

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

LUIZA LIMA DE OLIVEIRA

LEVANTAMENTOS SOBRE SNVs NOS GENES *ARG1*, *ARG2* E
NOS3 E SEUS DESDOBRAMENTOS NA PRÉ-ECLAMPSIA

LUIZA LIMA DE OLIVEIRA

LEVANTAMENTOS SOBRE SNVs NOS GENES *ARG1*, *ARG2* E *NOS3* E SEUS DESDOBRAMENTOS NA PRÉ-ECLAMPSIA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu,
UNESP, para obtenção de Bacharel em Ciências
Biomédicas.

Orientadora: Prof^a Dra^a Valéria Cristina Sandrim

BOTUCATU/SP
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Oliveira, Luiza Lima de.

Levantamentos sobre SNPs nos genes *ARG1*, *ARG2* e nos *NOS3*
e seus desdobramentos na pré-eclâmpsia / Luiza Lima de
Oliveira. - Botucatu, 2023

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Instituto de Biotecnologia de Botucatu
Orientador: Valéria Cristina Sandrim
Capes: 40103005

1. Óxido nítrico sintase. 2. Arginase. 3. Óxido nítrico.
4. Polimorfismo de nucleotídeo único. 5. Pré-eclâmpsia.

Palavras-chave: Óxido nítrico sintase; Arginase; Óxido
nítrico; Polimorfismo de nucleotídeo único; pré-eclâmpsia.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a meu pai Oxóssi, orixá da caça e da sabedoria, que nunca me deixou faltar o Axé da sabedoria, essencial na jornada pelo conhecimento, e fundamental para a conclusão da minha graduação e desta etapa na minha formação para além da academia. Aos meus guias, agradeço a blindagem, essencial para que eu caminhe e me arrisque mesmo em caminhos tão hostis.

Agradeço ao apoio fundamental dos meus amigos que moram comigo na República Palacete Assobradado, a nossa rede de apoio é o que nos mantém firmes e estudiosos apesar das adversidades. Viver esse momento não seria possível sem o acolhimento e carinho tão necessários no dia a dia.

Sou imensamente grata pela minha amiga Geovanna Amaro, uma parceria muito além do estágio e da graduação. Seu apoio foi o que me fez chegar longe sem sentir tão fortemente as pedras do caminho. A gente se fortalece no caminhar.

Agradeço ao Sandrim's Lab onde pude desenvolver minhas habilidades profissionais e crescer como biomédica, um canal importante nessa fase da minha formação.

Sou infinitamente grata a minha mãe e aos meus irmãos, que nem por um segundo duvidaram da minha capacidade e me deram todo suporte que puderam. Por fim, agradeço a mim por honrar meu passado, viver meu presente e acreditar no meu futuro.

RESUMO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome gestacional específica da gestação humana, sendo a principal causa de morte materna e perinatal no Brasil e no mundo, com uma fisiopatologia ainda não completamente esclarecida. O quadro sintomático característico é composto pelo aumento da pressão arterial $>140/90\text{mmHg}$ a partir da 20ª semana de gestação e lesão de órgãos alvo como fígado, rins e sistema nervoso central. O microambiente bioquímico da PE é caracterizado pela presença de eROS (espécies reativas de oxigênio), fatores pró-inflamatórios e pró-hipertensivos na circulação materna, fatores esses resultantes da disfunção endotelial promovida pelo estresse oxidativo característico desta enfermidade.

Sabe-se que um regulador endógeno da pressão arterial de extrema relevância é o óxido nítrico (NO), encontrado em baixa biodisponibilidade em gestantes com PE. O NO é produzido no endotélio vascular pela enzima eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) a partir do substrato L-arginina, porém, esse substrato também é utilizado pelas arginases 1 e 2 (ARG1 e ARG2), e há portanto a possibilidade de que a competição da eNOS com a ARG1 e ARG2 pelo substrato levar a uma diminuição da biodisponibilidade de NO.

Tanto a eNOS (óxido nítrico sintase), a qual é codificada pelo gene *NOS3*, quanto as arginases 1 e 2, codificadas pelos genes *ARG1* e *ARG2*, respectivamente, possuem variações de único nucleotídeo, ou seja, variações alélicas do tipo SNV (ou comumente chamadas SNPs). Nesse sentido, o presente trabalho realizou uma revisão da literatura com o objetivo de entender uma possível relação das variações do tipo SNV nos genes *ARG1*, *ARG2* e *NOS3* com a PE.

No gene *NOS3*, dois principais polimorfismos parecem ser fatores de risco para a PE ao favorecerem a diminuição da formação de NO: o rs1799983, que é uma variante missense também conhecida como Glu298Asp, cujo impacto parece ser no acoplamento na *NOS3* ao caveolo membranar, diminuindo a efetividade de ativação da enzima; além de rs2070744, que é um SNP na região promotora do gene *NOS3* (-786 T/C) apontado como capaz de diminuir a expressão da enzima em comparação com o alelo normal. As demais variantes ou outros tipos de impacto na doença (como fatores protetores, impactos na resposta farmacológica, marcadores prognósticos e outros marcadores etc.) necessitam mais estudos.

Em relação as arginases, estas não aparentam possuir uma relação estreita com a fisiopatologia da PE, porém o polimorfismo rs3742879 de *ARG2* foi apontado como fator na responsividade ao tratamento anti-hipertensivo na PE e maiores níveis de nitrito circulantes.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
1.1 O óxido nítrico	7
1.2 Síntese do óxido nítrico e NOS3	9
1.3 As arginases	11
2 METODOLOGIA	12
3 RESULTADOS	12
4 DISCUSSÃO	14
4.1 NOS3	14
4.1.1 rs1799983	14
4.1.2 rs2070744	16
4.1.3 rs3918227	17
4.1.4 rs743506 e rs7830	18
4.2 ARG1	19
4.3 ARG2	20
4.4 CONSIDERAÇÕES	20
5 CONCLUSÃO	21
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

1 INTRODUÇÃO

Dentre uma das síndromes hipertensivas gestacionais que mais causam mortalidade materna perinatal no Brasil e no mundo, a pré-eclâmpsia (PE) se destaca, juntamente com outras síndromes hipertensivas gestacionais, como uma das doenças responsáveis pelas mortes obstétricas diretas no nosso país [1, 2, 4], e mais de 50 mil mortes anuais ao redor do mundo [2]. Os aspectos clínicos dessa síndrome incluem, a partir da 20ª semana de gestação, a hipertensão arterial ($>140/90$ mmHg), insuficiência renal, proteinúria e disfunção hepática [2], além de comprometerem o crescimento intrauterino do feto, podendo causar parto prematuro e morte perinatal.

Conhecida como uma síndrome específica da gestação humana, a PE apresenta uma fisiopatologia não totalmente esclarecida e complexa, que envolve disfunção endotelial sistêmica decorrente de produtos da má perfusão placentária na circulação materna [2,3,5]. Pode-se dividir a instalação desse quadro hipertensivo, portanto, em dois estágios: num primeiro momento há falha na remodelação das artérias espiraladas maternas na placentação resultando em má perfusão placentária, e conseguinte há a presença de diversos fatores placentários na circulação materna que culminam, dentre outros aspectos, numa disfunção vascular sistêmica na gestante [2]. Tal teoria da PE instalada em dois estágios é sustentada por estudos a respeito das disfunções de células endoteliais maternas em modelo *in vitro* incubadas em plasma de mulheres pré-eclâmpicas [6,7].

O endotélio vascular desempenha diversas funções homeostáticas no tecido vascular, boa parte mediada pelo óxido nítrico (NO) endógeno, que funciona de maneira geral como relaxante do músculo liso vascular endógeno [3,5]. Na PE há forte evidência da disfunção endotelial associada com uma baixa biodisponibilidade de NO, além da presença de espécies reativas de oxigênio (eROS) decorrentes da placenta isquêmica [3,6]. A presença de eROS na circulação materna é o que induz a resposta inflamatória excessiva característica da doença, havendo um desbalanço entre as defesas antioxidantes enzimáticas e a produção de citocinas pró-inflamatórias, o que favorece a manutenção e progressão da doença.

1.1 O óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um vasodilatador essencial e de função bem estabelecida na homeostase cardiovascular, cuja produção endógena no sistema vascular provém majoritariamente da enzima NOS3 endotelial, também conhecida como eNOS – óxido nítrico sintase endotelial. [8] A sua produção depende do endotélio vascular íntegro e funcional, sendo esta estrutura responsável por diversas funções como a regulação do tônus vascular e a liberação de

substâncias vasoativas, dentre elas o NO, uma substância gasosa e lipofílica que age como mediadora de diversos processos biológicos [8][9][12]. Destes processos, vale destacar a homeostase vascular [9], tônus vascular, proliferação celular, além da agregação de plaquetas e leucócitos [9].

