

CARLOS HENRIQUE GROSSI SPONTON

**PAPEL DO POLIMORFISMO DA POSIÇÃO -786T>C DO GENE DA SINTASE DO  
ÓXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL (eNOS) NA RESPOSTA PRESSÓRICA EM  
MULHERES NO CLIMATÉRIO: EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO**

Dissertação apresentada ao instituto de Biociências do  
Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista  
Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em Ciências da Motricidade  
(Biodinâmica da Motricidade Humana).

Orientador: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Angelina ZanESCO

Rio Claro

2010

CARLOS HENRIQUE GROSSI SPONTON

**PAPEL DO POLIMORFISMO DA POSIÇÃO -786T>C DO GENE DA SINTASE DO  
ÓXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL (eNOS) NA RESPOSTA PRESSÓRICA EM  
MULHERES NO CLIMATÉRIO: EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO**

Dissertação apresentada ao instituto de Biociências do  
Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista  
Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em Ciências da Motricidade  
(Biodinâmica da Motricidade Humana).

Comissão Examinadora

---

---

---

Rio Claro, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

“DEDICO ESTE TRABALHO A MINHA FAMÍLIA PELO APOIO INCONDICIONAL  
EM TODOS OS MOMENTOS”

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me proporcionar saúde e força para finalizar este trabalho.

Ao meu grande amor (Amanda) por toda a dedicação, carinho, alegria compreensão e companhia.

Aos meus pais (Paulo e Rosa) e irmãos (Daniele, Fabiane e Adriano) por toda ajuda, compreensão e amizade durante esta jornada.

Aos velhos amigos por todos os momentos de descontração e alegria durante todos esses anos.

Aos amigos do laboratório e da pós graduação que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos amigos do Hemocentro, Unicamp por proporcionarem o conhecimento e as condições para as análises genéticas.

Ao CNPq por proporcionar as condições financeiras para todo este período

Por fim, um agradecimento especial a Profa Dra Angelina ZanESCO por confiar no meu trabalho e proporcionar a grande oportunidade da minha vida

*“Nunca fiz nada dar certo por acidente; nem nenhuma das minhas invenções surgiram por acidente; elas vieram do meu trabalho”*

Thomas A. Edison

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar a influência do polimorfismo da posição -786T>C do gene da eNOS sobre as respostas pressóricas e as concentrações plasmáticas de nitrito/nitrato em mulheres no climatério normotensas e hipertensas submetidas ao exercício físico aeróbio por 6 meses. Vinte e oito voluntárias normotensas e vinte e oito voluntárias hipertensas idade  $51\pm 4$  e  $59\pm 2$  anos respectivamente participaram deste estudo. Os parâmetros antropométricos (peso corporal, índice de massa corporal - IMC e circunferência abdominal - CA) cardiovasculares (consumo máximo de oxigênio -  $VO_{2max}$ , pressão arterial sistólica - PAS, pressão arterial diastólica - PAD e frequência cardíaca - FC) e bioquímicos (concentrações de nitrito/nitrato -  $NOX^-$ ) foram analisados no início e após 6 meses de treinamento físico aeróbio. Além disso, também foi realizada a análise do polimorfismo para a posição -786T>C do gene da eNOS. O programa de treinamento físico aeróbio foi realizado com frequência de 3 vezes por semana, duração de 30-40 minutos, intensidade entre 50% a 70% da frequência cardíaca de reserva por um período de 6 meses. Para as análises sem divisão pelo genótipo para a posição -786T>C do gene da eNOS, não foram observadas diferenças significativas tanto para as normotensas quanto para hipertensas em relação ao peso corporal, IMC, CA e  $VO_{2max}$ . Por outro lado, foram observadas diferenças significativas para a PAS, PAD e  $NOX^-$ . Quanto a divisão genotípica para a posição -786T>C, em relação as voluntárias normotensas, observou-se para o grupo não polimórfico (TT) alterações significativas para a PAS, PAD e  $NOX^-$ . Já para as voluntárias polimórficas (TC+CC), não observou-se alteração significativa da PAS, porém, verificou-se alteração significativa para a PAD e  $NOX^-$ . Em relação as voluntárias hipertensas, não observou-se alteração significativa em relação a PAS tanto para o grupo TT quanto para o grupo TC+CC. Por outro lado, para a PAD e  $NOX^-$  verificaram-se alterações estatisticamente significativas tanto para o grupo TT quanto para o grupo TC+CC. O polimorfismo para a posição -786T>C do gene da eNOS minimiza os efeitos benéficos do treinamento físico aeróbio sobre a redução da pressão arterial e incremento das concentrações de  $NOX^-$  em mulheres no climatério.

