

# Polimorfismo da região codante do gene NOS3 em idosos com Síndrome Metabólica

## Polymorphism of the codante region of the NOS3 gene in the elderly with Metabolic Syndrome

### Polimorfismo de la región codante del gen NOS3 en ancianos con Síndrome Metabólico

Isabella Possatti<sup>1</sup>, Camila Magalhães Garcia<sup>2</sup>, Giovanna Rodrigues de Paula<sup>3</sup>, Marcela dos Santos Teixeira<sup>4</sup>, Bruna Rodrigues Gontijo<sup>5</sup>,  
Ligia Canongia de Abreu Cardoso Duarte<sup>6</sup>, Silvana Scherz Funghetto<sup>7</sup>, Isabel Cristina Rodrigues da Silva<sup>8</sup>

**Como citar:** Gontijo BR, Silva IML, Possatti I, Fratelli CF, Duarte LCAC, Morais RM, et al. Polimorfismo da região codante do gene NOS3 em idosos com Síndrome Metabólica. REVISA. 2022; 11(4): 640-6. Doi: <https://doi.org/10.36239/revisa.v11.n4.p640a646>

# REVISA

1. Universidade de Brasília. Faculdade de Ceilândia. Ceilândia, Distrito Federal, Brasil.  
<https://orcid.org/0000-0001-9302-2222>
2. Universidade de Brasília. Faculdade de Ceilândia. Ceilândia, Distrito Federal, Brasil.  
<https://orcid.org/0000-0002-1131-6268>
3. Universidade de Brasília. Faculdade de Ceilândia. Ceilândia, Distrito Federal, Brasil.  
<https://orcid.org/0000-0002-5869-0281>
4. Universidade de Brasília. Faculdade de Ceilândia. Ceilândia, Distrito Federal, Brasil.  
<https://orcid.org/0000-0003-4513-489X>
5. Universidade de Brasília. Faculdade de Ceilândia. Ceilândia, Distrito Federal, Brasil.  
<https://orcid.org/0000-0001-6662-7138>
6. Universidade de Brasília. Faculdade de Ceilândia. Ceilândia, Distrito Federal, Brasil.  
<https://orcid.org/0000-0002-9335-999X>
7. Universidade de Brasília. Faculdade de Ceilândia. Ceilândia, Distrito Federal, Brasil.  
<https://orcid.org/0000-0002-9332-9029>
8. Universidade de Brasília. Faculdade de Ceilândia. Ceilândia, Distrito Federal, Brasil.  
<https://orcid.org/0000-0002-6836-3583>

Recebido: 18/07/2022  
Aprovado: 17/09/2022

#### RESUMO

**Objetivo:** O presente estudo analisou se a presença do polimorfismo VNTR localizado no íntron 4 do gene NOS3 na região codante difere nos pacientes com Síndrome Metabólica e portadores de Hipertensão Arterial e/ou Diabetes Mellitus dos controles normotensos. **Método:** Neste estudo caso-controle, foi executada a técnica de PCR para identificar a presença dos genótipos em 94 pacientes idosos residentes do Distrito Federal. As associações com as manifestações clínicas foram feitas no programa SPSS. Foi analisada a probabilidade de equilíbrio de Hardy-Weinberg e Odds Ratio, considerando um intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5%. **Resultados:** Verificou-se que das 94 pacientes, 71 evidenciaram a presença de hipertensão e 23 a ausência da doença, o valor de p obtido foi de 0,218. Em relação a Diabetes Mellitus, 49 idosos possuem o problema e 45 não possuem, o valor de p obtido foi de 0,372. **Conclusão:** Não há associação entre os genótipos do polimorfismo do gene NOS3, e a manifestação de Hipertensão Arterial e Diabetes Mellitus em idosos portadoras da SM. **Descritores:** Síndrome Metabólica; Diabetes Mellitus; Hipertensão Arterial Sistêmica; NOS3; Polimorfismo genético.

