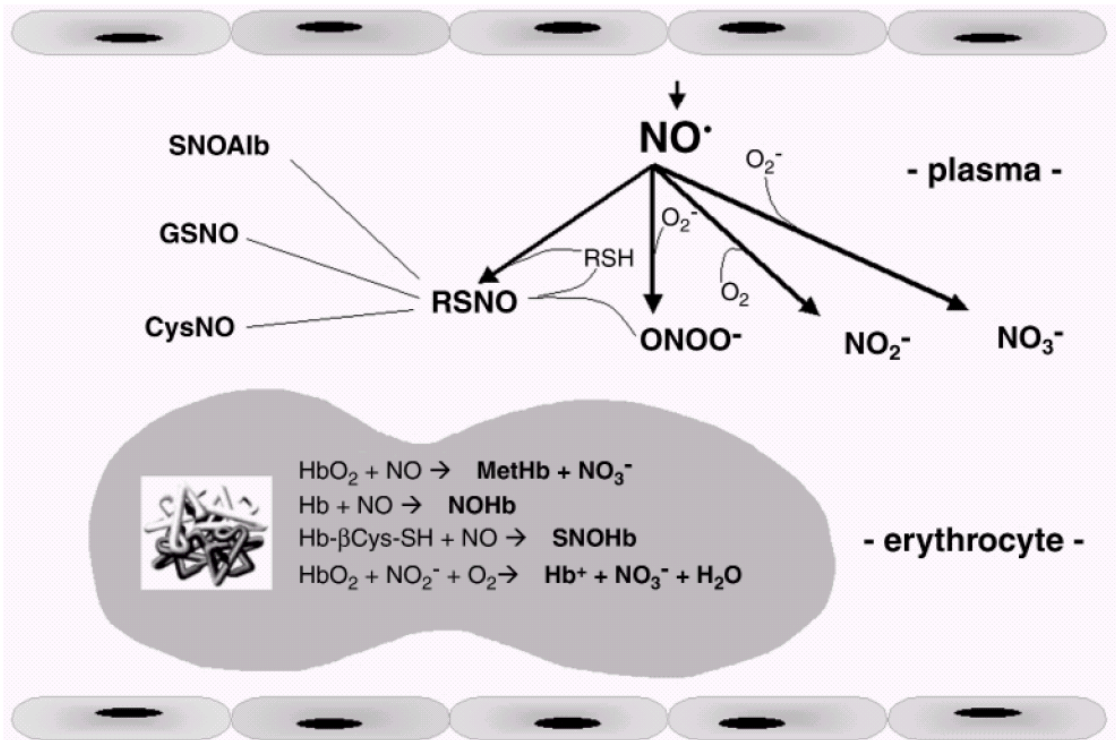


Figura 4 – Potenciais vias de decomposição do NO no sangue humano. No plasma o NO pode reagir com oxigênio molecular, formando nitrito (NO_2^-) ou peroxinitrito (OONO^-), com subsequente decomposição do nitrito a nitrato (NO_3^-). Uma alternativa é o grupo nitrosônio do NO reagir com tióis formando nitrosotióis (RSNO). Além disso o NO pode reagir com a oxihemoglobina eritrocitária formando metahemoglobina (metHb) e NO_3^- , ou com a deoxihemoglobina resultando na nitrosilhemoglobina (NOHb), ou ainda com o resíduo Cys93 da subunidade β da hemoglobina. E ainda, o NO_2^- plasmático pode entrar em contato com os eritrócitos, sofrendo uma oxidação dependente de hemoglobina, que resulta na formação de NO_3^- . SNOAlb, S-nitrosilalbumina; GSNO, S-nitrosoglutationa; CysNO, S-nitrosocisteína, RSH, grupo sulfidril (LAUER et al. 2002).

2.4. POLIMORFISMOS GENÉTICOS

Devido a enorme importância do sistema do óxido nítrico na manutenção do sistema cardiovascular, iniciou-se a procura de variações (polimorfismos) no gene da eNOS que explicassem diferentes níveis de atividade ou expressão desta enzima e, possivelmente, um maior risco de doença cardiovascular nos portadores destas variações genéticas (HINGORANI 2001; WANG et al. 2000b)

Cada pessoa carrega duas cópias dos genes que possuem (com exceção dos genes ligados ao sexo), porém os indivíduos podem ter diferenças na seqüência de DNA em determinados loci de cromossomos. Variações nessas seqüências que

ocorrem na população de forma estável com frequência de 1% ou superior são denominados de polimorfismos (EVANS et al. 1999; THORISSON et al. 2003). As formas mais comuns de polimorfismos genéticos são deleções, mutações, substituições de simples troca de nucleotídeo (SNP) e de variações no número de seqüências repetidas (VNTR), e VNTR em micro e mini satélites (GRIFFITHS et al. 2002).

Os polimorfismos genéticos podem afetar a estabilidade de um RNAm transcrito, a estrutura conformacional de uma proteína, e até mesmo a capacidade de transcrição do DNA, o que está associado, em muitos casos, à redução ou aumento da atividade da proteína codificada (EVANS & RELLING 1999; THORISSON & STEIN 2003). Todos esses fatores descritos tornam o estudo de polimorfismos genéticos uma área muito promissora e com grandes possibilidades de aplicação clínica.

O genoma humano possui cerca de 30.000 genes, com um total de 3,12 bilhões de nucleotídeos, com mais de 2 milhões de polimorfismos, sendo que a ocorrência de SNPs possui uma frequência de 1 para 1.250 pares de bases (1:1.250 pb) (INGELMAN-SUNDBERG 2001; VENTER et al. 2001). Uma grande variedade de SNPs, identificada após o sequenciamento do genoma, pode ser acessada no endereço: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_summary.cgi.

Uma outra abordagem para o estudo das variações genéticas (polimorfismos) é a busca por “combinação de alelos de polimorfismos em um mesmo gene” (haplótipo) que possivelmente estejam associados, por exemplo, a doenças cardiovasculares. É de grande interesse o estudo da estrutura haplotípica humana para a identificação de marcadores genéticos, pois: A) Esta estrutura pode fornecer informações críticas sobre a história evolutiva humana e para a identificação de

variantes genéticas que são fundamentais para a determinação das características humanas; e B) Atualmente as tecnologias moleculares possibilitam o estudo de mais de cem mil polimorfismos genéticos em amostras populacionais de um tamanho razoável (ZHAO et al. 2003).

A análise haplotípica é um método muito útil não somente para a identificação de genes relacionados a doenças raras, mas também de doenças comuns, apresentando, freqüentemente, maior poder de detecção de pequenas diferenças, em comparação com a análise feita utilizando somente um único polimorfismo (JOHNSON et al. 2001; RIOUX et al. 2001). Em vista disso, em outubro de 2005, o Consórcio Internacional HapMap (<http://www.Hapmap.org>), traçou-se os perfis de variações presentes no genoma humano, concluindo o mapa de haplótipos (HapMap) (ALTSHULER et al. 2005; LIN et al. 2005). Este projeto ampliou os conhecimentos obtidos com o projeto genoma, descrevendo padrões comuns de variações genéticas, em amostras de DNA de populações com ascendência africana, asiática e europeia. Foram identificadas regiões cromossômicas com sequências de SNPs fortemente associados (haplótipo) e o SNPs marcadores que identificam estas seqüências (haplótipos marcadores) (ALTSHULER et al. 2005; DALY et al. 2001; GOLDSTEIN et al. 2003; DAWSON et al. 2002).

2.5. Polimorfismos NO GENE DA ENOS E SUA RELEVÂNCIA CLÍNICA

Muitos estudos demonstram associação de polimorfismos genéticos com doenças cardiovasculares tais como hipertensão, infarto do miocárdio, espasmo coronário, doenças vasculares cerebrais, vários tipos de doenças renais, trombose venosa profunda (HINGORANI 2001; WANG & WANG 2000b) e com concentrações plasmáticas de nitrato e nitrito (HINGORANI 2001; PARRA et al. 2003). Entretanto,

esses estudos apresentam resultados contraditórios e que apresentam inconsistências (CARDON et al. 2001). Possíveis explicações para as inconsistências encontradas relacionando concentrações plasmáticas de nitrato/nitrito (NO_x), doenças cardiovasculares e polimorfismos genéticos se devem ao fato de que a maioria dos estudos correlacionou somente um polimorfismo com as variações fisiopatológicas, e muitos deles não levarem em consideração fatores como diferenças entre os sexos, efeitos do ciclo menstrual, idade, raça, condição clínica, uso de medicamentos e o tabagismo que podem interferir nos estudos (ELLIS et al. 1998; ROSSELLI et al. 1995). Além do fato de que alguns trabalhos não terem sido elaborados com a finalidade de avaliar os efeitos de polimorfismo do gene da eNOS sobre o NO_x plasmático, o que leva a uma redução do poder de detecção de efeitos modestos (CARDON & BELL 2001). Frente a isto, os trabalhos realizados por nosso grupo, incluindo os referentes aos polimorfismos do gene da eNOS, privilegiam o uso de amostras com menor possibilidade de interferentes, usando grupos homogêneos quanto ao sexo, idade, raça e características clínicas (NAGASSAKI et al. 2005; TANUS-SANTOS et al. 2001).

Desde que o gene da eNOS foi seqüenciado, muitos polimorfismos genéticos foram identificados. Dentre eles três recebem mais atenção, devido aos achados que demonstram relevância clínica: o SNP na região promotora (T-786C), outro SNP no exon 7 (Glu298Asp) e o polimorfismo de variável número de repetições de 27-pb (VNTR) localizado no Intron 4 (Figura 5) (HINGORANI 2001; TANUS-SANTOS et al. 2001). Sendo a frequência dos alelos (ou variantes genéticas) destes polimorfismos é influenciada pela etnicidade.