**Palavras Chave:** Polimorfismo. Pressão arterial. Treinamento Físico. Climatério.

## ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the influence of eNOS gene polymorphism at -786T>C position on blood pressure responses and plasma concentrations of nitrite/nitrate in climacteric normotensive and hypertensive women submitted to aerobic physical exercise for six months. Twenty-eight normotensive volunteers and twenty-eight hypertensive volunteers age  $51 \pm 4$  and  $59 \pm 2$  years respectively were eligible to this study. Anthropometric parameters (body weight, body mass index - BMI and waist circumference - WC) cardiovascular parameters (maximum oxygen uptake - VO<sub>2</sub>max, systolic blood pressure - SBP, diastolic blood pressure - DBP and heart rate - HR) and biochemical (nitrite / nitrate concentration - NOX<sup>-</sup>) were measured at baseline and after 6 months of aerobic exercise. In addition, the analysis of eNOS gene polymorphism at -786T>C position was accomplished. The program of aerobic exercise was conducted with frequency of three times a week, duration 30-40 minutes, intensity from 50% to 70% heart rate reserve for a period of six months. For analysis without division by genotype for eNOS gene polymorphism at -786T>C position, no significant differences were observed for both normotensive and hypertensive in relationship to body weight, BMI, and VO<sub>2</sub>max. Moreover, significant differences were observed for SBP, DBP, and NOX<sup>-</sup>. As the division to eNOS gene polymorphism at -786T>C position, compared to normotensive volunteers, we observed for the group non-polymorphic (TT) significant changes in SBP, DBP and NOX<sup>-</sup>. As for the volunteers polymorphic (TC + CC), there was no significant change in SBP, however, there was significant change in the DBP and NOX<sup>-</sup>. Regarding the volunteers with hypertension, there was no significant change in relationship to SBP for both the TT group and for the TC + CC group. Moreover, for DBP and NOX<sup>-</sup> there were significant changes to both the TT group and for the TC + CC group. The polymorphism for position-786T>C in the eNOS gene reduces the beneficial effects of aerobic exercise on reducing blood pressure and increase the concentration of NOX<sup>-</sup> in climacteric women

**Keywords:** Polymorphism. Blood Pressure. Exercise Training. Climacteric.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Classificação da Pressão Arterial segundo a Sociedade Brasileira de Hipertensão – V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2006.....	18
<b>Figura 2.</b> Prevalência da Hipertensão Arterial Sistêmica segundo o American Heart Association, 2010 .....	19
<b>Figura 3.</b> Formação do óxido nítrico (NO) através da catalisação da enzima sintase do óxido nítrico (NOS) .....	20
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de ação do óxido nítrico e relaxamento do músculo liso vascular .....	22
<b>Figura 5.</b> Região promotora do gene da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS), o RNAm e a enzima eNOS .....	23
<b>Figura 6.</b> Fatores reguladores da expressão gênica e atividade da eNOS, assim como da biodisponibilidade do NO.....	25
<b>Figura 7.</b> Polimorfismos do gene da eNOS .....	28
<b>Figura 8.</b> Percepção Subjetiva de Esforço .....	40
<b>Figura 9.</b> Sequência Genotípica da Posição -786T>C do gene da eNOS .....	44
<b>Figura 10.</b> Produto da amplificação (PCR) do gene da eNOS para a posição -786T>C.....	44
<b>Figura 11.</b> Produto da Digestão para a posição -786T>C do gene da eNOS .....	45
<b>Figura 12.</b> Valores de peso corporal, índice de massa corporal (IMC) e circunferência abdominal (CA) de voluntárias normotensas e hipertensas no início e após treinamento físico aeróbio por 6 meses .....	48