#### ABSTRACT

**Objective:** The present study analyzed whether the presence of VNTR polymorphism located in intron 4 of the NOS3 gene in the codante region differs in patients with Metabolic Syndrome and patients with Hypertension and/or Diabetes Mellitus from normotensive controls. **Method:** In this case-control study, the PCR technique was performed to identify the presence of genotypes in 94 elderly patients living in the Federal District. Associations with clinical manifestations were made in the SPSS program. The probability of Hardy-Weinberg equilibrium and Odds Ratio was analyzed, considering a confidence interval of 95% and significance level of 5%. **Results:** we found that of the 94 patients, 71 showed the presence of hypertension and 23 the absence of the disease, the p-value obtained was 0.218. Regarding Diabetes Mellitus, 49 old women have the problem and 45 do not have the p value obtained was 0.372. **Conclusion:** There is no association between nos3 gene polymorphism genotypes, and the manifestation of Arterial Hypertension and Diabetes Mellitus in elderly patients with MS. **Descriptors:** Metabolic Syndrome; Diabetes Mellitus; Systemic Arterial Hypertension; NOS3; Genetic polymorphism.

#### RESUMEN

**Objetivo** El presente estudio analizó si la presencia de polimorfismo VNTR localizado en el intrón 4 del gen NOS3 en la región codante difiere en pacientes con Síndrome Metabólico y pacientes con Hipertensión y/o Diabetes Mellitus de controles normotensos. **Método:** En este estudio de casos y controles, se realizó la técnica de PCR para identificar la presencia de genotipos en 94 pacientes ancianos residentes en el Distrito Federal. Las asociaciones con manifestaciones clínicas se realizaron en el programa SPSS. Se analizó la probabilidad de equilibrio de Hardy-Weinberg y Odds Ratio, considerando un intervalo de confianza del 95% y un nivel de significancia del 5%. **Resultados:** Se encontró que de los 94 pacientes, 71 mostraron la presencia de hipertensión arterial y 23 la ausencia de la enfermedad, el valor de p obtenido fue de 0,218. En cuanto a la Diabetes Mellitus, 49 ancianas tienen el problema y 45 no tienen el valor de p obtenido fue de 0,372. **Conclusión:** No existe asociación entre los genotipos de polimorfismo del gen nos3 y la manifestación de Hipertensión Arterial y Diabetes Mellitus en pacientes ancianos con SM. **Descritores:** Síndrome metabólico; Diabetes mellitus; Hipertensión Arterial Sistémica; NOS3; Polimorfismo genético.

## Introdução

A Síndrome Metabólica (SM) tem como uma de suas características a presença de obesidade visceral, dislipidemia e hipertensão arterial. Desse modo, há associação da patologia no aumento do risco de doenças cardiovasculares e de desenvolvimento de Diabetes Mellitus 2. A prevalência da SM não é exata, pois há muita variação de acordo com a população estudada (sexo, idade, raça e etnia). A etiopatogenia da SM é controversa. Porém, evidências sugerem que as principais causas que levam a manifestação desses fatores são a resistência à insulina e a obesidade visceral, motivo pelo qual o tratamento da obesidade é considerado primordial para os indivíduos que portam essa doença.<sup>1</sup>

Uma revisão sistemática feita por Fogal, Ribeiro, Priori e Franceschini (2014), revelou que na maioria dos estudos que mostravam dados separados por sexo, as mulheres apresentavam maior prevalência da síndrome metabólica em relação aos homens. Isso acontece por conta das possíveis alterações metabólicas e hormonais sofridas, principalmente no período da menopausa. Quando se baseava na idade, a prevalência aumentava em conjunto com o tempo de vida.<sup>2</sup>

O uso de indicadores clínicos e antropométricos pode ajudar na identificação da SM. Exemplos de indicadores clínicos são: O produto da acumulação lipídica (PAL) e o índice de adiposidade visceral (IAV). E um exemplo bem conhecido de indicador antropométrico é o índice de massa corporal (IMC). O uso de indicadores para detectar a SM pode facilitar o processo na prática clínica, por ser simples, rápido e funcional.<sup>3</sup>