A proliferação de células musculares lisas vasculares ocorre sob estímulo do influxo de cálcio, tendo o NO um efeito antiproliferativo [8][9][10]. O NO endógeno é importante também na regulação da adesão de leucócitos ao endotélio vascular ao inibir fatores nucleares necessários para expressão de citocinas [9][10][11]. Além disso, o NO é capaz de regular o microambiente redox das células vasculares [8][9][12], tendo efeito antioxidante por reagir com superóxidos e por aumentar a expressão da superóxido dismutase, agindo também na up-regulation da heme-oxigenase-1 e da ferritina, que diminuem a concentração de superóxidos.

O NO de origem endotelial é capaz de se difundir entre membranas uma vez que é lipofílico, atuando nas plaquetas e nas células musculares lisas dos vasos ao se ligar à porção heme de uma guanilato ciclase solúvel (sGC)[8][9][11]. Assim, o relaxamento do músculo liso se seguirá uma vez que este complexo metal-nitrosil na guanilato ciclase é capaz de catalisar a conversão de GTP (guanosina trifosfato) em cGMP (guanosina monofosfato cíclica), responsável por ativar uma proteína kinase G-1 (PKG-1), sendo esta responsável pela fosforilação de diversas proteínas que regularão a concentração de cálcio intracelular [9]. Em detalhes, o que ocorre é que a PKG-1 fosforila canais de potássio de alta condutância ativados por cálcio – ou BK Ca Activated K⁺ Channels – o que causa abertura do canal, saída de potássio da célula e consequente hiperpolarização da membrana plasmática, reduzindo o influxo de cálcio pelos canais de cálcio do tipo L. A PKG-1 ainda fosforila estes canais de cálcio tipo L inibindo sua função, além de inibir o receptor de IP3 (1,4,5 inositoltrifosfato) e o fosfolambano no retículo sarcoplasmático [8][10]. A inibição do receptor de IP3 e do fosfolambano suprime a liberação de cálcio das reservas intracelulares além de promover o sequestro de Ca²⁺ pelo retículo sarcoplasmático, respectivamente. Em suma, essa queda do fluxo de cálcio intracelular diminui a formação do complexo cálcio-calmodulina quinase da cadeia leve de miosina promovendo o relaxamento da célula muscular e, portanto, a vasodilatação[8,9]. Tal cadeia de eventos está esquematizada na figura 1.

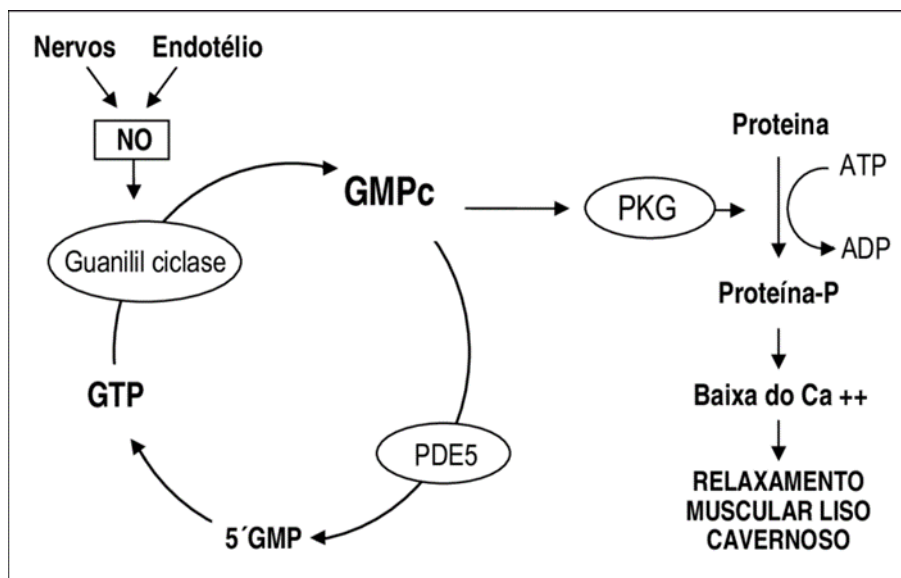


Figura 1. Esquema do relaxamento muscular a partir do óxido nítrico. As proteínas fosforiladas que levam a baixa de Ca^{2+} de maneira direta ou indireta são o receptor de IP₃ e o fosfolambano. Fonte: Pereira, N M [72].

A interação do NO com superóxidos resulta em peroxinitrito [9][10], um composto altamente reativo com o DNA, proteínas ou ainda lipídeos, conhecido por contribuir com o estresse oxidativo. A formação deste composto é limitada por altas concentrações de superóxido dismutase, que o converte em peróxido de hidrogênio. Entretanto, quando há altos níveis de NO, como resultado da upregulation da expressão e da atividade de NOS2 (iNOS ou indutível Nitric oxide synthase), a formação de peroxinitrito pode prevalecer e comprometer a homeostase vascular, resultando na disfunção endotelial.

1.2 Síntese do óxido nítrico e NOS3

A produção do NO ocorre a partir do substrato L-arginina por meio das enzimas óxido nítrico sintases: NOS1 (ou nNOS), NOS2 (ou iNOS) e NOS3 (ou eNOS). A NOS2, conhecida como NOS "induzível" está relacionada com a resposta inflamatória e produz altas quantidades de NO, enquanto a NOS1 e NOS3 são constitutivamente expressas, majoritariamente no tecido nervoso e no endotélio vascular respectivamente [9][67]. Como já citado, a NOS3 e sua produção de NO no endotélio vascular tem papel fundamental na homeostase cardiovascular, e será um dos focos deste trabalho.

A NOS3 é um monômero de 134kD [8], porém atua quando está dimerizada, possuindo um domínio C-terminal, de atuação redutase e onde se liga, dentre outros, o cofator NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), um domínio intermediário de função oxigenase e onde há a sequência de ligação com a calmodulina e do co-fator BH4 (tetrahydrobiopterina –

que estabiliza o dímero [8]), além da porção N-terminal, onde há os sítios de ligação do grupamento heme e zinco.

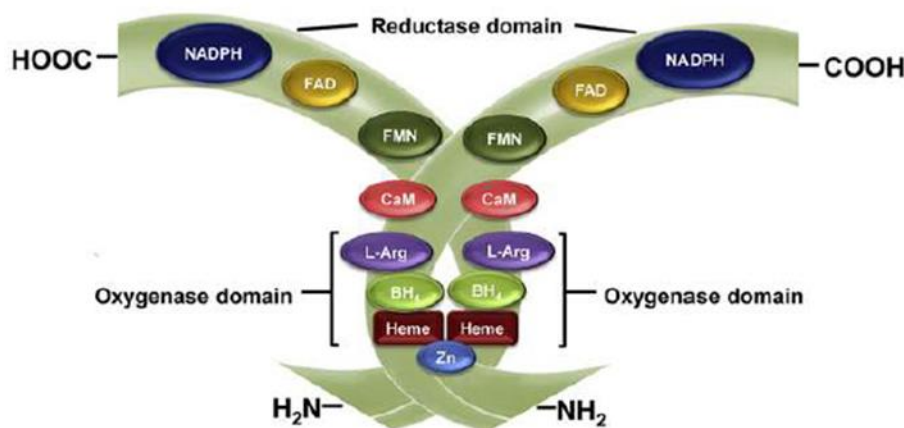


Fig 2. Esquema da NOS3 na conformação dimérica e elucidando os sítios de seus ligantes. Fonte: Oliveira-Paula, G H [8];

A ligação com os cofatores é essencial para a produção efetiva do NO [9][12], já que se observa que quando seus ligantes e cofatores são oxidados, por exemplo, por EROS, a enzima se desacopla e volta a conformação monomérica, passando a sintetizar superóxido ao invés de óxido nítrico [71]. A NOS3 dimérica e acoplada transfere um elétron da porção redutase para o domínio oxygenase, onde está ligado um oxigênio reduzido ao grupamento heme, oxigênio esse que é incorporado à L-arginina para formar NO e L-citrulina.

Dentro da célula endotelial em repouso, a NOS3 se localiza em invaginações de membrana conhecida como caveolas, formadas por caveolina-1 ancoradas à membrana, além de colesterol e esfingolipídeos [8][9][71]. Nesta conformação a enzima está inativa, a transferência de elétron está inibida, sendo liberada somente quando a calmodulina ativada (com Ca^{2+}) desloca a caveolina e se liga à NOS3, permitindo novamente a transferência de elétrons ao longo do dímero e consequentemente a formação do NO [8].