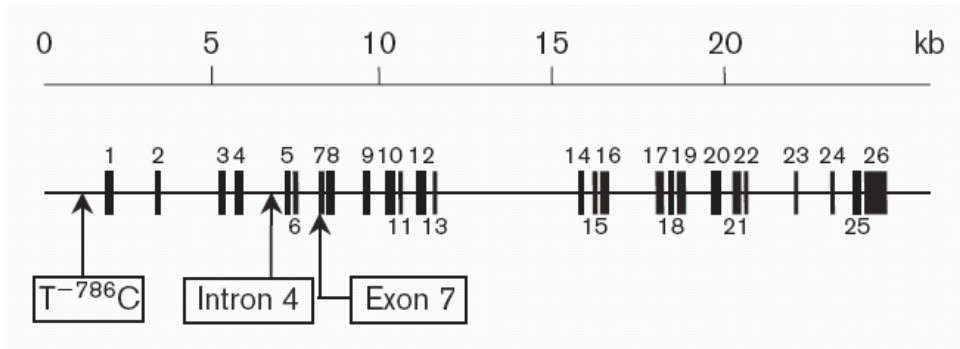


Figura 5 – Organização do gene da eNOS e a localização dos polimorfismos estudados. A linha superior indica a escala em kilobases. O gene da eNOS é composto por 26 exons. Os polimorfismos estudados estão destacados nas caixas (TANUS-SANTOS et al. 2001).

O polimorfismo da região promotora é descrito como T⁻⁷⁸⁶C, o que indica que a base de número -786 da região promotora (posição 786 acima do início do gene da eNOS) pode conter uma base T (alelo mais comum) ou C (alelo mais raro). Estudos *in vitro* indicam que o polimorfismo T⁻⁷⁸⁶C no promotor do gene da eNOS pode reduzir em cerca de 50% a atividade do promotor. Estes demonstram que a ocorrência do alelo “C” reduz as concentrações celulares de RNA mensageiro para eNOS em cerca de 50%, o que poderia explicar o risco aumentando para doença coronariana (MIYAMOTO et al. 2000; NAKAYAMA et al. 1999).

Vários trabalhos avaliaram o efeito dos polimorfismos no gene da eNOS citados sobre a biodisponibilidade de NOx circulante. Mas a maioria destes encontrou resultados controversos. No caso do polimorfismo na região promotora, o alelo “C” foi associado com concentrações de NOx plasmático baixas (MIYAMOTO et al. 2000), semelhantes (JEEROOBURKHAN et al. 2001; NASREEN et al. 2002), ou altas (HASSAN et al. 2004). Em nosso laboratório demonstramos que o polimorfismo T⁻⁷⁸⁶C não afeta significativamente as concentrações plasmáticas de NOx. Vale ressaltar que o estudo foi desenhado para detectar diferenças menores do que 30% nas concentrações de NOx, realizado numa população sadia e homogênea (NAGASSAKI et al. 2005).

O polimorfismo no Intron 4 no gene da eNOS também tem sido correlacionado com doenças cardiovasculares (HOOPER et al. 1999; ICHIHARA et al. 1998; WANG et al. 1996) tais como hipertensão (PULKKINEN et al. 2000; UWABO et al. 1998) e doença arterial coronariana (CAD) (WANG et al. 1996). Na população brasileira são presentes os alelos 4b, 4a e 4c, sendo que este último só foi encontrado em indivíduos negros (MARRONI *et al.* 2005). Em pacientes com diabetes tipo 2, o alelo 4a foi associado com aterosclerose em coronárias (PARK et al. 2006). Já o alelo “4c” foi associado com o desenvolvimento de doença cardiovascular (SIGUSCH et al. 2000) e, em caucasianos, como fator de risco para asma (YANAMANDRA et al. 2005). Vale notar que o trabalho de Yanamandra e colaboradores refere-se ao alelo “4c” como novo, embora este já houvesse sido descrito anteriormente como por Sigusch e colaboradores em 2000 e Marroni e colaboradores em 2005 e Tanus-Santos e colaboradores em 2001.

Estudos demonstram que o alelo 4a, do polimorfismo no intron 4, diminui a expressão enzimática e as concentrações plasmáticas de NO (4a/4a é 20 % menor que 4b/4b) (TSUKADA et al. 1998). Em oposição a isto, outro trabalho mostrou que, na presença do alelo 4a, a atividade enzimática da eNOS aumenta em mais de 4 vezes, além da quantidade de mRNA e proteína também estarem significativamente aumentadas (WANG et al. 2000a). A presença do alelo “4a” foi associada com concentrações de NOx plasmático baixas (TSUKADA et al. 1998), semelhantes (KIMURA et al. 2003; YOON et al. 2000), ou altas (WANG et al. 1997).

Discrepâncias entre os estudos também têm sido encontradas em relação à associação do SNP no Exon 7 (Glu298Asp) e a incidência de doença cardiovascular. Dados obtidos na população japonesa demonstram que o alelo Asp neste polimorfismo está associado com espasmo e infarto do miocárdio (SHIMASAKI et al.

1998; YOSHIMURA et al. 1998) e hipertensão (SHOJI et al. 2000), o que não se confirmou em caucasianos franceses (POIRIER et al. 1999), australianos (CAI et al. 1999) e também em coreanos (YOON et al. 2000).

No caso do polimorfismo no exon 7, estudo *in vivo* documentou que pacientes com o variante Asp do polimorfismo no Exon 7 apresentam maior reatividade à estimulação com alfa-adrenérgicos, sugerindo um decréscimo na atividade da eNOS (PHILIP et al. 1999), embora trabalhos mais recentes não tenham mostrado associação entre este variante e a atividade da eNOS (GOLSER et al. 2003). Usando o NOx como indicativo da atividade da eNOS, um estudo realizado por Malhotra e colaboradores (2004) demonstrou que o alelo Asp deste polimorfismo, em indivíduos obesos, está associado à diminuição nas concentrações plasmáticas de NOx (MALHOTRA et al. 2004). Esse mesmo alelo foi associado com concentrações de NOx semelhantes (MOON et al. 2002) ou altas (YOON et al. 2000). Já estudos realizados em uma população sadia, não houve associação entre o alelo Asp e o NOx plasmático (JEEROBURKHAN et al. 2001).

Ao avaliar a interação entre os polimorfismos T⁻⁷⁸⁶C e Intron 4 observou-se que homocigotos CC para o polimorfismo da região promotora, quando presente o alelo 4a (Intron 4) possui concentrações maiores de NOx do que quando esta variação genética está ausente (HASSAN et al. 2004). Já estudos *in vitro*, dos polimorfismos T⁻⁷⁸⁶C e Intron 4, demonstraram a existência de uma regulação haplótipo-dependente da eficiência da transcrição e atividade enzimática da eNOS. Quando avaliada somente a região promotora, a presença do “C” reduz a transcrição em relação ao “T” (NAKAYAMA et al. 1999; WANG et al. 2002).

Vale ressaltar que a maioria dos estudos citados acima levou em consideração os efeitos de um único polimorfismo sobre as concentrações

plasmáticas de NO_x (ADACHI et al. 1998; MOON et al. 2002; NAGASSAKI et al. 2005; WANG et al. 1997). Isto pode levar a conclusões limitadas, já que este tipo de análise apresenta baixo poder para detectar variações modestas relacionadas à presença de polimorfismos genéticos. Como resultado desta limitação, podemos observar a existência de muitas controvérsias em relação aos possíveis efeitos dos polimorfismos no gene da eNOS sobre as concentrações de NO_x circulantes.

Buscando elucidar o efeito dos polimorfismos do gene da eNOS, avaliados conjuntamente (haplótipos), sobre as concentrações plasmáticas de NO_x, o presente trabalho estudou uma população homogênea de 154 voluntários, onde controlamos a maioria dos fatores conhecidos que podem afetar as concentrações plasmáticas de NO_x. Comparamos a distribuição dos haplótipos da eNOS, envolvendo os três polimorfismos relevantes deste gene, nos indivíduos com concentrações baixas e altas de NO_x circulante.

HIPÓTESE

3. HIPÓTESE

A hipótese básica deste projeto é que existam diferenças na distribuição de haplótipos incluindo os variantes genéticos de três polimorfismos relevantes da eNOS: T⁻⁷⁸⁶C, Glu298Asp e 4b/4a Intron4, quando se comparam indivíduos com baixa e alta concentração de NOx plasmático.

OBJETIVO

4. OBJETIVO

Avaliar a possível associação entre haplótipos da eNOS envolvendo os três polimorfismos citados (T⁻⁷⁸⁶C, VNTR no Intron 4 e Glu298Asp) e as concentrações plasmática de NOx em indivíduos que não apresentavam doenças crônicas diagnosticadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

5. MATERIAIS

5.1. SELEÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS

Foi selecionado um grupo homogêneo de 154 voluntários homens, não tabagistas, brancos, de 18 a 60 anos de idade, que não estivessem fazendo uso de qualquer medicamento no período do estudo, que não apresentavam doenças crônicas diagnosticadas, selecionados na cidade de Ribeirão Preto-SP.

Na ocasião da coleta das amostras de sangue, os voluntários estavam em jejum de 12 h, e após detalhamento e esclarecimento do projeto, assinaram o termo de consentimento. Aferiu-se três vezes a pressão arterial e a frequência cardíaca, após 15 minutos de repouso.

Este trabalho, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido destinado aos voluntários participantes do estudo, foram devidamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Ambos, Termo de Consentimento e Parecer do Comitê de Ética, seguem anexos a este trabalho.

5.2. SOLUÇÕES E TAMPÕES UTILIZADOS NOS PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

As soluções utilizadas foram:

- EDTA 0,5M pH8
- Solução de Acetato de Potássio 5M
- Solução fixadora (10% etanol absoluto, 1% ácido acético)
- Solução de Coloração (0,18% nitrato de prata)
- Solução Reveladora (3% NaOH, 1% formaldeído).
- Solução de Poliacrilamida (2,9% acrilamida, 0,01% bisacrilamida, em TBE 10X).

- Solução de persulfato de amônio 10%
- Enzima de restrição Msp I e Ban II (Biolab – New England)
- Soluções padrão de nitrato de sódio
- Solução de HCl 1N
- Solução de NaOH 0,1 e 1M
- Solução de Vanádio III (0,008 g/L HCl 1N)
- Solução de Proteinase K (20mg/mL)
- Etanol 70%
- Isopropanol

Os tampões utilizados foram:

- Tampão Cell lysis (1% Tris-Cl pH8, 0,2% EDTA pH8 e 0,1% SDS)
- Tampão Red Blood Cell Lysis (2% Tris-Cl pH8 1M)
- Tampão Tris-EDTA (TE) (1% Tris-Cl pH8 1M, 0,2% EDTA pH8).
- Tampão Tris-Ácido Bórico-EDTA (TBE) (10,8% Tris-base, 5,5% ácido bórico, 4% EDTA pH8 0,5M).
- Tampão de amostra (TA) (40% sacarose, 0,25% azul de bromofenol).