<b>Figura 13.</b> Valores da pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) do grupo de voluntárias normotensas e hipertensas no início e após um programa de treinamento físico aeróbio por 6 meses .....	50
<b>Figura 14.</b> Concentração plasmática de NOX <sup>-</sup> de voluntárias normotensas e hipertensas no início e após treinamento físico aeróbio por 6 meses .....	52
<b>Figura 15.</b> Frequência Cardíaca (FC), consumo máximo de oxigênio do teste de 1milha (1milha), Tempo de Execução do Teste de 1 milha (1milha tempo), Percepção Subjetiva de Esforço do teste de 1milha (1milha borg) e consumo máximo do teste de Astrand (Astrand) do grupo de voluntárias normotensas e hipertensas no início e após um programa de treinamento físico aeróbio de 6 meses.....	54
<b>Figura 16.</b> Percentual de medicamentos anti-hipertensivos utilizados pelas voluntárias hipertensas .....	56
<b>Figura 17.</b> PAS e PAD do grupo de voluntárias normotensas subdivididas em relação ao genótipo para a posição -786T>C do gene da eNOS no início e após um programa de treinamento físico aeróbio de 6 meses.....	59
<b>Figura 18.</b> PAS e PAD do grupo de voluntárias hipertensas subdivididas em relação ao genótipo para a posição -786T>C do gene da eNOS no início e após um programa de treinamento físico aeróbio de 6 meses.....	60
<b>Figura 19.</b> Concentração plasmática de NOX <sup>-</sup> do grupo de voluntárias normotensas e hipertensas subdivididas em relação ao genótipo para a posição -786T>C do gene da eNOS no início e após um programa de treinamento físico aeróbio de 6 meses .....	63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Produtos utilizados para a PCR .....	43
<b>Tabela 2.</b> Condições da reação de PCR para o polimorfismo -786T>C do gene da eNOS .....	43
<b>Tabela 3.</b> Primers utilizados para a PCR .....	44
<b>Tabela 4.</b> Valores de peso corporal, IMC e CA de voluntárias normotensas e hipertensas no início (Início T) e após (Após T) um programa de treinamento físico aeróbio por 6 meses.....	47
<b>Tabela 5.</b> Valores de PAS e PAD para o grupo de voluntárias normotensas e hipertensas no Início T e Após T 6 meses de treinamento aeróbio .....	49
<b>Tabela 6.</b> Valores da concentração plasmática de NOX <sup>-</sup> em voluntárias normotensas e hipertensas no Início T e Após T 6 meses de treinamento aeróbio .....	51
<b>Tabela 7.</b> Valores de frequência Cardíaca (FC), consumo máximo de oxigênio teste de 1 milha (1milha), consumo máximo de oxigênio teste de Astrand (Astrand), Tempo de execução do teste de 1 milha (VO2 max T) e Percepção Subjetiva de Esforço (VO2 borg) durante o teste de VO2 max para as voluntárias normotensas e hipertensas no início (Início T) e após (Após T) treinamento físico aeróbio por 6 meses .....	53
<b>Tabela 8.</b> Divisão genotípica para a posição -786T>C e porcentagem de voluntárias normotensas e hipertensas de acordo com a presença ou ausência do polimorfismo do gene da eNOS na posição -786T>C.....	57
<b>Tabela 9.</b> Valores de PAS, PAD e concentrações plasmáticas de NOX <sup>-</sup> em mulheres normotensas e hipertensas, subdivididas em relação ao genótipo para a posição -786T>C do gene da eNOS, no início (Início T) e após (Após T) treinamento físico aeróbio de 6 meses com ou sem polimorfismo para o gene da eNOS para a posição -786T>C .....	58

**Tabela 10.** Valores das concentrações plasmáticas de nitrito/nitrato (NOX<sup>-</sup>) em mulheres normotensas e hipertensas subdivididas em relação ao genótipo para a posição -786T>C do gene da eNOS no início (Início T) e após (Após T) treinamento físico aeróbio de 6 meses ..... 62

**Tabela 11.** Resumo dos resultados sem divisão genotípica para o polimorfismo da posição -786T>C do gene da eNOS para o grupo de voluntárias normotensas (NT) e hipertensas (HT) em resposta ao treinamento físico aeróbio realizado por 6 meses..... 64