Porém, a atividade da enzima depende, da disponibilidade dos co-fatores mas também do substrato L-arginina, e alguns estudos demonstraram que baixas concentrações de L-arginina ou de BH_4 promovem o desacoplamento da NOS3 e baixa produção de NO vascular [67][8]. O desacoplamento da enzima e a consequente produção de superóxidos é um evento que leva a disfunção endotelial e pode, portanto, ter influência nas doenças multifatoriais cardiovasculares [71] como a PE.

É possível que a regulação de NOS3, a nível transcricional, pós-transcricional ou ainda pós tradução seja influenciada por polimorfismos genéticos, e muitos sítios polimórficos já

foram descritos [8]. Mais de 11500 variações estão relatadas no dbSNP, sendo que algumas estão sendo relatadas como funcionais, como o SNP (polimorfismo de nucleotídeo único) rs 2070744 ou o rs1799983 [8][48][12].

1.3 As arginases e sua relação com o NO

A arginase é uma enzima que existe em duas isoformas: ARG1, que é expressa constitutivamente no fígado, nas células endoteliais e nas células da musculatura lisa de vasos, sendo uma enzima citosólica [70]; e ARG2, que pode ser encontrada em muitos tecidos, especialmente nas mitocôndrias [70]. Ambas participam do ciclo da ureia e catalisam a mesma reação, que é a transformação do substrato o qual competem com a NOS3, a L-arginina, em L-ornitina e ureia [69], sendo apontadas na literatura como contribuintes para a disfunção endotelial e patologias do sistema cardiovascular [67][69].

As arginase parecem contribuir para a baixa biodisponibilidade de NO, especialmente na aterosclerose [67], mas também parece se relacionar com a fisiopatologia da disfunção erétil [47], além de serem relacionadas com o estresse oxidativo [67]. A respeito da expressão da NOS3, o aumento na expressão das arginases pode ter relação moduladora [46], e em modelo animal há evidências da relação da maior expressão de ARG1 com a pressão sanguínea [68].

A ARG1 e a ARG2 são codificados pelos genes *ARG1* e *ARG2* respectivamente, e há muitas variantes genéticas da *ARG1* relatadas no dbSNP - mais de 4900 - enquanto de *ARG2* existem mais de 12 mil, porém, poucos parecem estar listados na literatura. Assim como polimorfismos de NOS3, é possível que polimorfismos nas arginases tenham influência na PE, uma vez que aparentemente a enzima em si é capaz de influenciar a pressão sanguínea.

Tendo em vista o *background* apresentado, este trabalho visa investigar a possível relação de polimorfismos genéticos de *NOS3*, *ARG1* e *ARG2* e a PE. Os polimorfismos alvo do estudo são do tipo SNV – variações de nucleotídeo único – mais conhecido como SNP – polimorfismo de nucleotídeo único. Essa variação se caracteriza como uma mutação de um único par de bases num alelo e cuja frequência é significativa numa população. Além deste tipo de variante ser extensamente relatada, SNPs podem ter os mais diferentes impactos, a níveis de transcrição, de transcrito, de tradução ou ainda na proteína em si, alterando a via do NO de alguma forma.

2 METODOLOGIA

O levantamento bibliográfico neste trabalho foi feito no mês de novembro de 2023, utilizando as seguintes bases de dados: PubMed, MDPI, WebScience e dbSNP (da National Library of Medicine - NLM). Para os trabalhos a respeito dos SNVs da NOS3 foram utilizadas as combinações das palavras-chave “*NOS3*” ou “Endothelial nitric oxide synthase” ou “eNOS” **mais** “SNP” ou “polymorphism” **mais** “preeclampsia” ou “pregnancy hypertention” ou “gestational hypertention” na busca. Já para os trabalhos a respeito dos SNVs de ARG1 e ARG2 foram utilizadas as palavras-chave “*ARG1*”, “*ARG2*” ou “Arginase 1”, “Arginase 2” ou “cytosolic arginase”, “mitochondrial arginase” **mais** “SNP” ou “polymorphism” **mais** “preeclampsia” ou “pregnancy hypertention” ou “gestational hypertention” na busca

Na plataforma dbSNP, que se trata de um banco de dados especificamente de polimorfismos genéticos com base na National Library of Medicine, utilizando a ferramenta Variation Viewer foi feita uma busca por “*NOS3*”, uma segunda busca foi feita por “*ARG1*”, e por fim uma terceira por “*ARG2*”, todas com os filtros “single nucleotide variant” e “Has publications/ Yes” ativados. Tais filtros foram utilizados para garantir que todos os resultados obtidos seriam do tipo SNV e com citação na literatura. O genoma de referência utilizado em todos os casos foi o GRCh38.p14. Foi gerada uma lista com os polimorfismos existentes nos genes de interesse e que possuem alguma citação em publicação.

Assim, foram selecionados para este trabalho publicações a respeito de SNVs dos genes de NOS3, ARG1 e ARG2 elencados com a PE. Os critérios de exclusão foram: trabalhos que tratassem apenas de outras doenças hipertensivas que não a PE; que não tratassem de ao menos um polimorfismo do tipo SNV dos genes de interesse; ou que utilizasse exclusivamente modelo animal.

3 RESULTADOS

Como resultados nas buscas a respeito da NOS3 foram obtidos um total de 81 resultados no dbSNP, isto é, há 81 variantes de nucleotídeo único do gene pesquisado e que estão relatados como havendo alguma relação com fenótipo humano. Destes, 52 estavam listados como citados em alguma publicação, entre eles 5 foram selecionados para o estudo, já que estavam em publicações a respeito da PE. Aliado às outras bases de dados, foram encontrados um total de 84 trabalhos, e incluídos um total de 39, em que: 2 são revisões sistemáticas, 4 são meta-análises, 1 é simultaneamente meta-análise e estudo do tipo caso-controle e os 32 restantes são estudos do tipo caso-controle.

Variante	Localização chr7:	Consequência Molecular	Significado Clínico*	Freq. 1000G	Troca de bases	Localização região gênica	Alteração de aa
rs1799983	150.999.023	missense variant	patogênica	T=0.18	894G>T	éxon 7	Asp298Glu
rs2070744	150.992.991	intron variant	fator de risco	C=0.23	-786 T>C	promoter	-
rs3918227	151.003.858	intron variant	benigna	A=0.054	C26425A	intron 13	
rs743506	151.009.827	intron variant	desconhecida	G=0.28		intron 20	-
rs7830	151.012.483	intron variant	benigna	T=0.36		intron 24	-

Tabela 1. Lista com SNPs de *NOS3* relacionados com a PE na literatura. A frequência alélica na tabela corresponde à frequência alelo de menor frequência considerando a população global, com base no projeto 1000Genomas[] * = O significado clínico corresponde ao significado clínico retirado do ClinVar, que permanece sendo revisado conforme mais estudos são publicados a respeito do SNP.

Já a respeito das arginases, na busca por ARG1 e ARG2 foram obtidas respectivamente listas com 17 e 12 variantes no dbSNP. Por este método de pesquisa foram encontrados 3 SNPs de *ARG1* e 2 de *ARG2* relacionados com a PE. Em conjunto com as outras bases de dados foram obtidos 30 trabalhos ao todo, dos quais foram incluídos 2, além de mais um SNP que não foi encontrado no dbSNP com a metodologia utilizada, porém está citado em publicação sobre PE.

Variante ARG1	Posição chr6:	Consequência Molecular	Significado Clínico	Freq. Alelo 1000G	Notação	Localização região gênica	Alteração de aa
rs2781659	131.570.680	—	—	G= 0,44	A>G	Upstream <i>ARG1</i>	—
rs2781667	131.574.004	Intron variant	desconhecido	T=0,460	C>T	Íntron 1	—
rs2246012	131.577.068	Íntron variant	desconhecido	C= 0,2107	T>A/C	Íntron 2	—
rs17599586	131.583.579	Intron variant	benigna	T= 0,0867	C>T	Íntron 7	—

Variante ARG2	Posição chr14:	Consequência Molecular	Significado Clínico	Freq. Alelo 1000G	Notação	Localização região gênica	Alteração de aa
rs3742879	67.648.284	Intron variant	—	G=0,1172	A>G/C	Intron 7	—
rs10483801	67.650.289	Intron variant	—	0,3149	A>C	Intron 7	—

Tabela 2 – Lista com SNPs de ARG1 e ARG2 relacionados com a PE na literatura. A frequência alélica na tabela corresponde à frequência alelo de menor frequência considerando a população global, com base no projeto 1000Genomas.