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é o principal fator de risco para a mortalidade, portanto o controle adequado se faz extremamente necessário, embora a tecnologia e a ciência estejam em constante evolução<sup>4</sup>. Esse controle apropriado da HAS é definido pelos níveis de pressão sistólica e diastólica  $\leq 120$  mmHg e  $\leq 80$  mmHg.<sup>5</sup>

Por ser considerada, ao mesmo tempo, uma doença e um fator de risco, por estar diretamente relacionada à doença arterial coronariana e acidente vascular encefálico, essa doença representa um grande desafio para a saúde pública, pois as doenças cardiovasculares são a primeira causa de morte no Brasil. A detecção e o tratamento da HAS são essenciais para a redução das causas cardiovasculares.<sup>6</sup> Sua prevalência no Brasil varia entre 22% e 44% para adultos, aumentando para 50% para as pessoas entre 60 a 69 anos e 75% para quem possui mais de 70 anos.<sup>7</sup>

O Diabetes Mellitus (DM) afeta mais de 382 milhões de pessoas no mundo, sendo 11,9 milhões de nacionalidade brasileira. Em pessoas com mais de 65 anos de idade, esse número aumenta, configurando-se como uma das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) mais comuns em idosos. O DM acontece devido a distúrbios no metabolismo da glicose resultando em hiperglicemia. Podem provocar complicações que levam a disfunções e/ou insuficiências cardíacas e vasculares. Com o objetivo evitar os agravos dessa enfermidade, se faz necessário a revisão dos hábitos alimentares, a prática de atividades físicas, consultar periodicamente profissionais de saúde e utilizar medicamentos adequados.<sup>8</sup>

O gene da sintase do óxido nítrico endotelial (NOS3) está localizado no cromossomo 7q 35-36 e compreende 26 éxons, englobando 26kb e codificando um mRNA de 4052 nucleotídeos. Pesquisas apresentam uma associação positiva

da manifestação da NOS3 em pacientes com insuficiência cardíaca e evidenciam que um nível aumentado da produção de óxido nítrico pode ser um componente significativo na doença.<sup>9</sup>

A NOS3 é uma enzima que se expressa principalmente no endotélio celular, e é responsável pela biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) a níveis endoteliais. O NO é uma substância que possui uma importante contribuição na regulação vascular.<sup>10</sup> É responsável pelo relaxamento dos músculos, supressão da adesão plaquetária e leucocitária no endotélio, na eliminação de radicais superóxido além de limitar a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, levando a um efeito vasoprotetor.<sup>11</sup>

O VNTR localizado no íntron 4 do NOS3 está intimamente associado com a concentração de óxido nítrico no plasma. Tal polimorfismo possui uma sequência de 27 pares de base, onde há um alelo maior e outro menor. O alelo maior "a" possui 5 repetições *in tandem* de 27 pares de base, enquanto o alelo menor "b" possui 4 repetições.

O presente trabalho tem como objetivo investigar o perfil genético e se o polimorfismo do gene NOS3 na região codante difere nos pacientes com síndrome metabólica e/ou portadores de hipertensão arterial e diabetes dos controles normotensos.

## Método

As amostras utilizadas provieram de 94 idosas com idade igual ou superior a 60 anos que residem no Distrito Federal (Brasil) e que fazem parte de uma equipe de Estratégia em Saúde da Família (ESF) das Unidades Básicas de Saúde (UBS) número 06 e 08 de Ceilândia.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi entregue para todas as participantes da pesquisa. A coleta de dados ocorreu após a aprovação do comitê de ética FEPECS/SESDF sob o parecer nº 1.355;211.

O DNA foi extraído de sangue periférico com uso do kit *Invisorb Spin Blood Mini Kit (250)* da empresa Invitex. A concentração do DNA obtido foi estimada pelo espectrofotômetro NANODROP Technologies Inc., Wilmington, DE, USA. A concentração média alcançada foi de 20 ng/ $\mu$ L. Além disso, foi realizada a técnica de PCR (Reação em cadeia da Polimerase) no termociclador TC-512. Essa técnica permite que uma região selecionada do genoma (gene NOS3, localização 7q36), seja amplificada milhões de vezes.