5.3. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NOS PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

- Centrífuga (CELM LS – 3 plus)
- Termociclador (P x 2 Thermal Cycler – Thermo Electron Corporation)
- Banho Maria (Nova Ética)
- Fonte de eletroforese (Electrophoresis Power Supply - EPS 301)
- Sistema de fotodocumentação (Kodak EDAS 290)
- Analisador de NO (Sievers Model 280 NO analyser – Boulder, CO, EUA)
- Leitor de ELISA (Spectramax 250 Molecular Devices)
- Espectrofotômetro para quantificação da concentração de DNA genômico extraído

6. MÉTODOS

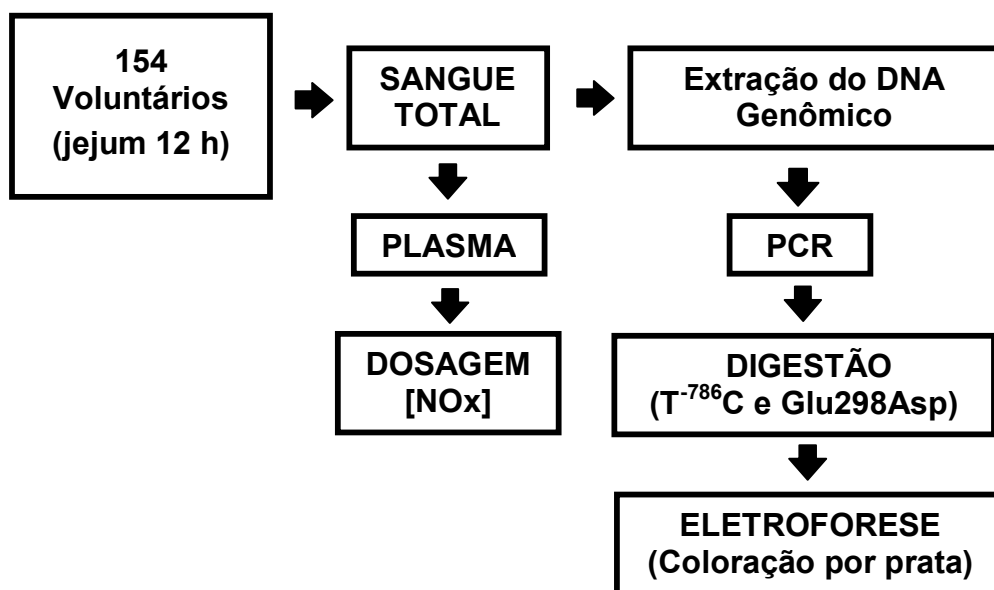


Figura 6 - Fluxograma simplificado dos experimentos realizados

6.1. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue venoso periférico foram coletadas para a obtenção de soro (6 mL de sangue total) e plasma (20 mL de sangue total), como EDTA como anticoagulante. No soro foram quantificados triglicérides, colesterol total e frações. O sangue coletado em EDTA foi dividido em 2 porções. Sendo uma de sangue total, para a extração do DNA e a partir da segunda porção de sangue foi obtido plasma para quantificação Nitrato. Imediatamente após a coleta, o sangue para obtenção de plasma foi centrifugado a 3000 rpm por 10 min e o plasma separado e mantido em gelo seco até o momento de armazenagem a -70°C .

6.2. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO (Sambrook e Russell, 2001)

Para a extração do DNA de cada amostra, em três tubos eppendorfs foram adicionados 300 μL de *sangue Total* e 900 μL de *Tampão Red Blood Cell*. Homogeinizou-se por 10 minutos e após, os tubos foram centrifugados por 20 seg a máxima velocidade (temp. ambiente). Descartou-se o sobrenadante e os *pellets*

foram reunidos em um único tubo. Adicionou-se *Tampão Cell Lysis* gelado, e os tubos foram homogeneizados invertendo-os de 30 a 50 vezes (precipitação SDS).

Adicionou-se 3 μL de proteinase K (20 mg/mL) e este tubo foi incubado em BM a 55°C de 3 a 16 h, posteriormente sendo resfriado a temperatura ambiente. Adiciona-se, então, 200 μL de solução de Acetato de Potássio, misturando em vortex por 20 seg. Incubou-se em gelo por 5 min e em seguida centrifuga-se a velocidade máxima por 3 min a 4°C. Em um novo tubo coloca-se o sobrenadante juntamente com 600 μL de Álcool Isopropílico (Isopropano), este foi homogeneizado e centrifugado a máxima velocidade por 1 min, sendo o sobrenadante descartado por aspiração. Adicionou-se 600 μL de Etanol 70% ao pellet de DNA pra lava-lo. Centrifugou-se a máxima velocidade por 1 min. Removeu-se o sobrenadante por aspiração e com papel de filtro.

O *pellet* de DNA foi seco a temperatura ambiente por 15 min, e em seguida foi redissolvido em 50 μL de TE (pH 7,6), incubando em BM a 65°C por 1 hora, ou 16 h à temperatura ambiente. Posteriormente foi realizada a quantificação do DNA genômico em espectrômetro próprio para quantificação de DNA, onde obtem-se a absorbância em 260 e 280 nm, Relação 260/280 e Concentração do DNA em ng/ μL .

6.3. GENOTIPAGEM PARA O POLIMORFISMO DA REGIÃO PROMOTORA (T⁻⁷⁸⁶C) DO GENE DA ENOS (MARRONI et al. 2005; TANUS-SANTOS et al. 2001)

6.3.1. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Foi preparada uma solução de PCR contendo, no volume final de 25 μL para 1 amostra, 6,25 pmol de cada *primer* (sense: 5'- TGG AGA GTG CTG GTG TAC CCC A - 3'; antisense: 5'- GCC TCC ACC CCC ACC CTG TC -3'), 200 μmol de cada dNTP (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 1,5 mM de MgCl₂, 2,5 μL de tampão 10X

da enzima Taq polimerase, e 5 unidades da enzima Taq polimerase e 100 ng de DNA genômico. A reação de PCR foi aquecida a 94 °C por 4 min para a desnaturação e passando por 35 ciclos de 94°C por 30 seg., 65°C por 30 seg. para hibridização e 72°C por 1 min para extensão. Finalmente, para garantir a extensão, a reação permaneceu a 72°C por mais 5 min. A amplificação resultou em fragmentos de 180 pb.

6.3.2. DIGESTÃO COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO *MspI*

Os produtos da reação de PCR foram digeridos pela enzima de restrição *MspI*. Cada reação era constituída de 2 unidades da *MspI*, tampão da enzima 10X e 5 µL do produto de PCR. Incubou-se por 3 horas a 37°C.

6.3.3. SEPARAÇÃO DOS PRODUTOS DE DIGESTÃO

Realizou-se uma eletroforese dos fragmentos obtidos na digestão, em gel de poliacrilamida a 12 % com tampão de corrida TBE, com cuba para eletroforese da Amersham. A separação eletroforética foi realizada com corrente elétrica de 20 mA (Fonte: Eletrophoresis Power Supply – EPS 301) para cada gel (15 cm), durante 1h e 30 min. Fez-se a coloração do gel por Nitrato de prata, e os resultados da genotipagem foram analisados. Após a digestão e coloração com nitrato de prata apareceram fragmentos de 140 pb e 40 pb quando for o alelo *wild type* e de 90, 50 e 40 pb para o alelo variante.

6.3.4. COLORAÇÃO POR NITRATO DE PRATA 0,2%

No processo de coloração, as amostras foram fixadas com a solução fixadora (etanol 95° a 10% + Ac. Acético 1 %) por 10 min, sob agitação. Em seguida

o gel foi lavado com água corrente e depois ficou imerso na solução de coloração (Nitrato de prata 0,2%) por 30 min, também sob agitação. Lavou-se novamente o gel com água. Por fim o gel foi colocado na solução de revelação (NaOH 3% + Formaldeído 1%), mantendo-o sob agitação, até que as bandas aparecessem com uma coloração castanha bem evidente. Lavou-se o gel com água para interromper a reação. Foi realizada a fotodocumentação de cada gel com uso do Sistema de Fotodocumentação (Kodak EDAS 290).

6.4. GENOTIPAGEM PARA O POLIMORFISMO GLU298ASP NO EXON 7 DO GENE DA ENOS

(MARRONI et al. 2005; TANUS-SANTOS et al. 2001)

6.4.1. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Para detecção do polimorfismo Glu298Asp no exon 7 do gene da eNOS, preparou-se uma solução de PCR contendo, no volume final de 25 µL para 1 amostra, 6,25 pmol de cada *primer*. Usou-se os *primers* (sense: 5'-AAG GCA GGA GAC AGT GGA TGG A-3' e antisense: 5'-CCC AGT CAA TCC CTT TGG TGC TCA-3'), 200 µmol de cada dNTP, 2,5 mM de MgCl₂, 2,5 µL tampão 10X da enzima Taq polimerase, e 5 unidades da enzima Taq polimerase e 100 ng de DNA genômico. Procedeu-se os ciclos da PCR da mesma forma que para a genotipagem para o polimorfismo T⁻⁷⁸⁶C (item B). Obtendo como produto da amplificação fragmentos de 258 pb.

6.4.2. DIGESTÃO COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO BANII

Os fragmentos resultantes da PCR foram então digeridos com a enzima de restrição BanII por 6 horas a 37 °C. A solução Mix de Digestão foi preparada para cada amostra, contendo, 1 unidade da MspI, tampão da enzima 10X e 5 µL do

produto de PCR. Realizou-se uma eletroforese da mesma forma descrita para o polimorfismo T⁻⁷⁸⁶C.

Analisando o gel, observaram-se fragmentos de digestão de 163 pb e 85 pb quando não há a presença da variação genética (*wild type*), enquanto que quando existe a variação genética, não ocorre digestão aparecendo o fragmento de produto de PCR com 258 pb.