4 DISCUSSÃO

4.1 NOS3

4.1.1 rs1799983

Esta variante é também extensamente conhecida como Glu298Asp, pois se trata de uma variante missense no éxon 7 que resulta na troca de um aspartato por um glutamato no resíduo 298 da NOS3[48]. Sua localização genômica é chr7:150999023, onde ocorre a transversão de bases T>G e o alelo T aparece em menor frequência, sendo T=0,0705 entre a população Africana e aparecendo com alta frequência na população Europeia em que T= 0,3400 [48]. Essa alteração de resíduo Glu298Asp resulta na redução da ligação da NOS3 à caveolina-1 nos caveolos membranares, reduzindo portanto, a quantidade de NOS3 disponível para ativação e consequentemente diminuindo a produção de NO [48].

De maneira geral boa parte dos estudos, individualmente, não encontraram relações expressivas entre a variante e a PE. Todos relataram heterogeneidade em relação aos genótipos encontrados independente da população estudada.

Em relação aos estudos realizados com a população Europeia/Caucasiana, em alguns estudos não foram encontradas relações diretas da variante com a PE [14] [41]. Porém estudos realizados já nesta última década mostraram resultados conflitantes, no qual alguns sugeriam que o genótipo TT era mais comumente encontrado em gestantes PE do que em gestantes saudáveis, na Grécia [30], enquanto outros estudos gregos não encontraram tal correlação e afirmaram verificar o alelo T mais presente em gestantes saudáveis [16]. Outros continuaram não encontrando correlações, nem na população grega nem na inglesa [17] [41].

Alguns estudos com populações Asiáticas também encontraram dados conflitantes entre si, especialmente os do início dos anos 2000. Alguns identificaram que a presença do alelo T como significativamente mais presente, especialmente na PE severa na população japonesa e coreana [18] [20], porém ao tentar replicar o estudo em países emergentes da Ásia, como Bangladesh, nenhuma correlação foi encontrada [19]. O autor sugeriu que, em países emergentes, onde a incidência de PE é maior, o alelo T estaria desassociado da PE, por interações com fatores socioeconômicos e culturais (como alimentação e estado geral de saúde), porém em outras populações, poderia ser um fator de risco para a doença [19]. Em alguns estudos na população chinesa, não foi encontrada significância da variante com a PE [38] [21], porém em um estudo foi sugerido que a presença do genótipo TT pudesse ser protetor para a condição, já que foi mais comumente encontrado em gestantes saudáveis em comparação com

a PE [28], no entanto o autor reforçou a necessidade de estudos mais robustos para tal afirmação.

Já em estudos com populações Latino-Americanas, enquanto alguns autores não encontraram relação alguma [22][33] outros estudos relataram resultados que indicavam que gestantes com o genótipo TT, ou seja, homozigose Asp298, possuíam menores concentrações de NO circulante, e talvez estivessem susceptíveis a disfunção endotelial [23, 29]. O autor ainda sugeriu que o fator de risco talvez fosse a presença do haplótipo 'C Asp298 b', formado em conjunto com a variante rs2070722 (-786 T>C) e uma variante do tipo *tandem repeat* de 27 pb no íntron 4 conhecida como 4b/a [23], já que este haplótipo foi significativamente mais comum em gestantes PE. Corroborando indiretamente com tais achados, outro autor teve achados em seus estudos em que o haplótipo 'T Glu b' era mais frequente em gestantes saudáveis e estava relacionado a maiores concentrações de nitrito circulantes na população brasileira [25] [26], sugerindo que tal combinação poderia ser protetiva contra a PE. Porém, foi indicado por um estudo na população mexicana com descendência indígena que foi mais comum em relação às gestantes saudáveis a presença do haplótipo 'C Asp298 4b' na PE [29]. O autor sugeriu que as possíveis inconsistências em relação a associação ou não de haplótipos em seu estudo se dê pela heterogeneidade de background genético das populações, no caso, da população mexicana em relação as outras populações do continente americano [29].

Apenas um estudo especificamente da população Africana foi encontrado [24], em que ao analisar a associação do polimorfismo com a PE e o descolamento de placenta em população miscigenada sul-africana, não encontrou relação com a PE especificamente, porém uma associação do alelo T, especialmente do genótipo TT com o descolamento de placenta em pacientes PE, especialmente naquelas com PE severa, porém não nos controles.

Em relação as meta-análises, é possível perceber que a concepção a respeito da interpretação da consequência da variante foi mudando ao longo do tempo. Inicialmente em 2011 e 2012, com cerca de 15 estudos caso-controle da variante e aproximadamente 1500 casos PE e 2160 controles saudáveis cada estudo, não foram encontradas correlações significativas entre o polimorfismo e a PE, mesmo quando feitas estratificações por população [28][36]. Em 2013, outro autor ao fazer a meta-análise de 22 estudos caso-controle, também não encontrou relação entre o desenvolvimento da doença e a variante [31].

Já em 2016, ao fazer a análise com um total de 2,863 casos e 5,726 controles, foi relatada a relação estatisticamente relevante entre o SNP e a PE, afirmando a robustez do resultado comparado com meta-análises anteriores por conta do poder estatístico de tamanha amostra,

além da exclusão de estudos cuja distribuição de alelos e genótipos nos controles desviavam do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), o que poderia ter enviesado os resultados dos outros autores [32]. O autor ainda ressaltou que ao se fazer a análise estratificada por população, nota-se um risco especial na população caucasiana.

Diferentemente de análises anteriores, em 2021, ao avaliar a associação do polimorfismo 894 G>T da *NOS3* com o risco de PE em uma meta-análise com 4046 casos e 6068 controles, provenientes de 35 estudos do tipo caso-controle, encontrou-se associação significativa em populações europeias e miscigenadas, porém não em outras etnias [34]. O autor ainda sugeriu que mesmo inconsistente com algumas das meta-análises anteriores à sua publicação, o polimorfismo rs1799983 está relacionado com uma maior susceptibilidade à pré-eclâmpsia, especialmente em populações brancas e miscigenadas, já que considera que os resultados a respeito desta variante são estáveis e robustos. Segundo o autor, talvez estas análises ainda não estivessem com uma quantidade suficiente de estudos para inferências de tal tipo [34].

Mais recentemente, alguns autores passaram a fazer trabalhos buscando associações dos marcadores de resposta farmacológica ou ainda a resposta em si, como a avaliação da associação de polimorfismos *NOS3* Asp298Glu e rs2071746 de HO-1(hemeoxigenase-1) e a responsividade de gestantes PE à metildopa. É possível que combinações destes genótipos tenham influência na resposta à terapia anti-hipertensiva [35].

Entretanto, mais estudos são necessários para validar os efeitos combinados de haplótipos de eNOS para o risco, prognóstico ou ainda impactos em resposta farmacológica deste polimorfismo na PE.

4.1.2 rs2070744

Este polimorfismo se trata de uma transição de bases T>C localizado em chr7:150992991, na região promotora do gene *NOS3*. A menor frequência deste alelo encontrada em uma população é na Africana, em que T=0,1231, segundo o projeto 1000Genomas 30x. Há estudos que exploram a caracterização da zona promotora do gene, sendo este polimorfismo apontado como possivelmente redutor da expressão de *NOS3* [12].

As associações a respeito do polimorfismo -786T>C também se mostraram contraditórias em algumas populações. Em populações Europeias/caucasianas num primeiro momento não foram relatadas diferenças significativas em relação a distribuição de alelos em gestantes saudáveis e PE [17] [44]. Porém foi sugerido que a homozigose de Asp298 e alelo C

da mutação -786T>C 'Asp298 C' se mostrou não só como um fator de risco para a PE como para complicações na gravidez. Também foi sugerido, como citado no tópico anterior, que haplótipos formado por Asp298 e alelo C da mutação -786T>C e o alelo b de 4b/a são não só um fator de risco para a PE como para complicações na gravidez [14] Alguns trabalhos identificaram que o alelo C estava significativamente mais presente em gestantes PE, em especial na PE severa [43].

Na população Latino-americana, por mais que não tenham sido elencados SNPs específicos com a susceptibilidade à PE [22], alguns estudos demonstraram a relação da presença de haplótipos com a doença, alguns relacionando o haplótipo 'C b Asp298' com a PE [29], especialmente a PE severa [33]; outros o 'C b Glu' com maiores níveis de nitrito em gestantes saudáveis [25] [26].

Algumas da meta-análises que avaliaram a relação do polimorfismo rs1799983 com a PE, também o fizeram para a variante rs2070744 [28][31][32][36]. Ao realizar uma meta-análise em 2012, com apenas 6 estudos sobre o polimorfismo, e um total de 737 casos e 1077 controles, assim como para o polimorfismo rs1799983, não foi encontrada nenhuma relação de -786T>C com a PE [28]. Porém em análises de 2013 [31] e 2016 [32], com 22 estudos e 15 estudos respectivamente, inferiu-se que há relação entre a presença do alelo C com a PE - porém, foram conflitantes entre si já que numa concluiu-se que o risco aumentado para a o desenvolvimento da doença, a presença do alelo C, se dá em modelo dominante e associado a menores níveis circulantes de NO nos casos [31], enquanto noutra afirma-se que se daria num modelo recessivo; a presença do genótipo CC [32]. O autor que sugeriu a presença do alelo variante num modelo recessivo autoafirma a robustez de seu resultado [32], comparado com o outro [31], uma vez que excluiu estudos cujos controles desviavam do HWE, o que poderia enviesar as análises e/ou deslocar os resultados.