**Tabela 12.** Resumo dos resultados com divisão genotípica para o polimorfismo da posição -786T>C do gene da eNOS para o grupo de voluntárias normotensas (NT) e hipertensas (HT) em resposta ao treinamento físico aeróbio realizado por 6 meses..... 64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADMA:** Dimetil arginina assimétrica
- AGEs:** Produtos avançados de glicosilação
- Akt:** Proteína quinase B
- AMPK:** Proteína quinase ativada por AMP
- APJ:** Receptor da apelina
- AT1:** Receptor da angiotensina II
- AVE:** Acidente vascular encefálico
- B2:** Receptor de bradicinina
- BH<sub>4</sub>:** Tetrahydrobiopterina
- C-terminal:** Domínio redutase C-terminal
- Ca<sup>2+</sup>/CaM:** complexo cálcio calmodulina
- CAT:** Catalase
- CAV-1:** Caveolina-1
- DAC:** Doença arterial coronariana
- ECA:** Enzima conversora de angiotensina
- EDHF:** Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
- eNOS:** Sintase do óxido nítrico endotelial
- EROs:** Espécies Reativas de Oxigênio
- Et<sub>b</sub>:** Receptor da endotelina-1
- FAD:** Flavina adenina dinucleotídeo
- FGFb:** Fator de crescimento dos fibroblastos
- FMN:** Flavina mononucleotídeo
- GCs:** Guanilato ciclase solúvel
- GMPc:** monofosfato cíclico de guanosina
- GSH-Px:** Glutathione peroxidase
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrogênio
- HAS:** Hipertensão Arterial Sistêmica
- HCAEC:** Células endoteliais de coronária humana
- HSP:** Proteína de choque térmico
- IL1:** Interleucina 1
- iNOS:** Sintase do óxido nítrico induzível
- IP3:** Inositol 1,4,5 trifosfato

**K<sup>+</sup>**: Íons Potássio  
**LPS**: Lipopolissacarídeos bacterianos  
**MAP**: Proteína quinase ativada por mitógeno  
**NADPH**: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida  
**NF-kB**: Fator nuclear kappa B  
**nNOS**: Sintase do óxido nítrico neural  
**NO**: Óxido Nítrico  
**NOS**: Sintase do óxido nítrico  
**NOX**: Concentração plasmática de nitrito/nitrato  
**N-terminal**: Domínio oxigenase N-terminal  
**O<sub>2</sub><sup>-</sup>**: Ânion superóxido  
**OH<sup>•</sup>**: Radical Hidroxila  
**ONOO<sup>-</sup>**: Peroxinitrito  
**oxLDL**: LDL oxidado  
**PAD**: Pressão arterial diastólica  
**PAS**: Pressão arterial sistólica  
**PDGF**: Fator de crescimento derivado de plaquetas  
**PGH<sub>2</sub>**: Prostaglandina H<sub>2</sub>  
**PGI<sub>2</sub>**: Prostaciclina  
**PI3k**: Fosfatidilinositol -3 quinase  
**PKA**: Proteína quinase A  
**RNA<sub>m</sub>**: RNA mensageiro  
**SNP**: Polimorfismos de único nucleotídeo  
**SOD**: Superóxido Dismutase  
**TGFβ**: Fator transformador do crescimento  
**TXA<sub>2</sub>**: Tromboxano A<sub>2</sub>  
**VEGF**: Fator de crescimento vascular endotelial  
**VNTR**: Variável número de repetições em tandem

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	18
2.1 Hipertensão Arterial Sistêmica.....	18
2.2 Óxido Nítrico (NO) .....	19
2.3 Estrutura do Gene da eNOS.....	22
2.4 Expressão, Estabilidade e Atividade da eNOS .....	23
2.5 Biodisponibilidade do Óxido Nítrico .....	25
2.6 Mutações Genéticas e os Polimorfismos .....	26
2.7 Polimorfismos do Gene da eNOS.....	27
2.8 Polimorfismos do Gene da eNOS e as Doenças Cardiovasculares .....	28
2.9 Polimorfismos da Região Promotora posição -786T>C.....	30
2.10 Climatério .....	30
2.11 Exercício Físico e a Pressão Arterial .....	32
2.12 Polimorfismos da eNOS e Atividade Física .....	34
3.OBJETIVO .....	35
4.METODOLOGIA.....	36
4.1 Participantes .....	36
4.2 Critérios de inclusão .....	36
4.3 Grupos Experimentais .....	36
4.4 Avaliação Antropométrica.....	37
4.5 Medida da frequência cardíaca de repouso (FC de repouso).....	37
4.6 Cálculo da FC de reserva.....	37
4.7 Consumo máximo de oxigênio (VO <sub>2</sub> máx) através do teste de 1 milha .....	38
4.8 Consumo máximo de oxigênio através do teste de Astrand .....	38
4.9 Percepção Subjetiva de Esforço .....	39
4.10 Medida da pressão arterial .....	40
4.11 Treinamento Físico Aeróbio .....	40
4.12 Coleta Sanguínea .....	41
4.13 Nitrito e NitratoReação (NOX) .....	41
4.14 Extração do DNA Genômico.....	41