As sequências de oligonucleotídeos utilizadas para avaliar o polimorfismo se seguem na tabela abaixo:

**Tabela 1-** Sequência de Oligonucleotídeos.

Gene	Oligonucleotídeos
NOS3 íntron 4	<i>Forward</i> 5' AGG CCC TAT GGT AGT GCC TT 3'
	<i>Reverse</i> 5' TCT CTT AGT GCT GTG GTC AC 3'

Para a amplificação do gene NOS3 na região do íntron 4 foi realizada a desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos 60°C por 30 segundos e extensão 72°C por 1 minuto. Extensão final 72°C por 10 minutos, gerando fragmentos de DNA de 420 pb (alelo b) e/ou 323pb (alelo a).

Os produtos da PCR foram submetidos a uma corrida eletroforética em um gel de agarose a 3%, com brometo de etídio em uma potência de 100W por 20 minutos.

Em seguida, foi inserido o perfil genético dos indivíduos e suas manifestações clínicas no programa SPSS na versão 25.0, para analisar se existe uma associação entre o polimorfismo estudado e a síndrome metabólica em idosos. Foi adotado um nível de significância de 5% e foi utilizado o teste de Fisher e Qui-Quadrado.

## Resultados

A partir do programa SPSS, obteve-se o seguinte resultado: Das 71 idosas, que possuem hipertensão (Tabela 2), 9 (12,7%) possuem o genótipo A/A, 29 (40,8%) possuem o genótipo A/B e 33 (46,5 %) possuem o genótipo B/B. Quanto a ausência de hipertensão (23 idosas), nenhuma possui o genótipo A/A, 10 (43,5%) possuem o genótipo A/B e 13 (56,5%) possuem o genótipo B/B. O valor de p obtido foi de 0,192.

**Tabela 2** - Distribuição da frequência genotípica do polimorfismo NOS3 íntron 4 e manifestação de Hipertensão Arterial.

		Hipertensão Arterial				p
		Sim		Não		
		n	%	n	%	
NOS3 27-	A/A	9	12,7%	0	0,0%	0,192
pb-	A/B	29	40,8%	10	43,5%	
VNTR	B/B	33	46,5%	13	56,5%	
	Total	71	100%	23	100%	

Quando se analisa a diabetes mellitus (Tabela 3), Das 49 idosas que possuem a doença, 5 (10,2%) possuem o genótipo A/A, 17 (34,7%) possuem o genótipo A/B e 27 (55,1%) possuem o genótipo B/B. Quanto a ausência de diabetes (45 idosas), 4 (8,9%) possuem o genótipo A/A, 22 (48,9%) possuem o genótipo A/B e 19 (42,2%) possuem o genótipo B/B. Obteve-se um valor de p de 0,372.

**Tabela 3** - Distribuição da frequência genotípica do polimorfismo NOS3 íntron 4 e manifestação de Diabetes Mellitus.

		Diabetes Mellitus				p
		Sim		Não		
		n	%	n	%	
NOS3 27-	A/A	5	10,2%	4	8,9%	0,372
pb-VNTR	A/B	17	34,7%	22	48,9%	
	B/B	27	55,1%	19	42,2%	
	Total	49	100%	45	100%	

Além desses resultados, também foi realizado a dicotomização (Tabela 4) da tabela de diabetes a fim de se saber qual seria o resultado do Odds Ratio, para fins de proteção ou risco. Portanto, o resultado desta dicotomização foi: Quanto a presença de diabetes mellitus, 5 (10,2%) possuem o genótipo A/A, e 44 (89,8%) possuem os genótipos A/B ou B/B. Em relação à ausência da enfermidade, 4 (8,9%) Possuem o genótipo A/A e 41 (91,1%) possuem os genótipos A/B ou B/B. O resultado do Odds Ratio obtido foi de 0,8 e o Intervalo de Confiança foi de 0,215 a 3,419.