6.5. GENOTIPAGEM PARA O POLIMORFISMO DO INTRON 4 DO GENE DA ENOS (MARRONI et al. 2005; TANUS-SANTOS et al. 2001)

Foram utilizados 300 ng de DNA genômico em cada reação de cadeia da polimerase (PCR). Nestas reações (volume final de 40 µl) incluiu-se, além do DNA genômico: 10 pmol de cada *primer* (sense: 5'- AGG CCC TAT GGT AGT GCC TTT - 3'; antisense: 5'- TCT CTT AGT GCT GTG GTC AC -3'), 200 nM de cada dNTP, 2 mM de Cloreto de Magnésio, 4 µl de 10X tampão de PCR, e 5U de Taq Polimerase. As reações de PCR foram conduzidas conforme descrevemos anteriormente para a genotipagem do polimorfismo da região promotora da eNOS, sendo neste caso a temperatura de hibridização igual a 63°C. Os produtos destas reações foram analisados após eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%. A separação eletroforética foi realizada utilizando uma corrente elétrica de 15 mA para cada gel (15 cm), durante 2h, com tampão de corrida TBE, e depois corado pela prata, conforme já descrito. A presença de fragmentos com 393 pb indica a presença do alelo 4a e com 420 pb do alelo 4b.

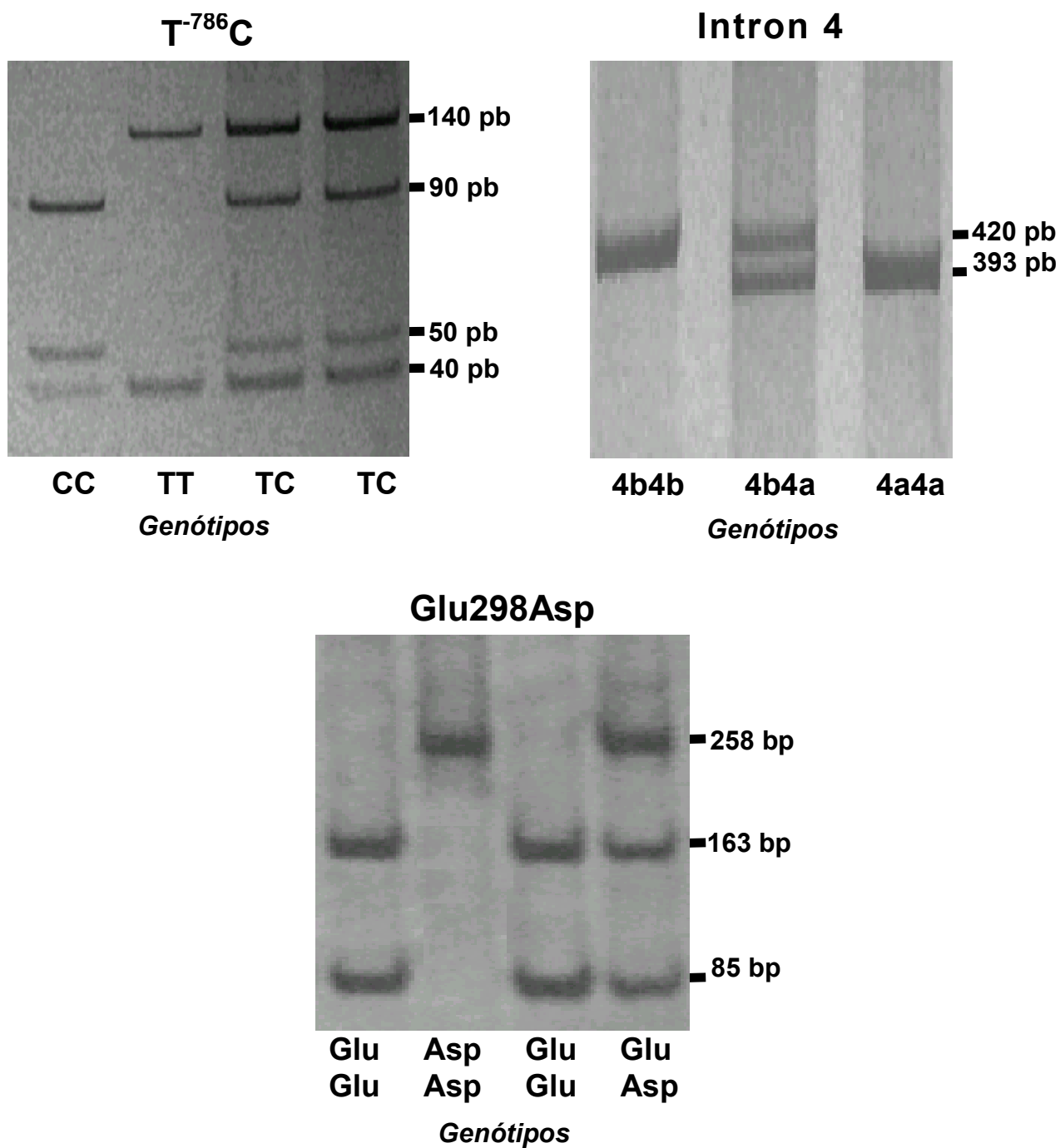


Figura 7 - Genotipagem para o polimorfismo T⁻⁷⁸⁶C na região promotora, do 4a/4b Intron 4 e do polimorfismo Glu298Asp no exon 7 do gene da eNOS.

6.6. BIODISPONIBILIDADE DE NO

6.6.1. DESPROTEINIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA (DOSAGEM DE NITRATO)

(MARRONI et al. 2005; REITER et al. 2002; TANUS-SANTOS et al. 2002; TANUS-SANTOS et al. 2001).

Visando evitar formação de bolhas, em função da presença de proteínas no plasma, as amostras de plasma foram desproteinizadas pelo etanol a frio (0 °C), na proporção de 1:2 (1 parte de Amostra para 2 de Etanol). Após a adição do etanol e agitação em vórtex, as amostras foram mantidas em repouso por 30 min a 0 °C (em banho de gelo, na geladeira). Centrifugou-se a 14.000g por 5 min, e separou-se o sobrenadante para a dosagem dos produtos do óxido nítrico. Devido à diluição do plasma (1 para 3), multiplicamos por 3 os resultados encontrados nas dosagens.

6.6.2. CURVA PADRÃO (COM NITRATO DE SÓDIO) PARA DOSAGEM DE NOX PLASMÁTICO

Para a montagem da curva de calibração para dosagem de produtos do NO (nitratos+nitritos), preparou-se soluções padrão de Nitrato de Sódio nas seguintes concentrações: 0,5, 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µM.

Com uso do Analisador de NO (Sievers Model 280 NO Analyzer - Boulder, CO, EUA), fez-se as leituras de cada um dos padrões em triplicata. Também se realizou a dosagem do “branco” (água miliQ, usada no preparo das soluções-padrão), correspondendo à concentração Zero.

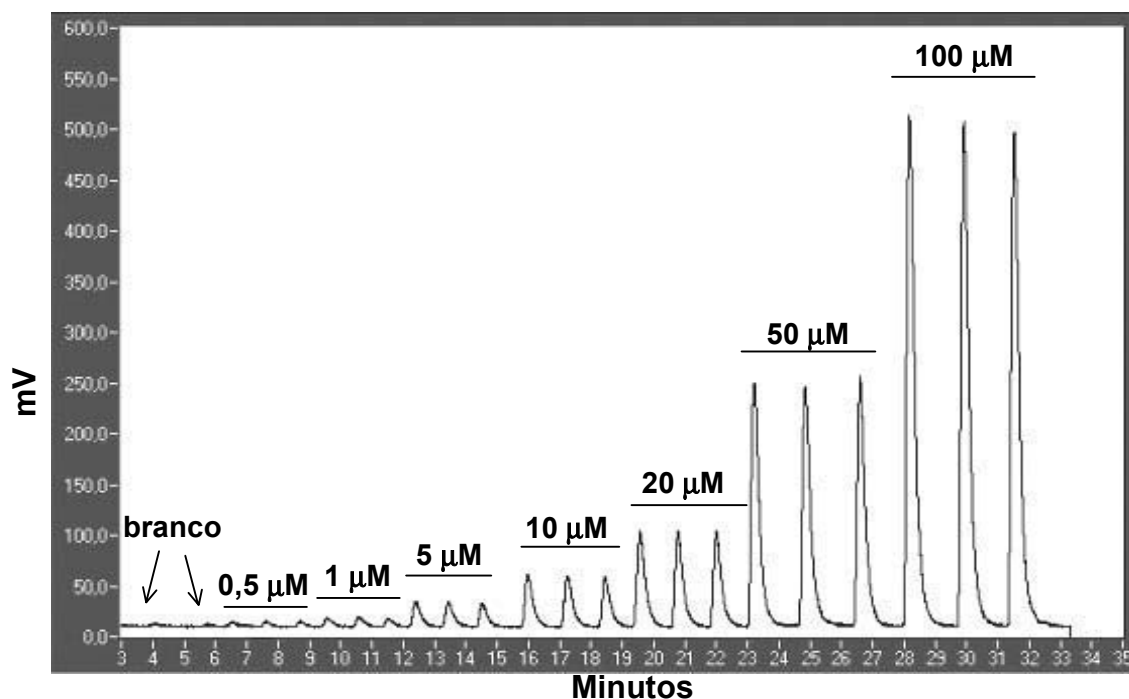


Figura 8 – Construção da curva de calibração: Picos detectados com o aparelho NOA-280 quando foram injetados 15 μL de branco (água miliQ) e soluções padrão, em triplicata, contendo 0,5; 1,0; 5; 10; 20; 50 e 100 μM de nitrato de sódio, visando estabelecer uma curva padrão para quantificação de produtos do NO em amostras de plasma.

Após injetar cada uma das soluções padrão, o software do aparelho NOA-280 traçou o perfil de cada pico referente a cada injeção. Delimitou-se cada pico e a área correspondente é calculada pelo software (Figura 8). Para a construção da curva padrão (Figura 9), obtivemos as seguintes médias de área, para cada concentração de nitrato de sódio injetada: 0,5 μM = 55,1; 1 μM = 122,1; 5 μM = 385,5; 10 μM = 936,8; 20 μM = 1684,4; 50 μM = 4410,5 e 100 μM = 9041,1.