4.15 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	42
4.16 Determinação do polimorfismo por análise de restrição (RFLP).....	45
4.17 Análise Estatística .....	46
5. RESULTADOS .....	47
5.1 Resultados Gerais sem Avaliação Genética .....	47
5.2 Resultados com Avaliação Genética .....	57
6.RESUMO DOS RESULTADOS.....	64
7.DISSCUSSÃO.....	65
8. CONCLUSÕES.....	67
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	68

## 1. INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos mostram aumento significativo na incidência de hipertensão arterial em mulheres no climatério, sendo seus valores similares aos dos homens quando comparados para este momento (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2010). Entretanto, os mecanismos celulares e/ou moleculares que desencadeiam o aumento da incidência da hipertensão arterial em mulheres nessa fase da vida ainda permanecem desconhecidos. Uma variedade de fatores parece contribuir para esta elevação, entre eles destacam-se deficiência de estrógenos, aumento do estresse oxidativo, disfunção endotelial, alterações no perfil lipídico e aumento no ganho de peso corporal (COYLEWRIGHT et al., 2008).

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma doença crônica e degenerativa de etiologia poligênica e multifatorial, caracterizada pela presença de níveis tensionais elevados, sendo considerada, um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento de outras doenças cardiovasculares (DCVs) (NEGRÃO & BARRETO, 2006).

Os polimorfismos são caracterizados por substituição, inserção ou mesmo deleção de únicos ou múltiplos nucleotídeos no DNA e podem ocorrer nas mais diversas regiões do genoma humano, como: regiões regulatórias (controle da atividade e expressão gênica); regiões codificantes (codificadoras de proteínas) regiões dos introns (separam regiões codificantes ou éxons em um gene) ou mesmo regiões inter-genes, sendo estes classificados como selvagens (*wild type*) quando apresentam uma sequência comum, ou, raro (*rare*) quando apresentam variância alélica rara (DALY & DAY, 2001; BALASUBRAMANIAN et al., 2004). Dentre estes polimorfismos, pode-se destacar o polimorfismo da região promotora (posição -786T>C) do gene da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS), pois trabalhos prévios mostraram que este polimorfismo está associado à menor expressão gênica, atividade enzimática e concentrações de NOX<sup>-</sup> (MIYAMOTO et al., 1998; CATTARUZZA et al., 2004), estando este polimorfismo associado ao desenvolvimento de DCVs, como a doença arterial coronariana, infarto do miocárdio e HAS (CASAS et al., 2006).

Por outro lado, a prática regular de exercício físico tem sido recomendada como terapia alternativa ou concomitante com a terapia farmacológica no tratamento da HAS (AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE, 2004). Dados experimentais mostram que a redução da pressão arterial após treinamento físico aeróbio é maior em indivíduos hipertensos quando comparado aos indivíduos normotensos, tanto em seres humanos quanto em modelo animal. A redução dos valores de pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) decorrente de atividade física varia de 18–20 mmHg ( $\Delta$ ) e de 7 – 9mmHg ( $\Delta$ ),



respectivamente, em humanos com hipertensão leve ou moderada. Em indivíduos normotensos, a redução é de 8–10 mmHg ( $\Delta$ ) para a pressão sistólica e de 3–5 mmHg ( $\Delta$ ) para a pressão diastólica (DUNCAN et al., 1985; KENNEY & SEALS, 1993; HAGBERG et al., 2003). Até o presente momento, poucos trabalhos buscaram avaliar a interação entre o treinamento físico aeróbio e os polimorfismos do gene da eNOS. Trabalho prévio mostrou que os indivíduos polimórficos para a posição -786T>C apresentavam melhor resposta hipotensora frente a uma sessão aguda de exercício físico aeróbio quando comparado aos seus pares não polimórficos (AUGERI et al., 2009). Por outro lado, outro estudo verificou que o treinamento físico aeróbio de 4 semanas não resultava em melhora na vasodilatação dependente do endotélio em indivíduos polimórficos para a posição -786T>C do gene da eNOS (ERBS et al., 2003). Dessa forma, além de escassos, os trabalhos apresentam resultados conflitantes quando se avalia a interação entre o exercício físico aeróbio e a presença de polimorfismo da posição -786T>C do gene da eNOS. Além disso, esses trabalhos foram realizados de forma aguda (uma única sessão de exercício físico) ou por um período curto de treinamento físico aeróbio (1 mês).

Assim, nossa hipótese inicial foi que mulheres hipertensas que apresentavam polimorfismo para o gene da eNOS para a posição -786T>C seriam refratárias a hipotensão após exercício físico ou teriam menor redução nos valores de pressão arterial quando comparadas àquelas sem polimorfismo. Portanto, o objetivo deste trabalho foi correlacionar a presença de polimorfismo no gene da eNOS na posição -786T>C e a resposta pressórica em mulheres normotensas e hipertensas em resposta ao exercício físico aeróbio por 6 meses e a concentração plasmática de NOX.