**Tabela 4** - Dicotomização da frequência genotípica do polimorfismo NOS3 íntron 4 e manifestação de Diabetes Mellitus.

		Diabetes Mellitus				p	OR	IC
		Sim		Não				
		n	%	n	%			
NOS3 27-pb- VNTR	A/A	5	10,2%	4	8,9%	0,999	0,8	(0,215 - 3,419)
	A/B + B/B	44	89,8%	41	91,1%			
	Total	49	100,0%	45	100,0%			

## Discussão

Em um estudo de meta análise de Chen, Wang, Liang, Yu e Yang (2016) sobre hipertensão pulmonar (HP), seis estudos foram pesquisados, incluindo 198 pessoas que possuem a doença e 250 controles. Uma grande sensibilidade ao risco de desenvolver HP foi encontrada em indivíduos que possuíam o genótipo 4a/a comparados aos portadores dos outros genótipos. Os homocigotos possuem um risco 2,5 vezes maior relacionado aos seus homólogos.<sup>13</sup>

Outra meta análise realizada, de Zeng, Zhu, Wong, Yang, Tang, Li, et al. (2016) sobre a pré-eclâmpsia, para o polimorfismo VNTR, O Odds Ratio obtido em três associações (bb vs aa, ab vs aa e bb vs ab), sugere que não há associação entre o risco de desenvolver a pré-eclâmpsia e a presença do polimorfismo VNTR 4b/a.<sup>14</sup>

Na pesquisa de Shankarishan, Borah, Ahmed e Mahanta (2014) que diz sobre os polimorfismos da oxido nítrico sintase endotelial e o risco de hipertensão em uma população indiana, utilizando a regressão logística univariada, o genótipo 4a/a foi associado ao aumento do risco de hipertensão. No modelo multivariado de regressão logística (quando se tem o ajuste para idade, sexo, ingestão extra de sal, tabagismo, mascar tabaco e hábito de consumo de álcool), o risco persistiu e o genótipo 4a/b também mostrou associação.<sup>15</sup> Ao contrário do presente estudo, que não houve associação entre o polimorfismo e a manifestação de hipertensão em idosas com síndrome metabólica.

Em relação a diabetes, o estudo de Bregar, Cilenšek, Mankoc, Reschner e Petrovi (2017) com eslovenos que possuem diabetes mellitus tipo 2 e retinopatia diabética, o genótipo homocigoto 4a/a mostrou uma associação com a ocorrência de retinopatia diabética (DR) em indivíduos que possuem diabetes mellitus tipo 2. As pessoas que possuíam genótipo 4a/a (modelo co-dominante) e 4a/b (modelo co-dominante), obtiveram um risco maior de DR quando comparados aos portadores do genótipo 4b/b (tipo selvagem)<sup>16</sup>. O presente estudo não mostrou associação entre o polimorfismo e a manifestação de diabetes mellitus em idosas com síndrome metabólica.

## Conclusão

Conclui-se, portanto, que não há diferença estatística entre os grupos diabetes e hipertensão arterial sistêmica nas pacientes diagnosticadas com síndrome metabólica. Durante a realização deste trabalho, encontrar artigos na literatura sobre o assunto discutido, se mostrou uma tarefa difícil.

Logo, a necessidade da pesquisa e dos estudos se torna muito importante, pois as enfermidades analisadas são muito frequentes na população, sobretudo em idosos. É fundamental a elaboração de mais projetos de pesquisa referentes a essas doenças, visto que, a sociedade tende a ficar mais envelhecida com o passar dos anos.

## Agradecimento

Este trabalho foi elaborado e realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## Referências