4.1.3 rs3918227

O polimorfismo rs3918227 se trata de uma transversão de uma citosina para uma adenina, ou minoritariamente para uma guanina, cuja menor frequência relatada é na população Africana em que A= 0,0011, segundo o projeto 1000Genomas 30x, e de maior frequência na população Europeia/Caucasiana em que A= 0,0995 [48]. Sua posição é a chr7: 151.003.858, sendo um SNP de região intrônica – não codificante – no íntron 13 no transcrito comum de NOS3. Porém esta localização corresponde a uma região capaz de sofrer splicing alternativo, gerando outros 3 transcritos, sem atividade enzimática quando traduzidos, de NOS3: NOS13A,

NOS13B, e NOS13C [49], em que todas possuem em comum com a NOS3 os 13 primeiros éxons. Nessas variantes de *NOS3*, o SNP passa a fazer parte de uma região 3'UTR.

Em relação a PE, foi encontrado 1 trabalho avaliando a relação do polimorfismo com a doença [50] na população indígena americana, porém sem relevância estatística. Outros trabalhos investigando o polimorfismo avaliaram sua relação com a degeneração macular por idade [51] e vasculopatia coroidal, doença coronária [52], encefalopatia hipóxica/isquêmica [53], entre outros, porém também não foram encontradas associações.

4.1.4 rs743506 e rs7830

O polimorfismo rs743506 é uma transição de bases A>G na posição chr7: 151009827, e cuja menor frequência é G=0,178 na população Americana, enquanto a maior é G=0,471 encontrada na população Africana, segundo o projeto 1000Genomes 30x [54]. Tal variação ocorre no íntron 20, numa região regulatória que é sítio de ligação de CTCF [54], que é uma proteína de regulação da transcrição essencial e constitutiva, e cuja função de favorecer ou reprimir a transcrição depende em muito da arquitetura da cromatina local no núcleo [55, 56], em especial em regiões concomitantemente promotoras, como é o caso dessa região do intrônica de *NOS3*. Já o polimorfismo rs7830 se localiza em chr7:151012483, sendo uma transversão G>T que ocorre no íntron 24 do gene *NOS3*, numa região tal como onde se localiza rs743506, também se trata de um domínio com sítio de ligação para CTCF sobreposto a uma região promotora [60]. A menor frequência encontrada para esta variante é T=0,1943 enquanto a maior é G=0,525, nas populações Africana e Americana respectivamente [60].

A respeito da ligação com a PE, um estudo não encontrou correlação dos polimorfismos de maneira isolada com a doença [42] numa população Americana/Miscigenada, porém com a análise de haplótipos foi sugerido que o alelo G de maneira a formar um haplótipo "C b G G C" em conjunto com as variações rs2070744, 4a/b, rs1799983 respectivamente, poderia ser protetor para o desenvolvimento da PE, já que este haplótipo foi significativamente mais comum em gestantes saudáveis que em PE. Também há trabalhos avaliando a relação destas variantes com hipertensão e obesidade infantil [57], também com os níveis de nitrito circulante na população negra [58], porém sem resultados significativos. Há ainda um trabalho que verifica a relação da variante rs743506 à resposta ao enalapril na hipertensão [59], e trabalhos relacionando o SNP rs7830 com glaucoma de ângulo aberto [61], porém ambos sugerem a necessidade de mais estudos para resultados significativos.

4.2 ARG1

Apenas 2 estudos foram encontrados relacionando as arginases com a PE, sendo que ambos avaliavam os mesmos SNPs de arginase 1 e 2, descritos na tabela 2.

Sobre as variantes, uma se localiza já na região *upstream* de *ARG1*, a rs2781659 de localização chr 6:131.570.680. que é uma transição A>G, com a menor frequência do alelo G na população Sul-Asiática em que G=0.3178 e maior frequência na população Africana na qual G=0.7027. O SNP rs2781667 é uma transição C>T que se localiza em chr6:131.574.004, região do íntron 1, e cuja menor frequência do alelo T aparece na população Sul Asiática, sendo T=0,3136, e em maior frequência na população Africana T=0,7688. É uma transição do mesmo tipo o SNP rs17599586, de localização chr6:131.583.579, região do íntron 7, e cujas menor e maior frequências são T=0,0051 na população Leste Asiático e T=0,1272 na população Europeia/Caucasiana respectivamente. Por fim, localizado no íntron 2 têm se a transição T>C rs2246012, localizado em chr6:131.577.068, e que as frequências maior e menor correspondem a C=0,1285 e C= 0,3427 na população Africana e Leste-Asiática respectivamente. Em nenhuma dessas variantes estão relatadas regiões reguladoras específicas [65], porém pode ser que coincidam com domínios e sítios ainda não relatados.

O genótipo GG e, o alelo G de maneira geral, do SNPs rs2781659 se mostrou mais frequente em gestantes PE, porém gestantes saudáveis com o genótipo GG apresentaram níveis mais altos de nitrito plasmático [62]. Segundo os autores, tal achado sugere que o alelo G ou ainda o genótipo GG seja fator de risco para a PE, e que tal característica talvez se relacione com uma expressão reduzida de *ARG1*, justificando também o achado que as gestantes saudáveis, portanto sem influências patogênicas na via do NO, possuem maiores níveis de nitrito. Entretanto em nenhum dos SNPs foram encontradas alterações significativas nos níveis de L-arginina ou de expressão de *ARG1* dentre os grupos neste estudo [62].

Também apresentaram níveis significativamente mais altos de nitrito plasmático em comparação com as gestantes PE as gestantes saudáveis portadoras do genótipo TT e do alelo T do rs2781667, além de uma pressão sanguínea sistólica mais baixa [62]. Foi sugerido então que talvez o alelo T deste polimorfismo tenha relação com a modulação do nitrito plasmático. Na literatura, este SNP vem sendo associado com maior atividade da arginase, além de risco patologias cardiovasculares e baixas concentrações de nitrito plasmáticas, assim como o rs2781666[62].

Também foi visto que o alelo C do SNP rs2246012 está presente em maior frequência dentre o grupo PE, porém sem alterações na concentração de nitrito plasmático [62]. Na

literatura, a investigação deste polimorfismo em doenças respiratórias, disfunção erétil ou câncer não parece ter resultados significativos.

4.3 ARG2

Ambos os polimorfismos de arginase 2 incluídos neste estudo se localizam no íntron 7, sendo o rs10483801 uma transversoão C>A, localizado em chr14:67650289 e cujas menor e maior frequências na população são A= 0,1681 na população Sul-Asiática e de A=0,4564 na população Leste-Asiática. Já a variante rs3742879 se localiza em chr14:67648284 e se trata de uma transição de bases A>G, cuja menor é frequência é na população Africana e Asiática em que G=0,015, enquanto a maior é na população Europeia em que G= 0,308 [64]. Não há nenhuma função regulatória linckada com a região na plataforma ensemble.

Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de nitrito, e os autores sugerem [62, 63] que por mais que seja possível a participação da ARG2 na fisiopatologia da PE, o impacto de polimorfismos do gene ARG2 possivelmente é pequeno. Em relação ao nitrito, foi relatado que talvez diferenças significativas não tenham sido encontradas porque a concentração deste composta é reduzida na PE, além de ser um marcador indireto da biodisponibilidade do NO, e não da sua síntese [62].

Num outro trabalho, de avaliação da associação dos polimorfismos rs3742879 e rs10483801 com a responsividade aos anti-hipertensivos em PE, o alelo G de rs3742879 não só foi menos frequente em gestantes não-responsivas à terapia com anti-hipertensivos, comparado com as gestantes responsivas, como também quem possuía este alelo possuía níveis mais baixos de arginase 2, além de concentrações mais altas de nitrito [63]. Aparentemente em pacientes não responsivas à terapia com anti-hipertensivo, o genótipo AA esteve associado com maiores níveis de arginase plasmática, além de menores níveis plasmáticos de nitrito. Porém, nenhum efeito do polimorfismo rs10483801 foi observado. Na literatura, há um trabalho que sugere que as variantes de ARG2 têm influência na resposta ao propofol, e trabalhos que as buscam associação destes SNPs com a asma e disfunção erétil [64].