Este estudo apresenta grande relevância dentro da área de saúde pública, uma vez que associa os conhecimentos existentes na área de ciências básicas (endotélio e síntese de óxido nítrico) e ciências aplicadas (resposta de um programa de exercício físico para mulheres hipertensas e normotensas no climatério).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Hipertensão Arterial Sistêmica

A HAS é uma doença crônica degenerativa de etiologia multifatorial e poligênica, caracterizada pela presença de níveis tensionais elevados normalmente associados a alterações metabólicas, hormonais e fenômenos tróficos (hipertrofias cardíaca e vascular), sendo considerada um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento das DCVs. A HAS apresenta custos médios e socioeconômicos elevados, decorrentes principalmente de lesões em órgãos alvos tais como: coração, cérebro, vasos sanguíneos, rins e retina (NEGRÃO & BARRETO, 2006).

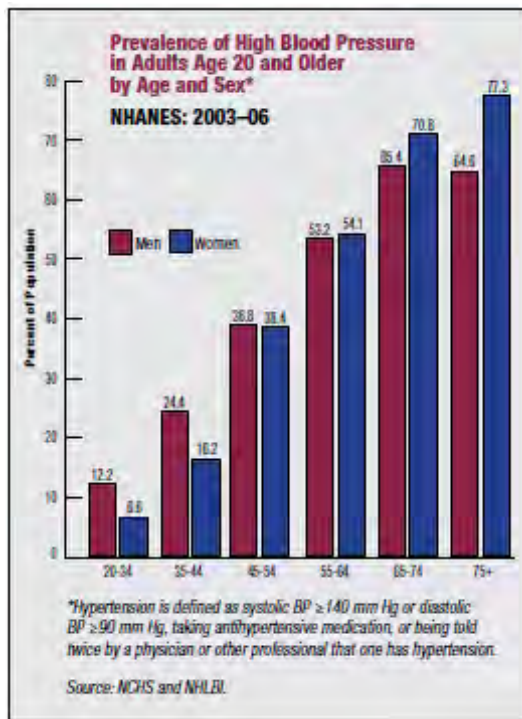
Segundo a V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (2006) a classificação da pressão arterial para indivíduos maiores de 18 anos é dada conforme a tabela que segue abaixo.

Classificação	Pressão sistólica (mmHg)	Pressão diastólica (mmHg)
Ótima	< 120	< 80
Normal	< 130	< 85
Limítrofe	130-139	85-89
Hipertensão estágio 1	140-159	90-99
Hipertensão estágio 2	160-179	100-109
Hipertensão estágio 3	≥ 180	≥ 110
Hipertensão sistólica isolada	≥ 140	< 90

*Quando as pressões sistólica e diastólica de um paciente situam-se em categorias diferentes, a maior deve ser utilizada para classificação da pressão arterial.*

**Figura 1.** Classificação da Pressão Arterial (SBH, 2006).

Estima-se que cerca de 1 bilhão de indivíduos apresentem HAS em todo mundo, sendo esta patologia responsável por aproximadamente 7,1 milhões de óbitos por ano (CHOBANIAN et al., 2003). Desses hipertensos, cerca de 50% estão entre a faixa etária de 60 e 69 anos e  $\frac{3}{4}$  destes, acima de 70 anos (DÓREA & LOTUFO, 2004). Segundo dados do American Heart Association (2010) a HAS atinge cerca de 74 milhões de pessoas nos EUA, sendo que uma em cada três pessoas adultas apresenta esta patologia. Os homens apresentam uma prevalência maior de HAS quando comparados às mulheres até os 45 anos de idade. Entretanto, após este período, as mulheres apresentam valores similares ou até maiores desta prevalência (veja figura 2 para detalhes). A maior prevalência da HAS representa um fator de risco independente, linear e contínuo para as DCVs (LEWINGTON, 2002).