Curva de Calibração

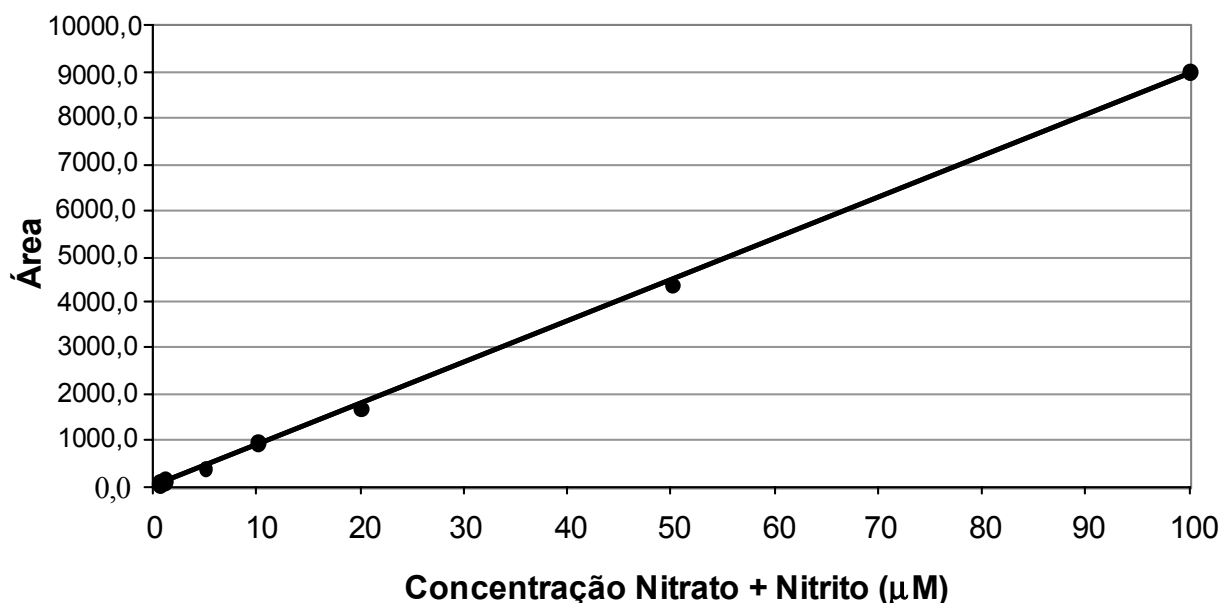


Figura 9 - Gráfico da Curva de Calibração de dosagem de nitratos, em amostras de plasma. Cada ponto refere-se a área média dos picos detectados com o aparelho NOA-280 de cada solução padrão injetada (15 µL), nas seguintes concentrações de nitrato de sódio: 0,5; 1,0; 5; 10; 20; 50 e 100 µM de nitrato de sódio. Sendo o $R^2 = 0,9996$ e a equação da reta $y = 90,172x - 25,952$ ($x = \text{área}$, $y = \text{concentração nitrato+nitrito}$).

6.6.3. QUANTIFICAÇÃO DE NITRATO (MARRONI et al. 2005; REITER et al. 2002; TANUS-SANTOS et al. 2002; TANUS-SANTOS et al. 2001).

As concentrações de nitratos e nitritos foram obtidas por dosagens, em duplicata, através do método da quimiluminescência, utilizando analisador de NO (Sievers Model 280 NO Analyzer - Boulder, CO, EUA). Onde os nitritos e nitratos (produtos da oxidação do NO), das amostras líquidas de plasma desproteinizado (15 µL), são reduzidos a NO (gás), e após reação com ozônio, numa câmara do analisador, produz moléculas de NO_2 que emitem luz quando em seu estado

excitado. O sinal luminoso é detectado pelo analisador, convertido em sinal elétrico, em seguida passado a analógico e registrado (mV).

Amostras de plasma desproteinizadas (15 µl) foram injetadas num frasco, aquecido a 90°C, contendo uma solução redutora (5 ml de solução de Vanádio (III), na concentração de 0,008 g/L em HCl 1N, e 100 mL de solução “antifoaming”) que converte os nitratos e nitritos em gás NO. O frasco é conectado a um fluxo contínuo do gás inerte (Nitrogênio) que passa através da solução, “carregando” consigo o NO liberado em direção ao analisador. Quantificando o NO liberado, que tem correspondência estequiométrica com a quantidade de nitritos e nitratos presentes na amostra.

6.7. DOSAGEM DE TRIGLICÉRIDES, COLESTEROL TOTAL

A quantificação de Triglicérides (TRIGLICÉRIDES LIQUIDFORM 2006) e Colesterol Total (COLESTEROL LIQUIDFORM 2006), para a investigação de hipertrigliceridemia e dislipidemias, respectivamente, foram utilizando kits fabricado pela LABTEST DIAGNÓSTICA S.A, seguindo-se as instruções contidas no manual deste. O princípio do método para quantificação de triglicerídeos é o Glicerol fosfato oxidase (TRIGLICÉRIDES LIQUIDFORM 2006) e o de dosagem de colesterol total é o colesterol oxidase - Reação de Trinder (COLESTEROL LIQUIDFORM 2006).

6.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS E ESTIMATIVA DA FREQUÊNCIA DE HAPLÓTIPOS

Os resultados foram representados na forma de Média ± Desvio Padrão. Dentre os indivíduos incluídos neste estudo, foram separados dois grupos, entre os quais foi comparada a distribuição dos genótipos, alelos e da estimativa da

freqüência de haplótipos. A comparação entre os genótipos quanto as concentrações plasmáticas de NOx foi analisada com uso da ANOVA ou teste t de student, sendo considerado estatisticamente diferente quando $p < 0,05$. O grupo L é composto pelos 30 voluntários com baixas concentrações plasmáticas de NOx e o grupo H pelos 30 voluntários com maiores concentrações de NOx. Esses grupos foram definidos com base em estudos anteriores, em que foi demonstrado que polimorfismos no gene da eNOS podem reduzir a expressão desta enzima ou produção de NO em aproximadamente 40 a 50% (MIYAMOTO et al. 2000; NAKAYAMA et al. 1999). Portanto, indivíduos com concentrações de NOx inferiores a aproximadamente 50% da media geral de concentração plasmática de NOx foram incluídos no grupo L. Os voluntários com concentrações de NOx superiores a 150% da média de NOx foram incluídos no grupo H. Para avaliar as diferenças quanto às freqüências genóticas e alélicas entre esses dois grupos foi utilizado o teste qui-quadrado. Foi avaliado se a distribuição dos genótipos em cada grupo obedecia ao equilíbrio de Hardy–Weinberg com uso do teste qui-quadrado.

O Programa “Estimating Haplotype (EH)” (<http://linkage.rockefeller.edu/ott/eh.htm>) foi utilizado para a estimativa da freqüência de haplótipos, resultante da combinação dos três polimorfismos (T⁻⁷⁸⁶C, Exon 7 e Intron 4), nos dois grupos estudados. Sendo que as diferenças entre esses foram avaliadas utilizando o teste qui-quadrado. Devido ao fato de serem comparadas as freqüências de oito diferentes haplótipos, entre os grupos L e H, utilizou-se o valor de P corrigido, onde só se considerou estatisticamente significativo quando $P < 0,0063$ ($=0,05/8$, devido as 8 comparações simultâneas). Nos demais casos foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

7. RESULTADOS

7.1. CARACTERÍSTICAS DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

Tabela 1 – Características demográficas dos participantes do estudo

	Total	Grupo L	Grupo H	P*
N	154	30	30	NS
Idade (anos)	31,3 ± 10,3	30,5 ± 8,4	34,1 ± 9,7	NS
IMC (kg/m ²)	25,7 ± 4,1	25,9 ± 4,9	26,8 ± 5,7	NS
PAS (mmHg)	123,6 ± 12,1	117,5 ± 10,4	132,3 ± 22,0	NS
PAD (mmHg)	72,3 ± 9,9	66,7 ± 14,2	76,7 ± 13,9	NS
FC (bpm)	66,1 ± 10,1	66,0 ± 15,4	68,3 ± 14,2	NS
Colesterol total (mg/dL)	172,0 ± 33,6	176,5 ± 34,2	177,5 ± 36,5	NS
Triglicérides (mg/dL)	112,8 ± 68,1	90,8 ± 53,4	101,7 ± 59,2	NS
NOx (μmol/L)	49,7 ± 19,9	24,2 ± 4,5	80,9 ± 8,9	<0.001

Valores representam a média ± Desvio padrão. Siglas: Grupo L = < NOx; Grupo H = > NOx; PAS = Pressão Arterial Sistólica; PAD = Pressão Arterial Diastólica; FC = Frequência Cardíaca; NOx = Nitrato/nitrito plasmático; NS = Não significativo estatisticamente. * Valores de P para comparação entre os grupos L e H.

A tabela 1 resume as características dos 154 voluntários que participaram deste estudo, e as características dos grupos L (Baixo NOx) e H (Alto NOx). Comparando os grupos, não encontramos diferenças quanto à idade, índice de massa corpóreo, pressão arterial sistólica e diastólica ou frequência cardíaca, exceto quanto às concentrações plasmáticas de NOx (Tabela 1, P<0,001).

7.2. GENOTIPAGEM PARA OS POLIMORFISMOS NO GENE DA ENOS

Para a genotipagem do polimorfismo T⁻⁷⁸⁶C na região promotora, obtemos um fragmento de 180 pares de base, referente à região promotora do gene da

eNOS, após a realização da PCR. Quando este sofre o processo de digestão pela enzima de restrição MspI, temos as seguintes possibilidades de fragmentos, conforme o genótipo do voluntário para o polimorfismo T-786C: Genótipo TT (variante “T” do polimorfismo T⁻⁷⁸⁶C) = 2 fragmentos, um de 140 e outro de 40 pb; Genótipo CC (variante “C” do polimorfismo T⁻⁷⁸⁶C) = 3 fragmentos, com 90, 50 e 40 pb (3 bandas no gel); Já no caso de se tratar do heterozigoto TC, obtemos 4 fragmentos (140, 90, 50 e 40 pb), já que cada alelo foi digerido de forma diferente, conforme descrito anteriormente (Figura 7 – T⁻⁷⁸⁶C).

No caso do polimorfismo Glu298Asp no exon 7 do gene da eNOS, após a reação de PCR, obtemos um fragmento de 258 pares de base. Quando este sofre o processo de digestão pela enzima de restrição BanII, temos os seguintes genótipos, conforme o tamanho e número de fragmentos: GluGlu = 2 fragmentos, um de 163 pb e 85 pb; AspAsp = 1 fragmento não digerido de 258 pb e o heterozigoto GluAsp = 3 fragmentos (258, 163 e 85 pb) (Figura 7 – Exon 7).