4.4 Considerações

Tendo em vista os trabalhos aqui revisados, fica claro a possibilidade de realização de outros estudos das interações gene-gene na fisiopatologia da PE ou ainda na resposta terapêutica. Tendo em vista também que, por mais que os SNPs influenciem aspectos da PE, estes não parecem ter papel central da etiologia da doença, sendo uma doença multifatorial e, provavelmente, com um conjunto diverso de alterações epigenéticas que compõe o quadro.

Talvez esta área do conhecimento se beneficiasse de estudos com um enfoque em entender um possível alvo terapêutico epigenético visando aumentar a expressão de NOS ou de fatores antioxidantes, a fim de reverter o quadro de estresse oxidativo e restabelecer a função normal do epitélio. Evidentemente que, sendo a NOS uma proteína constitutivamente expressa, essa tarefa seria difícil sem o enfoque de fatores de transcrição o mais específico possível da NOS ou de *NOS3*. Um candidato endógeno talvez fossem os Krüppel-like factors (KLF), um fator de transcrição liberado em resposta ao estresse de cisalhamento (promovido pelo fluxo sanguíneo) [9] e moléculas como o resveratrol [66].

Alguns autores relataram que em relação as inferências sobre o NO plasmático, deve-se ressaltar que por mais que a medição de nitrito seja marcador da biodisponibilidade de NO, pode ser complicado entender ou inferir a produção real de NO, especialmente na PE. Uma vez que é característico da pré-eclâmpsia a disfunção endotelial e o estresse oxidativo, é indutivo pensar que nem todo NO produzido é biodisponível já que parte vai reagir com radicais livres e EROs gerados pelo desbalanço entre as forças oxidativas e as antioxidantes, formando por exemplo o peroxinitrito [9].

Vale lembrar a necessidade de mais estudos com a população Africana, já que a maioria se deu em outras populações, o que desfavorece a construção do conhecimento tendo em vista o viés de raça/etnia.

5 CONCLUSÃO

Fica claro com a presente revisão que mais estudos são necessários especificamente a respeito da relação das arginases com a óxido nítrico sintase, sendo que pouco pode se inferir com certeza sobre a relação entre estas enzimas. Alguns estudos são sugestivos com a ideia de que a arginase, especialmente a *ARG2* pode ser moduladora dos níveis de NO, porém mais estudos são necessários explorando a relação de biossíntese, e possivelmente de resposta farmacológica e interação gene-gene, devem ser realizados.

Por mais que as variantes de nucleotídeo único de *NOS3* tenham tido trabalhos com resultados conflitantes a respeito da sua relação com a PE nas últimas décadas, tais resultados podem ser por conta do *n* amostral dos estudos caso-controle, os quais, a nível individual, acabam sendo reduzidos—comparado com a quantidade necessária para uma robustez estatística a respeito dos polimorfismos. Com as revisões e meta-análises mais recentes, já somando uma quantidade de indivíduos na faixa dos milhares, parece que algumas inferências podem ser feitas.

A respeito dos polimorfismos, a variação rs1799983 leva a impactos estruturais na NOS3, podendo sim ser um fator de risco para a PE e tendo respaldo em meta-análises mais recentes. Sobre possíveis relações causais, impactos a nível de resposta farmacológica, interação gene-gene ou ainda influência de haplótipos contendo esta variante mais estudos são necessários para avaliação dos achados. Porém, é sugestivo que haplótipos contendo o SNP, e também a variante rs2070744, estabeleçam relações de fatores de risco - ou até de proteção para a PE - especialmente na população Caucasiana ou Americana/miscigenada.

A relação da variação rs2070744 com a PE necessita mais estudos para avaliação da influência na resposta farmacológica ou na fisiopatologia da doença, porém parece que esta variante influencia os níveis de NO plasmático na PE além de ser um fator de risco. Tal achado seria possível tendo em vista que a posição desta variante dentro de uma região promotor altera a expressão de NOS3 [12].

Vale ressaltar que em relação a outros polimorfismos do óxido nítrico sintase discutidos no trabalho, sua influência na PE é inconclusiva, já que foram encontrados poucos trabalhos dissertando sobre. Também não fica clara a relação da *ARG1* com a PE, já que existem poucos trabalhos elencando o gene com a doença. Mais estudos devem ser feitos em diferentes populações para avaliar a possível relação gene-gene de *NOS3* e *ARG1* ou ainda a influência dessa relação na síntese do NO e na resposta aos fármacos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Silva, V.R.S; Silva T.L. Fatores de risco e genes envolvidos na pré-eclâmpsia. *Revista Saúde Multidisciplinar*, v. 5, p. 81-86, 2019.
- [2] Shamsi, U.; Saleem, S.; Nishter, N. Epidemiology and Risk Factors of Preeclampsia ; An Overview of Observational Studies. *Al Ameen J Med Sci*, v. 6, n. 4, p. 292–300, 2013.
- [3] Johal, T. et al. The nitric oxide pathway and possible therapeutic options in pre-eclampsia. *British Journal Of Clinical Pharmacology*, v. 78, n. 2, p. 244-257, 2014.
- [4] Luizon, M.R; Palei, A.C.T; Cavalli, R.C; Sandrim, V.C. Pharmacogenetics in the treatment of pre-eclampsia: current findings, challenges and perspectives. *Pharmacogenomics*, v.18, n. 6, 2017
- [5] Caldeira-Dias, M. et al. Resveratrol and grape juice: Effects on redox status and nitric oxide production of endothelial cells in in vitro preeclampsia model. *Pregnancy Hypertension*, v. 23, p. 205–210, 2021.
- [6] Viana-Matiolli, Sarah et al. SIRT1-dependent effects of resveratrol and grape juice in an in vitro model of preeclampsia. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 131. ,p 110659, 2020.
- [7] Caldeira-Dia, M.; Montenegro, M.F.; Bettiol, H; et al. Resveratrol improves endothelial cell markers impaired by plasma incubation from women who subsequently develop preeclampsia. *Hypertens Res*, v. 42, p. 1166–1174, 2019.
- [8] Oliveira-Paula GH, Lacchini R, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms. *Gene*. 2016 Jan 10;575(2 Pt 3):584-99. doi: 10.1016/j.gene.2015.09.061. Epub 2015 Sep 28. PMID: 26428312; PMCID: PMC6728140.
- [9] Ritter, James M. Rang & Dale Farmacologia. Cap 21 Óxido Nítrico E Mediadores Relacionados, p260-270 [Rio de Janeiro/RJ]: Grupo GEN, 2020. E-book. ISBN 9788595157255. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788595157255/>
- [10] Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F, Ruth P. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta. *Nature*. 2000 Mar 9;404(6774):197-201. doi: 10.1038/35004606. PMID: 10724174.
- [11] Cortese-Krott MM, Kelm M. Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: key to a new erythrocrine function? *Redox Biol*. 2014 Jan 9;2:251-8. doi: 10.1016/j.redox.2013.12.027. PMID: 24494200; PMCID: PMC3909820.
- [12] Surks HK, Mochizuki N, Kasai Y, Georgescu SP, Tang KM, Ito M, Lincoln TM, Mendelsohn ME. Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase Ialpha. *Science*. 1999 Nov 19;286(5444):1583-7. doi: 10.1126/science.286.5444.1583. PMID: 10567269.
- [13] Luo Y, Chen Y, Zhang Y, Zhou Q, Gao Y. Association of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) G894T polymorphism with high altitude pulmonary edema susceptibility: a meta-analysis. *Wilderness Environ Med*. 2012 Sep;23(3):270-4. doi: 10.1016/j.wem.2012.03.007. Epub 2012 Jul 13. PMID: 22795910.
- [14] Fatini C, Sticchi E, Gensini F, Genuardi M, Tondi F, Gensini GF, Riviello C, Parretti E, Mello G, Abbate R, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene influences the risk of pre-eclampsia, the recurrence of negative pregnancy events, and the maternal-fetal flow. *J Hypertens*. 2006;24:1823–1829. doi:<https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000242407.58159.87>.