**Figura 2.** Prevalência da Hipertensão Arterial Sistêmica segundo o American Heart Association, 2010.

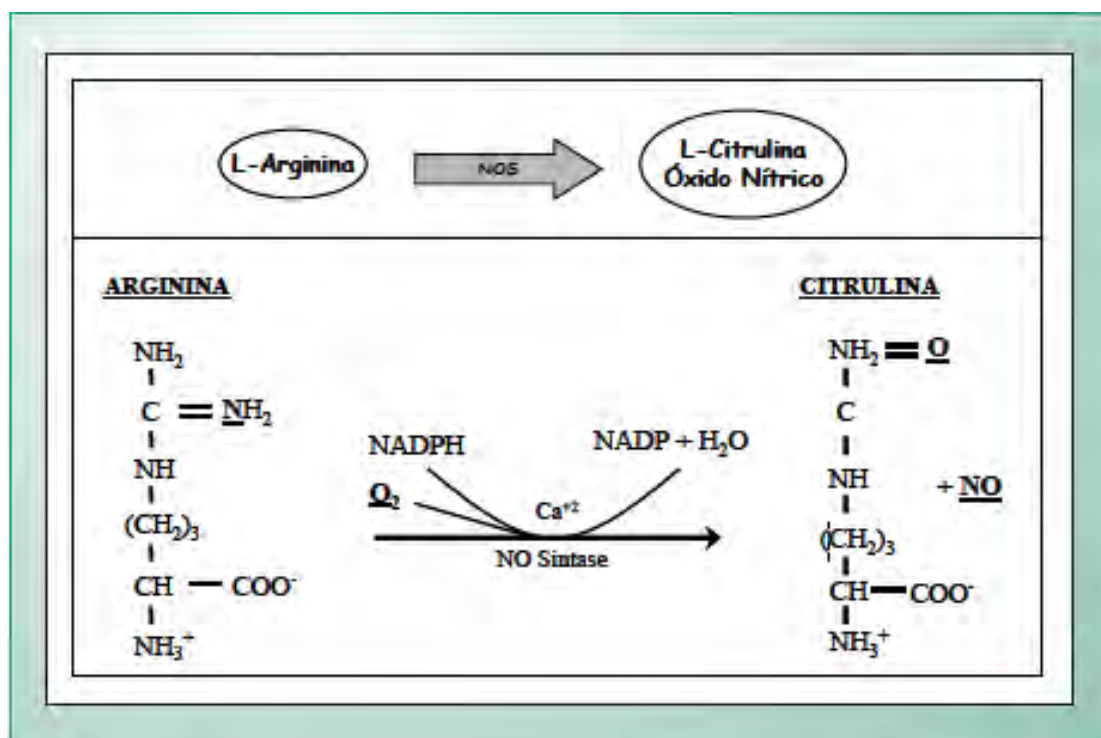
No Brasil, estudos realizados em algumas cidades mostram prevalência de HAS em torno de 22,3% a 43,9% da população, sendo esta considerada um dos principais fatores de risco de morbidade e mortalidade cardiovascular, representando alto custo social, uma vez que é responsável por cerca de 40% dos casos de aposentadoria precoce e absenteísmo no trabalho. (V DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2006).

Diversos fatores de risco estão associados ao desenvolvimento da HAS sendo os principais: obesidade, dislipidemias, ganho de peso, dieta rica em sal, alterações nos níveis hormonais e sedentarismo, especialmente entre as mulheres após a menopausa (SIMKIN-SILVERMAN et al., 1995, 2003; AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE, 2004; BLOCH et al., 2006). Particularmente, os indivíduos sedentários apresentam um risco aumentado de aproximadamente 30% maior para o desenvolvimento da HAS do que os indivíduos ativos (V DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2006).

## 2.2 Óxido Nítrico (NO)

Atualmente sabe-se que as células endoteliais são responsáveis pela síntese, pelo metabolismo e pela liberação de grande variedade de mediadores que regulam o tônus vascular, a permeabilidade vascular, o metabolismo de substâncias endógenas e exógenas, e a

atividade plaquetária e leucocitária (VANHOUTTE, 2003; ZANESCO & ANTUNES, 2005). As substâncias produzidas pelo endotélio podem ser divididas entre agentes vasodilatadores como: prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ), óxido nítrico (NO) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e agentes vasoconstritores como: endotelinas, prostaglandina  $\text{H}_2$  ( $\text{PGH}_2$ ), tromboxano  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ), e as espécies reativas de oxigênio (EROs). \_Dentre esta variedade de substâncias, o NO merece atenção especial devido ao seu papel no controle da pressão arterial, sendo um potente agente vasodilatador. Enzimas conhecidas como sintases do NO (NOS), as quais são divididas em dois grandes grupos, as isoformas constitutivas (eNOS-endotelial e nNOS-neuronal) e a isoforma induzível (iNOS). As NOS são capazes de catalisar a oxidação do nitrogênio terminal do grupamento guanidino da L-arginina formando NO e L-citrulina (**Figura 3**).