1. Nora C, Morais T, Nora M, Coutinho J, do Carmo I, Monteiro MP. Gastrectomia vertical e bypass gástrico no tratamento da síndrome metabólica. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*. 2016 Janeiro; 11(1): 23-9.
2. Fogal AS, Ribeiro AQ, Priori SE, Franceschini SCC. Prevalência de síndrome metabólica em idosos: uma revisão sistemática. *Rasbran - Revista da Associação Brasileira de Nutrição*. 2014; 1(6):29-35.
3. de Oliveira CC, da Costa ED, Roriz AKC, Ramos LB, Gomes Neto M. Preditores de Síndrome Metabólica em Idosos: Uma Revisão. *International Journal of Cardiovascular Sciences*. 2017; 343-53.
4. Firmo JOA, de Melo Mambrini JV, Peixoto SV, de Loyola Filho AI, de Souza Junior PRB, de Andrade FB, et al. Controle da hipertensão arterial entre adultos mais velhos. *Revista de Saúde Pública*. 2018 Abril; 1 - 11.
5. Malachias MVB. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial: Capítulo 2 - Diagnóstico e Classificação. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 107(3): 7-13.
6. Freitas JGA, de Oliveira Nielson SE, Porto CC. Adesão ao tratamento farmacológico em idosos hipertensos: uma revisão integrativa da literatura. *Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica*. 2015 Janeiro; p. 75 - 84.
7. Oliveira MSN, Almeida GBS, de Nazaré Pereira Chagas D, Salazar PR, Ferreira LV. Autocuidado de idosos diagnosticados com hipertensão arterial e/ou diabetes mellitus. *Revista de Enfermagem da Universidade Federal de Santa Maria*. 2017 Julho; p. 490 - 503.
8. Costa SS, Rosales RA, de Ávila JA, Pelzer MT, Lange C. Adesão de idosos com diabetes mellitus à terapêutica: revisão integrativa. *Cogitare Enfermagem*. 2017 Junho; 22(3): 1 - 10.
9. Matsa LS, Rangaraju A, Vengaldas V, Latifi M, Jahromi HM, Ananthapur V, et al. Haplotypes of NOS3 Gene Polymorphisms in Dilated Cardiomyopathy. *Plos One*. 2013 Julho; 8(7) p. 1 - 5.

Possatti I, Garcia CM, Paula GR, Teixeira MS, Gontijo BR, Duarte LCAC, et al.

10. Vecoli C. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms in Cardiovascular Disease. *Vitamins & Hormones*. 2014; p. 387 - 406.

11. Rai H, Parveen F, Kumar S, Kapoor A, Sinha N. Association of Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms with Coronary Artery Disease: An Updated Meta-Analysis and Systematic Review. *Plos One*. 2014 Novembro; 9(11):1 - 19.

12. Özçelik AT, Demirdögen BC, Şeref Demirkaya, Adalı O. Importance of NOS3 Genetic Polymorphisms in the Risk of Development of Ischemic Stroke in the Turkish Population. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 2014 Dezembro; p. 797 - 803.

13. Chen Q, Wang H, Xiao D, Liang T, Yu J, Yang J. Association between eNOS 4b/a polymorphism and susceptibility of pulmonary hypertension: a meta-analysis of 6 studies. *International Journal Of Clinical And Experimental Medicine*. 2016 Agosto; p. 1 - 8.

14. Zeng F, Zhu S, Wong MC, Yang Z, Tang J, Li K, et al. Associations between nitric oxide synthase 3 gene polymorphisms and preeclampsia risk: a meta-analysis. *Scientific Reports*. 2016 Março; 6(1):1 - 10.

15. Shankarishan P, Borah PK, Ahmed G, Mahanta J. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms and the Risk of Hypertension in an Indian Population. *BioMed Research International*. 2014 Agosto; p. 1 - 12

16. Bregar D, Cilenšek I, Mankoc S, Reschner A, Petrovič D, Petrovič MG. The joint effect of the endothelin receptor B gene (EDNRB) polymorphism rs10507875 and nitric oxide synthase 3 gene (NOS3) polymorphism rs869109213 in Slovenian patients with type 2 diabetes mellitus and diabetic retinopathy. *Bosnian Journal Of Basic Medical Sciences*. 2017 Agosto;80 - 86.

**Autor de correspondência**

Izabel Cristina Rodrigues da Silva.  
Campus Universitário, s/n, Centro Metropolitano.  
CEP: 72220-275. Brasília, Distrito Federal, Brasil.  
[belbiomedica@gmail.com](mailto:belbiomedica@gmail.com)