- [15] American college of obstetricians and gynecologists, Task Force on Hypertension in Pregnancy. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol.* v. 122, n. 5, p. 1122–1131, 2013.
- [16] Pappa KI, Roubelakis M, Vlachos G, Marinopoulos S, Zissou A, Anagnou NP, Antsaklis A. Variable effects of maternal and paternal–fetal contribution to the risk for preeclampsia combining GSTP1, eNOS, and LPL gene polymorphisms. *J Maternal-Fetal Neonatal Med.* 2011;24:628–635. doi:https://doi.org/10.3109/14767058.2010.511351
- [17] Zdoukopoulos N, Doxani C, Messinis IE, Stefanidis I, Zintzaras E. Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene in preeclampsia: a candidate-gene association study. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2011;11:89. doi:https://doi.org/10.1186/1471-2393-11-89
- [18] Yoshimura T, Yoshimura M, Tabata A, Yasue H, Okamura H. The missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene is strongly associated with placental abruption. *Human Genet.* 2001;108:181–183. doi:https://doi.org/10.1007/s004390000454.
- [19] Yoshimura T, Chowdhury FA, Yoshimura M, Okamura H. Genetic and environmental contributions to severe preeclampsia: lack of association with the endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp variant in a developing country. *Gynecol Obstet Invest.* 2003;56:10–13. doi:https://doi.org/10.1159/000072324
- [20] Kobashi G, Yamada H, Ohta K, Kato E-H, Ebina Y, Fujimoto S. Endothelial nitric oxide synthase gene (NOS3) variant and hypertension in pregnancy. *Am J Med Genet.* 2001;103:241–244. doi:https://doi.org/10.1002/ajmg.1535.
- [21] Kim YJ, Park BH, Park H, Jung S-C, Pang M-G, Ryu H-M, Lee K-S, Eom S-M, Park H-Y. No association of the genetic polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase, dimethylarginine dimethylaminohydrolase, and vascular endothelial growth factor with preeclampsia in Korean populations. *Twin Res Hum Genet.* 2008;11:77–83. doi:https://doi.org/10.1375/twin.11.1.77.
- [22] Landau R, Xie H-G, Dishy V, Wood AJJ, Stein CM, Smiley RM. No association of the Asp298 variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with preeclampsia. *Am J Hypertens.* 2004;17:391–394. doi:https://doi.org/10.1016/j.amjhyper.2004.01.006.
- [23] Serrano NC, Casas JP, Díaz LA, Páez C, Mesa CM, Cifuentes R, Monterrosa A, Bautista A, Hawe E, Hingorani AD, et al. Endothelial NO synthase genotype and risk of preeclampsia: a multicenter case-control study. *Hypertension.* 2004;44:702–707
- [24] Hillermann R, Carelse K, Gebhardt GS. The Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with an increased risk for abruptio placentae in pre-eclampsia. *J Hum Genet.* 2005;50:415–419. doi:https://doi.org/10.1007/s10038-005-0270-8.
- [25] Sandrim VC, Palei AC, Cavalli RC, Araújo FM, Ramos ES, Duarte G, Tanus-Santos JE. eNOS haplotypes associated with gestational hypertension or preeclampsia. *Pharmacogenomics.* 2008;9:1467–1473. doi:https://doi.org/10.2217/14622416.9.10.1467.
- [26] Sandrim VC, Palei AC, Sertorio JT, Cavalli RC, Duarte G, Tanus-Santos JE. Effects of eNOS polymorphisms on nitric oxide formation in healthy pregnancy and in pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod.* 2010 Jul;16(7):506-10. doi: 10.1093/molehr/gaq030. Epub 2010 May 10. PMID: 20457799.
- [27] Ozturk, E., Balat, O., Pehlivan, S., Ugur, M.G., Özcan, Ç., Sever, T. and Kul, S. (2011), Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in preeclampsia with or without eclampsia in a Turkish population.

Journal of Obstetrics and Gynaecology Research, 37: 1778-1783. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0756.2011.01606.x>

[28] Chen H, Zhao G, Sun M, Wang H, Liu J, Gao W, Meng T. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (G894T, 4b/a and T-786C) and preeclampsia: meta-analysis of 18 case-control studies. *DNA Cell Biol.* 2012 Jun;31(6):1136-45. doi: 10.1089/dna.2011.1406. Epub 2011 Nov 4. PMID: 22054068.

[29] Díaz-Olgún L, Coral-Vázquez RM, Canto-Cetina T, Canizales-Quinteros S, Ramírez Regalado B, Fernández G, Canto P. Endothelial nitric oxide synthase haplotypes are associated with preeclampsia in Maya mestizo women. *Dis Markers.* 2011;31:83–89.

[30] Ozturk, E., Balat, O., Pehlivan, S., Ugur, M.G., Özcan, Ç., Sever, T. and Kul, S. (2011), Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in preeclampsia with or without eclampsia in a Turkish population. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 37: 1778-1783. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0756.2011.01606.x>

[31] Dai B, Liu T, Zhang B, Zhang X, Wang Z. The polymorphism for endothelial nitric oxide synthase gene, the level of nitric oxide and the risk for pre-eclampsia: a meta-analysis. *Gene.* 2013 Apr 25;519(1):187-93. doi: 10.1016/j.gene.2013.01.004. Epub 2013 Jan 29. PMID: 23375994.

[32] Zeng F, Zhu S, Wong MC, Yang Z, Tang J, Li K, Su X. Associations between nitric oxide synthase 3 gene polymorphisms and preeclampsia risk: a meta-analysis. *Sci Rep.* 2016 Mar 21;6:23407. doi: 10.1038/srep23407. PMID: 26997284; PMCID: PMC4800677.

[33] Coral-Vázquez RM, Romero Arauz JF, Canizales-Quinteros S, Coronel A, Valencia Villalvazo EY, Hernández Rivera J, Ramírez Regalado B, Rojano Mejía D, Canto P. Analysis of polymorphisms and haplotypes in genes associated with vascular tone, hypertension and oxidative stress in Mexican-Mestizo women with severe preeclampsia. *Clin Biochem.* 2013;46:627–632.

[34] Abbasi H, Dastgheib SA, Hadadan A, Karimi-Zarchi M, Javaheri A, Meibodi B, Zanbagh L, Tabatabaei RS, Neamatzadeh H. Association of Endothelial Nitric Oxide Synthase 894G > T Polymorphism with Preeclampsia Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis based on 35 Studies. *Fetal Pediatr Pathol.* 2021 Oct;40(5):455-470. doi: 10.1080/15513815.2019.1710880. Epub 2020 Jan 10.

[35] Sandrim VC, Luizon MR, Pilan E, Caldeira-Dias M, Coeli-Lacchini FB, Kors G, Berndt I, Lacchini R, Cavalli RC. Interaction Between NOS3 and HMOX1 on Antihypertensive Drug Responsiveness in Preeclampsia. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2020 Aug;42(8):460-467. doi: 10.1055/s-0040-1712484. Epub 2020 Jun 19

[36] A. P. Shaik, A. Sultana, V. K. Bammidi, K. Sampathirao & K. Jamil (2011) A meta-analysis of eNOS and ACE gene polymorphisms and risk of pre-eclampsia in women, *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 31:7, 603-607, DOI: 10.3109/01443615.2011.598971

[37] Chen H, Zhao G, Sun M, Wang H, Liu J, Gao W, Meng T. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (G894T, 4b/a and T-786C) and preeclampsia: meta-analysis of 18 case-control studies. *DNA Cell Biol.* 2012 Jun;31(6):1136-45. doi: 10.1089/dna.2011.1406

[38] Lu Z, Fu F. The Correlation to Hypertensive Disorder Complicating Pregnancy and eNOS Gene Polymorphism of Pregnant Women and Their Foetus [Dissertation]. Qingdao University (China); 2009.