Já no caso do polimorfismo VNTR no Intron 4 do gene da eNOS, os genótipos são os seguintes, conforme o peso molecular dos fragmentos amplificados pela PCR: 4b/4b (*Wild-Type*, com 5 repetições de 27 pb) = 1 fragmento de 420 pb; 4a/4a (variante, com 4 repetições de 27 pb) = 1 fragmento com 393 pb; já para o heterozigoto 4a/4b temos 2 fragmentos, sendo um com 393 pb e outro com 420 pb (Figura 7 – Intron 4).

7.3. NITRATO PLASMÁTICO VERSUS CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS

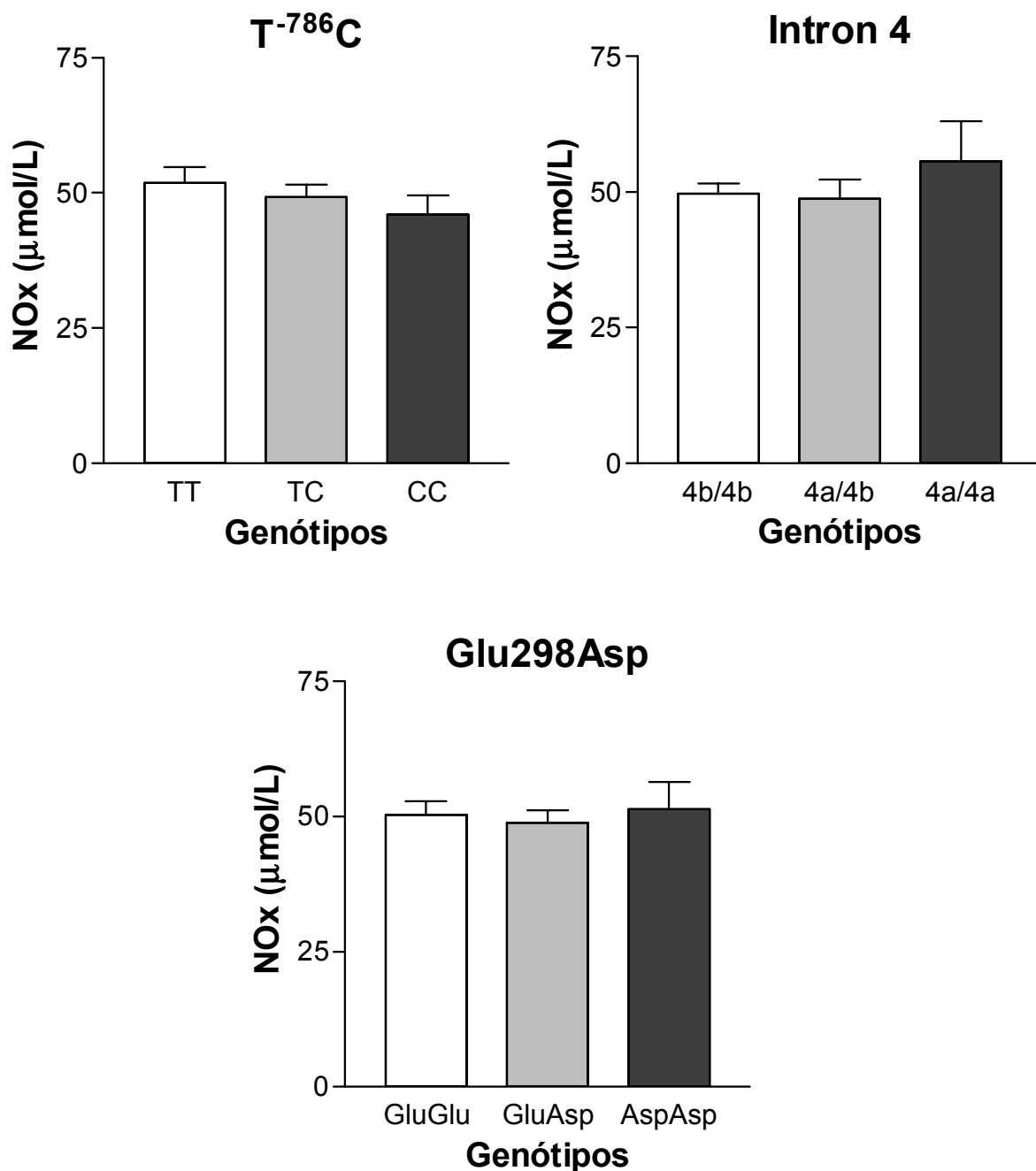


Gráfico 1 - Concentrações plasmáticas de nitrato/nitrito dos 154 voluntários sadios agrupados por polimorfismos e genótipos: A) T⁻⁷⁸⁶C: n=54, 78, e 22 para os genótipos “TT”, “TC”, e “CC” respectivamente; B) Intron 4: “4b/4b”=106, “4a/4b”=42 e “4a/4a”=6; e C) Glu298Asp: “GluGlu”=65, “GluAsp”=76 e “AspAsp”=13. As barras indicam a Média ± Erro padrão.

Tabela 2 - Frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos T⁻⁷⁸⁶C, Glu298Asp e Intron 4 do gene da eNOS, na população em estudo, comparando-se os grupos L e H

GENÓTIPOS		Total (n=154)	Grupo L (n=30)	Grupo H (n=30)	χ^2	P
T ⁻⁷⁸⁶ C	TT	0,351 (54)	0,367 (11)	0,400 (12)	0,5082	0,7756
	TC	0,506 (78)	0,500 (15)	0,500 (15)		
	CC	0,143 (22)	0,133 (4)	0,100 (3)		
Intron 4	4b, 4b	0,688 (106)	0,633 (19)	0,600 (18)	3,0730	0,2151
	4a, 4b	0,273 (42)	0,367 (11)	0,367 (11)		
	4a, 4a	0,039 (6)	0,000 (0)	0,033 (1)		
Glu298Asp	Glu, Glu	0,422 (65)	0,367 (11)	0,467 (14)	4,3650	0,1128
	Glu, Asp	0,494 (76)	0,600 (18)	0,467 (14)		
	Asp, Asp	0,084 (13)	0,033 (1)	0,067 (2)		
ALELOS		Total (n=154)	Grupo L (n=30)	Grupo H (n=30)	χ^2	P
T ⁻⁷⁸⁶ C	T	0,604 (186)	0,617 (37)	0,650 (39)	0,1942	0,6595
	C	0,396 (122)	0,383 (23)	0,350 (21)		
Intron 4	4b	0,825 (254)	0,817 (49)	0,783 (47)	0,5000	0,4795
	4a	0,175 (54)	0,183 (11)	0,217 (13)		
Glu298Asp	Glu	0,669 (206)	0,667 (40)	0,70 (42)	0,2086	0,6479
	Asp	0,331 (102)	0,333 (20)	0,300 (18)		

Obs.: A distribuição dos genótipos em cada grupo obedece ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (todos com P>0,05)

A distribuição da frequência dos genótipos dos três polimorfismos estudados não apresenta desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (todos com $P > 0,05$). Quanto às concentrações plasmáticas de NOx, não se encontrou diferença significativa entre os grupos L e H (Gráfico 1; todos com $P > 0,05$). Realizando a comparação agrupando os genótipos contendo os alelo mais raro de cada polimorfismo também não foi encontrada diferença significativa ($p > 0,05$; teste t de student). Assim como quanto às distribuições das frequências genotípicas e alélicas, onde também não foi encontrada diferença significativa entre os grupos em estudo (Tabela 2; todos com $P > 0,05$).

Tabela 3 - Estimativa da frequência de haplótipos na população estudada.

T ⁻⁷⁸⁶ C	HAPLÓTIPO		Grupo L	Grupo H	P
	Intron 4	Glu298Asp			
T	4b	Glu	0,35	0,46	0,1131
T	4b	Asp	0,19	0,12	0,1714
T	4a	Glu	0,04	0,05	0,7330
T	4a	Asp	0,03	0,02	0,6506
C	4b	Glu	0,16	0,04	0,0047 *
C	4b	Asp	0,11	0,16	0,3008
C	4a	Glu	0,11	0,15	0,4003
C	4a	Asp	0,00	0,00	-

* $P < 0,0063$ ($=0,05/8$ que permite oito comparações simultâneas) comparando grupos L e H; teste qui-quadrado.

Ao comparar seis dos sete haplótipos encontrados, não observamos diferenças entre os grupos L e H (Tabela 3; $P > 0,05$). Já o haplótipo incluindo os alelos “C”, “4b”, e “Glu” para os polimorfismos na região promotora, intron 4 e no exon 7, respectivamente, apresentou-se significativamente mais freqüente no grupo L (16%) do que no grupo H (4%), conforme se observa na tabela 3, onde temos o valor de $P=0,0047$.

DISCUSSÃO

8. DISCUSSÃO

Estudamos o NOx plasmático em um grupo relativamente homogêneo de voluntários saudáveis. Vale ressaltar que todos os indivíduos incluídos no presente estudo são homens, brancos, com idades entre 18 e 56 anos, não fumantes, que não apresentavam diagnóstico de doenças, e que não faziam uso de qualquer medicamento. Portanto, fatores como diferenças entre os gêneros, efeitos das variações decorrentes do ciclo menstrual, condições clínicas, uso de medicamentos e tabagismo (ELLIS et al. 1998) não interferiram em nossos achados. Este é um aspecto muito importante, já que tabagistas apresentam concentrações diminuídas de NOx plasmático (ELLIS et al. 1998) e homens apresentam o dobro das concentrações plasmáticas de NOx em comparação com mulheres (JILMA et al. 1996). Além disso, o NOx circulante aumenta com o desenvolvimento folicular na mulher adulta (ROSSELLI et al. 1995), devendo portanto ser considerados os prováveis efeitos do ciclo menstrual em estudos que incluem mulheres.