- [39] 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.
- [40] Ensemble. variant rs1799983 Homo_sapiens - Ensembl genome browser 108. Disponível em: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?db=core;g=ENSG00000164867;r=7:150991017-151014588;v=rs1799983;vdb=variation;vf=729515815. Acesso em: 20/11/2023
- [41] Yu CK, Casas JP, Savvidou MD, Sahemey MK, Nicolaidis KH, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (Glu298Asp) and development of pre-eclampsia: a case-control study and a meta-analysis. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2006;6:7
- [42] Muniz L, Luizon MR, Palei AC, Lacchini R, Duarte G, Cavalli RC, Tanus-Santos JE, Sandrim VC. eNOS tag SNP haplotypes in hypertensive disorders of pregnancy. *DNA Cell Biol*. 2012 Dec;31(12):1665-70. doi: 10.1089/dna.2012.1768. Epub 2012 Oct 12. PMID: 23062210.
- [43] Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Barlik M, Sieroszewski P, Grześkowiak E, Mrozikiewicz P. The significance of -786T > C polymorphism of endothelial NO synthase (eNOS) gene in severe preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2011 Mar;24(3):432-6. doi: 10.3109/14767058.2010.511329. Epub 2010 Sep 7. PMID: 20822330.
- [44] Aggarwal PK, Jain V, Jha V. Endothelial nitric oxide synthase, angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen gene polymorphisms in hypertensive disorders of pregnancy. *Hypertens Res*. 2010 May;33(5):473-7. doi: 10.1038/hr.2010.23. Epub 2010 Feb 26. PMID: 20186148.
- [45] Ensemble. variant rs2070744 Homo_sapiens - Ensembl genome browser 108. Disponível em: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Mappings?db=core;r=7:150992491-150993491;v=rs2070744;vdb=variation;vf=729628056. Acesso em: 20/11/2023
- [46] Romero MJ, Platt DH, Tawfik HE, Labazi M, El-Remessy AB, Bartoli M, Caldwell RB and Caldwell RW (2008) Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity. *Circ Res* 102:95-102.
- [47] Park K, Lee DG, Kim SW and Paick J-S (2009) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase in rat penile tissue: Reduced enzyme activity is responsible for erectile dysfunction in a rat model of atherosclerosis. *Int J Impot Res* 21:228-234
- [48] rs391822 RefSNP Report - dbSNP - NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs391822>. Acesso em: 20/11/2023
- [49] Lorenz M, Hewing B, Hui J, Zepp A, Baumann G, Bindereif A, Stangl V, Stangl K. Alternative splicing in intron 13 of the human eNOS gene: a potential mechanism for regulating eNOS activity. *FASEB J*. 2007 May;21(7):1556-64. doi: 10.1096/fj.06-7434com. Epub 2007 Jan 30. PMID: 17264164.
- [50] Best LG, Nadeau M, Bercier S, Dauphinais S, Davis J, Davis K, Poitra S, Anderson CM. Genetic variants, endothelial function, and risk of preeclampsia among American Indians. *Hypertens Pregnancy*. 2012;31(1):1-10. doi: 10.3109/10641955.2010.525276. Epub 2010 Dec 21. PMID: 21174581; PMCID: PMC6097880.
- [51] Zuo, Chengguo; Li, Meng; Zhang, Xiongze; Chen, Hui; Su, Yu; Wu, Kunfang; Wen, Feng (2016). ENOS polymorphisms in neovascular age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy in a Chinese Han population. *Ophthalmic Genetics*, (), 1–6. doi:10.3109/13816810.2015.1107598

[52] Westaway SK, Reinier K, Huertas-Vazquez A, Evanado A, Teodorescu C, Navarro J, Sinner MF, Gunson K, Jui J, Spooner P, Kaab S, Chugh SS. Common variants in CASQ2, GPD1L, and NOS1AP are significantly associated with risk of sudden death in patients with coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011 Aug 1;4(4):397-402. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.111.959916. Epub 2011 Jun 17. PMID: 21685173; PMCID: PMC3160237.

[53] Kuzmanić Šamija R, Primorac D, Rešić B, Pavlov V, Čapkun V, Punda H, Lozić B, Zemunik T. Association of NOS3 gene variants and clinical contributors of hypoxic-ischemic encephalopathy. *Braz J Med Biol Res*. 2014 Oct;47(10):869-75. doi: 10.1590/1414-431x20143938. Epub 2014 Aug 15. PMID: 25140814; PMCID: PMC4181222.

[54] Ensemble. variant rs743506 Homo_sapiens - Ensembl genome browser 108. Disponível em: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Regulation/Summary?db=core;fdb=funcgen;r=7:151009327-151010327;rf=ENSR00000329084;v=rs743506;vdb=variation;vf=729090557;regulation_view=variation_feature_variation=normal. Acesso em: 20/11/2023

[55] Dehingia B, Milewska M, Janowski M, Pękowska A. CTCF shapes chromatin structure and gene expression in health and disease. *EMBO Rep*. 2022 Sep 5;23(9):e55146. doi: 10.15252/embr.202255146. Epub 2022 Aug 22. PMID: 35993175; PMCID: PMC9442299.

[56] Holwerda SJ, de Laat W. CTCF: the protein, the binding partners, the binding sites and their chromatin loops. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2013 May 6;368(1620):20120369. doi: 10.1098/rstb.2012.0369. PMID: 23650640; PMCID: PMC3682731.

[57] Miranda JÁ de, Lacchini R, Belo VA, Lanna CM, Sertorio JT, Luizon MR, Tanus-Santos JE. The effects of endothelial nitric oxide synthase tagSNPs on nitrite levels and risk of hypertension and obesity in children and adolescents. *J Hum Hypertens*. 2015 Feb;29(2):109-14. doi: 10.1038/jhh.2014.48. Epub 2014 Jun 19. PMID: 24943287.

[58] Metzger IF, Luizon MR, Lacchini R, Ishizawa MH, Tanus-Santos JE. Effects of endothelial nitric oxide synthase tagSNPs haplotypes on nitrite levels in black subjects. *Nitric Oxide*. 2013 Jan 15;28:33-8. doi: 10.1016/j.niox.2012.10.002. Epub 2012 Oct 13. PMID: 23069892.

[59] Oliveira-Paula GH, Lacchini R, Luizon MR, Fontana V, Silva PS, Biagi C, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase tagSNPs influence the effects of enalapril in essential hypertension. *Nitric Oxide*. 2016 May 1;55-56:62-9. doi: 10.1016/j.niox.2016.03.006. Epub 2016 Apr 6. PMID: 27060232.

[60] Ensemble. variant rs7830 Homo_sapiens - Ensembl genome browser 108. Disponível em: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?db=core;fdb=funcgen;r=7:151011983-151012983;rf=ENSR00000843801;v=rs7830;vdb=variation;vf=728767064. Acesso em: 20/11/2023

[61] Kang JH, Wiggs JL, Rosner BA, Haines J, Abdrabou W, Pasquale LR. Endothelial nitric oxide synthase gene variants and primary open-angle glaucoma: interactions with hypertension, alcohol intake, and cigarette smoking. *Arch Ophthalmol*. 2011 Jun;129(6):773-80. doi: 10.1001/archophthalmol.2011.118. PMID: 21670344; PMCID: PMC3337676.

[62] Pinto-Souza CC, Coeli-Lacchini F, Luizon MR, Cavalli RC, Lacchini R, Sandrim VC. Effects of arginase genetic polymorphisms on nitric oxide formation in healthy pregnancy and in preeclampsia. *Nitric Oxide*. 2021 May 1;109-110:20-25. doi: 10.1016/j.niox.2021.02.003. Epub 2021 Mar 3. PMID: 33676021.

- [63] Luizon MR, Pinto-Souza CC, Coeli-Lacchini F, Lacchini R, Cavalli RC, Sandrim VC. ARG2 single-nucleotide polymorphism rs3742879 affects plasma arginase 2 levels, nitric oxide formation and antihypertensive therapy response in preeclampsia. *Pharmacogenomics*. 2022 Aug;23(13):713-722. doi: 10.2217/pgs-2022-0079. Epub 2022 Aug 16. PMID: 35971863.
- [64] Ensemble. Transcript ENSG00000081181 Homo_sapiens - Ensembl genome browser 108. Disponível em: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000081181;r=14:67619920-67651708. Acesso em: 20/11/2023
- [65] Ensemble. variant rs2781569 Homo_sapiens - Ensembl genome browser 108. Disponível em: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000118520;r=6:131470871-131584029;t=ENST00000673234;v=rs2781659;vdb=variation;vf=169031850. Acesso em: 20/11/2023
- [66] Negin Parsamanesh, Arghavan Asghari, Saeed Sardari, Aida Tasbandi, Tannaz Jamialahmadi, Suowen Xu, Amirhossein Sahebkar, Resveratrol and endothelial function: A literature review, *Pharmacological Research*, Volume 170, 2021, 105725, ISSN 1043-6618, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105725>.
- [67] Leineweber K, Moosmang S, Paulson D. Genetics of NO Deficiency. *Am J Cardiol*. 2017 Oct 15;120(8S):S80-S88. doi: 10.1016/j.amjcard.2017.06.013. PMID: 29025574.
- [68] D. Meroufel, J. Dumont, S. M'edi`ene-Benchekor, S. Benhammamouch, P. Ducimetière, D. Cottel, M. Montaye, P. Amouyel, T. Brousseau, Characterization of arginase 1 gene polymorphisms in the Algerian population and association with blood pressure, *Clin. Biochem*. 42 (2009) 1178–1182, <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2009.03.004>
- [69] J. Pernow, C. Jung, Arginase as a potential target in the treatment of cardiovascular disease: reversal of arginine steal? *Cardiovasc. Res*. 98 (2013) 334–343, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt036>.
- [70] S. Choi, C. Park, M. Ahn, J.H. Lee, T. Shin, Immunohistochemical study of arginase 1 and 2 in various tissues of rats, *Acta Histochem*. 114 (2012) 487–494, <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2011.09.002>
- [71] Luo S, Lei H, Qin H, Xia Y. Molecular mechanisms of endothelial NO synthase uncoupling. *Curr Pharm Des*. 2014;20(22):3548-53. doi: 10.2174/13816128113196660746. PMID: 24180388.
- [72] Pereira, Nuno. (2004). *Imagem Corporal e Identidade Sexual nos distúrbios penianos*.