Diferentemente de estudos anteriores, o presente trabalho foi especificamente desenhado para o estudo de NOx como marcador da produção de NO. Apesar dos rigorosos critérios de inclusão utilizados, visando maximizar as chances de encontrar efeitos dos genótipos sobre o NOx circulante. Foram comparados indivíduos com diferentes genótipos para os três polimorfismos estudados, e também agrupados os que apresentavam os alelos mais raros para cada polimorfismo. Nós não observamos diferenças significativas no NOx plasmático. Estes achados confirmam resultados de estudos anteriores, onde os genótipos da eNOS não apresentaram efeito sobre o NOx plasmático

(JEEROOBURKHAN et al. 2001; KIMURA et al. 2003; MOON et al. 2002; NASREEN et al. 2002; YOON et al. 2000).

Sabe-se que a análise haplotípica parece ser uma ferramenta melhor para a identificação de genes candidatos que possam predispor a doenças cardiovasculares, visto que a análise combinada de marcadores genéticos em uma região de interesse (haplótipo) pode ser mais informativa do que o teste de efeitos destes marcadores (polimorfismos) isoladamente (CRAWFORD et al. 2005).

Nosso grupo tem avaliado a frequência desses três polimorfismos do gene da eNOS conjuntamente (haplótipo), em brancos e negros do Brasil e USA. Como resultado, temos que: o haplótipo mais comum, em ambos os grupos raciais é o que apresenta os alelos mais comuns (“T”, “4b” e “Glu”); em negros o segundo mais comum é o “T”, “4a” e “Glu”; e o segundo mais comum em brancos é o “C”, “4b” e “Asp”. Assim verificamos que a distribuição dos variantes do gene da eNOS apresenta diferenças marcantes entre os grupos raciais, aparentemente de forma independente da origem geográfica (MARRONI et al. 2005; TANUS-SANTOS et al. 2001).

Foi demonstrado que o haplótipo incluindo os alelos “C”, “4b”, e “Glu” para os polimorfismos na região promotora, no intron 4 e no exon 7, respectivamente, mostrou-se significativamente mais comum nos voluntários com baixas concentrações de NOx plasmático do que nos indivíduos com altas concentrações deste, sempre utilizando correção para múltiplas comparações. Curiosamente, este haplótipo específico inclui o variante menos comum (alelo “C”) somente para o polimorfismo na região promotora do gene da eNOS. Este resultado sugere que a ocorrência do alelo raro “C” na região promotora diminui a produção endógena de NO. Estes achados são apoiados por evidências experimentais que mostram que o

alelo “C” na região promotora do gene da eNOS reduz a transcrição do DNA em relação ao “T” (NAKAYAMA et al. 1999; WANG et al. 2002) e reduz a atividade da região promotora em aproximadamente 50% (MIYAMOTO et al. 2000; NAKAYAMA et al. 1999), devido a ação repressora da proteína de replicação A1 (RPA1) que se liga a esta região do gene da eNOS na presença do alelo “C” reduzindo a transcrição deste gene (MIYAMOTO et al. 2000).

De fato, em estudo anterior, nosso grupo não encontrou diferença no NOx plasmático em função dos genótipos, em voluntários sadios genotipados somente para o polimorfismo T⁻⁷⁸⁶C na região promotora do gene da eNOS (Nagasaki et al. 2005). Apesar da ausência de efeitos significativos do polimorfismo T⁻⁷⁸⁶C sobre o NOx plasmático, o presente estudo confirma a tendência à diminuição com o aumento do número de alelos “C”. Entretanto, quando somente o polimorfismo T⁻⁷⁸⁶C é levado em consideração, a presença de outros variantes genéticos pode limitar a capacidade detecção de efeitos significativos do polimorfismo na região promotora. Assim, esses achados demonstram haver uma contribuição de haplótipos da eNOS para as variações nas concentrações plasmáticas de NO.

Outros estudos de nosso laboratório demonstraram a maior sensibilidade da análise haplotípica, em relação à genotípica, ao avaliar os possíveis efeitos de variações genéticas no gene da eNOS. Por exemplo, Sandrim e colaboradores (2006) demonstraram que a hipertensão arterial não apresenta associação com os polimorfismos no gene da eNOS avaliados isoladamente. Entretanto, ao realizar a análise haplotípica, foram encontradas diferenças na frequência dos haplótipos do gene da eNOS em hipertensos (brancos e negros) em comparação com normotensos (brancos e negros). Ressaltamos também a existência de diferenças

inter-étnicas quanto à distribuição de frequência dos haplótipos da eNOS (MARRONI et al. 2005; SANDRIM et al. 2006; TANUS-SANTOS et al. 2001).

Algumas limitações do nosso estudo devem, primeiramente, ser levadas em consideração. O tamanho da nossa amostra, onde temos um número de voluntários relativamente baixo (N=154), pode limitar o poder do nosso estudo para a detecção de pequenos efeitos dos genótipos, individualmente. Sobre as concentrações circulantes de NOx. Assim como o fato de não ter sido avaliada a glicemia dos voluntários, já que esta pode ser um fator de variabilidade nas concentrações de NOx plasmático. Outra importante limitação do estudo, foi a inclusão apenas de homens brancos, o que impossibilita verificar o efeito de diferenças inter-étnicas quanto à distribuição da frequência de genótipos e haplótipos (TANUS-SANTOS et al. 2002; TANUS-SANTOS et al. 2001). Já que tem sido descrito que o alelo "4a", do polimorfismo no intron 4, apresenta uma frequência muito baixa em indivíduos brancos (TANUS-SANTOS et al. 2002; TANUS-SANTOS et al. 2001), o que levaria a uma diminuição do poder do nosso estudo em detectar possíveis efeitos do polimorfismo no intron 4 sobre as concentrações plasmáticas de NOx.

Vale ressaltar que ainda são necessários estudos com outros grupos étnicos e com mulheres, assim possibilitando a identificação de haplótipos específicos da eNOS que possam afetar as concentrações de NOx plasmático nesses grupos. Devido ao estreito intervalo de confiança de idade dos voluntários (de 25 a 35 anos), não foi possível avaliar de forma representativa a interação entre idade e NOx plasmático. Finalmente, alguns dos voluntários incluídos no presente estudo apresentam o índice de massa corpóreo acima de 25. Assim como as dosagens de colesterol total e triglicérides elevados e PAS aumentada, podendo ser estas características serem consideradas como interferentes na quantificação de NOx.

Tem sido demonstrado que há diminuição na expressão da eNOS em presenças de altos níveis de LDL e LDL oxidado (LIÃO *et al.* 1999; Vidal *et al.* 1998). Devido a estas características estarem restritas a apenas poucos voluntários, não foi possível avaliar a interação entre os fatores obesidade, hipertensão com as concentrações plasmáticas de NOx. Portanto, devemos ter cautela ao considerar estes indivíduos como saudáveis.

CONCLUSÃO

9. CONCLUSÃO

Em nosso estudo, os genótipos da eNOS parecem não afetar, significativamente, as concentrações plasmáticas de NOx em homens saudáveis.

O haplótipo da eNOS incluindo os alelos “C”, “4b” e “Glu” para os polimorfismos na região promotora, no intron 4 e exon 7, respectivamente, parece estar associado a baixas concentrações circulantes de NOx.

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO DO VOLUNTÁRIO

ANEXO B

**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HCRP
E DA FMRP/USP**

ANEXO C

ARTIGO (PHARMACOGENETICS AND GENOMICS 2005, 15:565-570)

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABU-SOUD HM, STUEHR DJ. Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90 (22):10769-72.
- ADACHI T, WANG XL. Association of extracellular-superoxide dismutase phenotype with the endothelial constitutive nitric oxide synthase polymorphism. *FEBS Lett* 1998; 433 (1-2):166-8.
- ALTSHULER D, BROOKS LD, Chakravarti A et al. A haplotype map of the human genome. *Nature*. 2005; 437 (7063):1299-320.
- ANDREOPOULOS S, PAPAPETROPOULOS A. Molecular aspects of soluble guanylyl cyclase regulation. *Gen Pharmacol* 2000; 34 (3):147-57.
- BARRETO RL, CORREIA CRD, MUSCARA MN. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. *Quim. Nova* 2005; 28:1046-54.
- BAYLIS C, VALLANCE P. Measurement of nitrite and nitrate levels in plasma and urine--what does this measure tell us about the activity of the endogenous nitric oxide system? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998; 7 (1):59-62.
- BECKMAN JS, KOPPENOL WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271 (5 Pt 1):C1424-37.
- CAI H, WILCKEN DE, WANG XL. The Glu-298--Asp (894G--T) mutation at exon 7 of the endothelial nitric oxide synthase gene and coronary artery disease. *J Mol Med* 1999; 77 (6):511-4.
- CARDON LR, BELL JI. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2001; 2 (2):91-9.

- CASTILLO L, BEAUMIER L, AJAMI AM et al. Whole body nitric oxide synthesis in healthy men determined from [15N] arginine-to-[15N]citrulline labeling. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93 (21):11460-5.
- CHRISTOPHERSON KS, BREDT DS. Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. J Clin Invest 1997; 100 (10):2424-9.
- COOKE JP, DZAU VJ. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. Annu Rev Med 1997; 48:489-509.
- COSBY K, PARTOVI KS, CRAWFORD JH et al. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. Nat Med 2003; 9 (12):1498-505.
- CRAWFORD DC, NICKERSON DA. Definition and clinical importance of haplotypes. Annu Rev Med 2005; 56:303-20
- DALY MJ, RIOUX JD, SCHAFFNER SF et al. High-resolution haplotype structure in the human genome. Nat Genet. 2001; 29 (2):229-32.
- DAVIS KL, MARTIN E, TURKO IV et al. Novel effects of nitric oxide. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2001; 41:203-36.
- DAWSON E, ABECASIS GR, Bumpstead S et al. A first-generation linkage disequilibrium map of human chromosome 22. Nature. 2002; 418 (6897):544-8. Epub 2002 Jul 10.
- de SYLLOS RW, SANDRIM VC, LISBOA HR et al. Endothelial nitric oxide synthase genotype and haplotype are not associated with diabetic retinopathy in diabetes type 2 patients. Nitric Oxide 2006; 30:30
- ELLIS G, ADATIA I, YAZDANPANA M et al. Nitrite and nitrate analyses: a clinical biochemistry perspective. Clin Biochem 1998; 31 (4):195-220.

- EVANS WE, RELLING MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 1999; 286 (5439):487-91.
- FAIRCHILD TA, FULTON D, FONTANA JT et al. Acidic hydrolysis as a mechanism for the cleavage of the Glu298Asp-variant of human endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 2001; 30:30.
- FORSTERMANN U, MUNZEL T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 2006; 113 (13):1708-14.
- GOLDSTEIN DB, AHMADI KR, WEALE ME et al. Genome scans and candidate gene approaches in the study of common diseases and variable drug responses. *Trends Genet.* 2003; 19 (11):615-22.
- GOLSER R, GORREN AC, MAYER B et al. Functional characterization of Glu298Asp mutant human endothelial nitric oxide synthase purified from a yeast expression system. *Nitric Oxide* 2003; 8 (1):7-14.
- GRIFFITHS AJF, MILLER JH, SUZUKI DT et al. *Introdução à Genética*. 7º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
- HASSAN A, GORMLEY K, O'SULLIVAN M et al. Endothelial nitric oxide gene haplotypes and risk of cerebral small-vessel disease. *Stroke* 2004; 35 (3):654-9. Epub 2004 Feb 12.
- HIBBS JB, JR., WESTENFELDER C, TAINTOR R et al. Evidence for cytokine-inducible nitric oxide synthesis from L-arginine in patients receiving interleukin-2 therapy. *J Clin Invest* 1992; 89 (3):867-77.
- HINGORANI AD. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis: John French Lecture 2000. *Atherosclerosis* 2001; 154 (3):521-7.
- HOOPER WC, LALLY C, AUSTIN H et al. The relationship between polymorphisms in the endothelial cell nitric oxide synthase gene and the platelet GPIIIa gene

- with myocardial infarction and venous thromboembolism in African Americans. *Chest* 1999; 116 (4):880-6.
- ICHIHARA S, YAMADA Y, FUJIMURA T et al. Association of a polymorphism of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with myocardial infarction in the Japanese population. *Am J Cardiol* 1998; 81 (1):83-6.
- IGNARRO LJ, BUGA GM, WOOD KS et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84 (24):9265-9.
- IGNARRO LJ, NAPOLI C. Novel features of nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase, and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2004; 6 (4):281-7
- INGELMAN-SUNDBERG M. Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy. *J Intern Med.* 2001; 250 (3):186-200.
- JEEROOBURKHAN N, JONES LC, BUJAC S et al. Genetic and environmental determinants of plasma nitrogen oxides and risk of ischemic heart disease. *Hypertension* 2001; 38 (5):1054-61.
- JILMA B, KASTNER J, MENSİK C et al. Sex differences in concentrations of exhaled nitric oxide and plasma nitrate. *Life Sci* 1996; 58 (6):469-76.
- JOHNSON GC, ESPOSITO L, BARRATT BJ et al. Haplotype tagging for the identification of common disease genes. *Nat Genet* 2001; 29 (2):233-7.
- KIMURA T, YOKOYAMA T, MATSUMURA Y et al. NOS3 genotype-dependent correlation between blood pressure and physical activity. *Hypertension* 2003; 41 (2):355-60.
- LANCASTER JR, JR. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide* 1997; 1 (1):18-30.

- LAUER T, KLEINBONGARD P, KELM M. Indexes of NO bioavailability in human blood. *News Physiol Sci* 2002; 17:251-5.
- LI R, LYN D, LAPU-BULA R et al. Relation of endothelial nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide level, endothelial function, and blood pressure in African Americans. *Am J Hypertens* 2004; 17 (7):560-7.
- LIAO, JK, SHINW, S, LEE, WY, CLARK, SL. Oxidized low density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 1999; 270:319-324.
- LIN M, AQUILANTE C, JOHNSON JA et al. Sequencing drug response with HapMap. *Pharmacogenomics J.* 2005; 5 (3):149-56.
- MALHOTRA S, POOLE J, DAVIS H et al. Effects of NOS3 Glu298Asp polymorphism on hemodynamic reactivity to stress: influences of ethnicity and obesity. *Hypertension* 2004; 44 (6):866-71. Epub 2004 Oct 25.
- MARRONI AS, METZGER IF, SOUZA-COSTA DC et al. Consistent interethnic differences in the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide synthase genetic polymorphisms. *Nitric Oxide.* 2005; 12 (3):177-82.
- MIYAMOTO Y, SAITO Y, NAKAYAMA 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):2629-37.
- MONCADA S, HIGGS A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329 (27):2002-12.
- MONCADA S, HIGGS EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 1991; 21 (4):361-74

- MOON J, YOON S, KIM E et al. Lack of evidence for contribution of Glu298Asp (G894T) polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. *Thromb Res* 2002; 107 (3-4):129-34.
- MORO MA, RUSSEL RJ, CELLEK S et al. cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93 (4):1480-5.
- NAGASSAKI S, METZGER IF, SOUZA-COSTA DC et al. eNOS genotype is without effect on circulating nitrite/nitrate level in healthy male population. *Thromb Res* 2005; 115(5):375-9.
- NAKAYAMA M, YASUE H, YOSHIMURA 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):2864-70.
- NASREEN S, NABIKA T, SHIBATA H et al. T-786C polymorphism in endothelial NO synthase gene affects cerebral circulation in smokers: possible gene-environmental interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22 (4):605-10.
- NATHAN C, XIE QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994; 78 (6):915-8.
- PALMER RM, FERRIGE AG, MONCADA S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327 (6122):524-6.
- PARK JH, KIM JH, KIM WH et al. Association of the endothelial nitric oxide synthase (ecNOS) gene polymorphism with carotid atherosclerosis in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2006; 72 (3):322-7.
- PARRA FC, AMADO RC, LAMBERTUCCI JR et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100 (1):177-82.

- PHILIP I, PLANTEFEVE G, VUILLAUMIER-BARROT S et al. G894T polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with an enhanced vascular responsiveness to phenylephrine. *Circulation* 1999; 99 (24):3096-8.
- POIRIER O, MAO C, MALLET C et al. Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene - no consistent association with myocardial infarction in the ECTIM study. *Eur J Clin Invest* 1999; 29 (4):284-90.
- PULKKINEN A, VIITANEN L, KAREINEN A et al. Intron 4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with elevated blood pressure in type 2 diabetic patients with coronary heart disease [In Process Citation]. *J Mol Med* 2000; 78 (7):372-9.
- RASSAF T, FEELISCH M, KELM M. Circulating NO pool: assessment of nitrite and nitroso species in blood and tissues. *Free Radic Biol Med* 2004; 36 (4):413-22.
- REITER CD, WANG X, TANUS-SANTOS JE et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med* 2002; 8 (12):1383-9.
- RHODES P, LEONE AM, FRANCIS PL et al. The L-arginine:nitric oxide pathway is the major source of plasma nitrite in fasted humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 209 (2):590-6.
- RIOUX JD, DALY MJ, SILVERBERG MS et al. Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. *Nat Genet* 2001; 29 (2):223-8.
- ROSSELLI M, IMTHURN B, KELLER PJ et al. Circulating nitric oxide (nitrite/nitrate) levels in postmenopausal women substituted with 17 beta-estradiol and norethisterone acetate. A two-year follow-up study. *Hypertension* 1995; 25 (4 Pt 2):848-53.

- SAMBROOK, J. e RUSSELL, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, Cold Spring Harbor, New York.
- SANDRIM VC, COELHO EB, NOBRE F et al. Susceptible and protective eNOS haplotypes in hypertensive black and white subjects. *Atherosclerosis* 2006; 186 (2):428-32
- SASE K, MICHEL T. Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets. *Life Sci* 1995; 57 (22):2049-55.
- SHIMASAKI Y, YASUE H, YOSHIMURA M et al. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31 (7):1506-10.
- SHOJI M, TSUTAYA S, SAITO R et al. Positive association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with hypertension in northern Japan. *Life Sci* 2000; 66 (26):2557-62.
- SIGUSCH HH, SURBER R, LEHMANN MH et al. Lack of association between 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of the endothelial nitric oxide synthase gene and the risk of coronary artery disease. *Scand J Clin Lab Invest* 2000; 60 (3):229-35.
- STUEHR DJ, GRIFFITH OW. Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1992; 65:287-346.
- TANUS-SANTOS JE, DESAI M, DEAK LR 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.
- TANUS-SANTOS JE, DESAI M, FLOCKHART DA. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. *Pharmacogenetics* 2001; 11 (8):719-25.

- THORISSON GA, STEIN LD. The SNP Consortium website: past, present and future. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31 (1):124-7.
- TSUKADA T, YOKOYAMA K, ARAI T 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.
- UWABO J, SOMA M, NAKAYAMA T et al. Association of a variable number of tandem repeats in the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with essential hypertension in Japanese. *Am J Hypertens* 1998; 11 (1 Pt 1):125-8.
- VENTER JC, ADAMS MD, MYERS EW et al. The sequence of the human genome. *Science.* 2001; 291 (5507):1304-51.
- VIDAI, F, COLONE, C, MARTINEZ-GONZALES, J, BADIMON, L. Atherogenic concentrations of native low-density lipoprotein levels in endothelial cells. *Eur. J. Biochem.* 1998; (252):378-384.
- WANG J, DUDLEY D, WANG XL. Haplotype-specific effects on endothelial NO synthase promoter efficiency: modifiable by cigarette smoking. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22 (5):e1-4.
- WANG X, TANUS-SANTOS JE, REITER CD et al. Biological activity of nitric oxide in the plasmatic compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101 (31):11477-82. Epub 2004 Jul 16.
- WANG XL, MAHANEY MC, SIM AS 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.
- WANG XL, SIM AS, BADENHOP RF et al. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med* 1996; 2 (1):41-5.

- WANG XL, SIM AS, WANG MX et al. Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *FEBS Lett* 2000a; 471 (1):45-50.
- WANG XL, WANG J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Mol Genet Metab* 2000b; 70 (4):241-51.
- YANAMANDRA K, BOGGS PB, THURMON TF et al. Novel allele of the endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in Caucasian asthmatics. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335 (2):545-9.
- YOON Y, SONG J, HONG SH et al. Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease. *Clin Chem* 2000; 46 (10):1626-30.
- YOSHIMURA M, YASUE H, NAKAYAMA M et al. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet* 1998; 103 (1):65-9.
- ZHAO H, PFEIFFER R, GAIL MH. Haplotype analysis in population genetics and association studies. *Pharmacogenomics* 2003; 4 (2):171-8.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)