**Figura 3.** Formação do NO através da catalisação da enzima NOS de Zago & ZanESCO (2006).

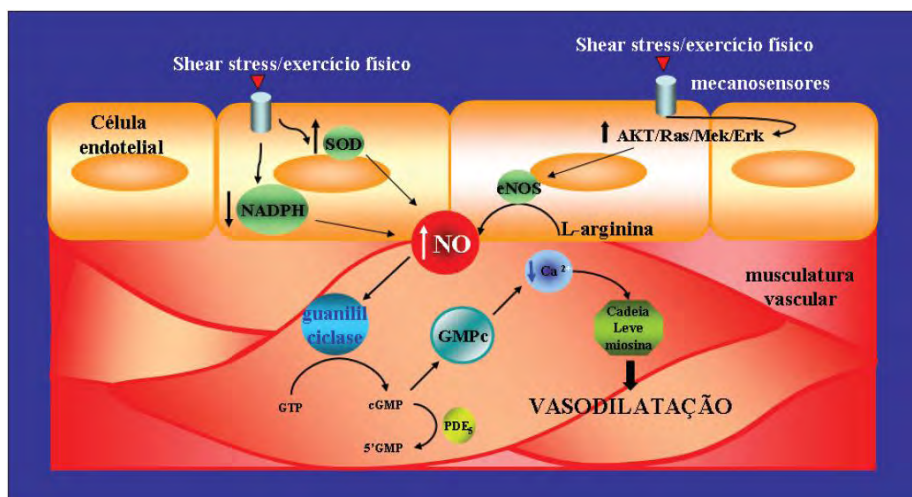
Uma vez liberado, o NO difunde-se rapidamente da célula geradora para a célula alvo, onde interage com o grupamento heme da guanilato ciclase solúvel (GCs) estimulando sua atividade catalítica, levando à formação de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), que por sua vez, diminui os níveis intracelular de cálcio  $\text{Ca}^{2+}$  (**Figura 4**). Os mecanismos pelos quais a via NO/GMPc induz a vasodilatação incluem inibição da geração do inositol-1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ), aumento do sequestro de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, desfosforilação da cadeia leve

de miosina, inibição do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , ativação de proteína quinase G, estimulação da  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase de membrana e abertura de canais de  $\text{K}^+$  (IGNARRO et al., 1987; IGNARRO, 2002).

Ambas, eNOS e nNOS, são estimuladas por uma cascata bioquímica dependente ou independente de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e calmodulina, e liberam o NO por curtos períodos de tempo. Requerem um doador de elétron, a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH), e co-fatores como a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), a flavina mononucleotídeo (FMN) e a tetrahidrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ), (MOMBOULI & VANHOUTTE, 1999; MONCADA et al., 1991; VANHOUTTE, 2003). Essas isoformas são codificadas por três diferentes genes localizados em três cromossomos distintos (MONCADA, 1997; BUSSE et al., 1993).

A iNOS é ativada por determinados estímulos patológicos, tais como lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) e citocinas, incluindo a interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). É ativada independentemente do complexo  $\text{Ca}^{2+}$  e calmodulina, e libera grandes quantidades de NO por períodos de tempo relativamente longos (MONCADA et al., 1991).

As células endoteliais são altamente sensíveis a estímulos químicos advindos de agonistas como a acetilcolina, bradicinina e histamina que promovem a ativação da eNOS aumentando a produção de NO, e também por estímulos físicos. Especificamente, a força física resultante da variação do fluxo sanguíneo (shear stress) é considerada um dos mais importantes estímulos físicos para a célula endotelial produzir NO e EDHF. O aumento na força de cisalhamento estimula mecanossensores presentes nas células endoteliais que podem ser as proteínas G, os canais iônicos, as junções intercelulares, as integrinas ou os lipídeos de membrana que captam as alterações de tensão sobre a parede celular e convertem os estímulos mecânicos em estímulos químicos para a ativação da eNOS, independente de  $\text{Ca}^{2+}$ . A capacidade das células endoteliais de perceber e responder às mudanças no fluxo sanguíneo é fator essencial na regulação do tono vascular, e envolve a ativação de fatores de crescimento celular, promovendo o remodelamento da parede arterial e a manutenção da integridade do endotélio (FISHER et al., 2001; HIGASHI & YOSHIZUMI, 2004; KOJDA & HAMBRECHT, 2005).

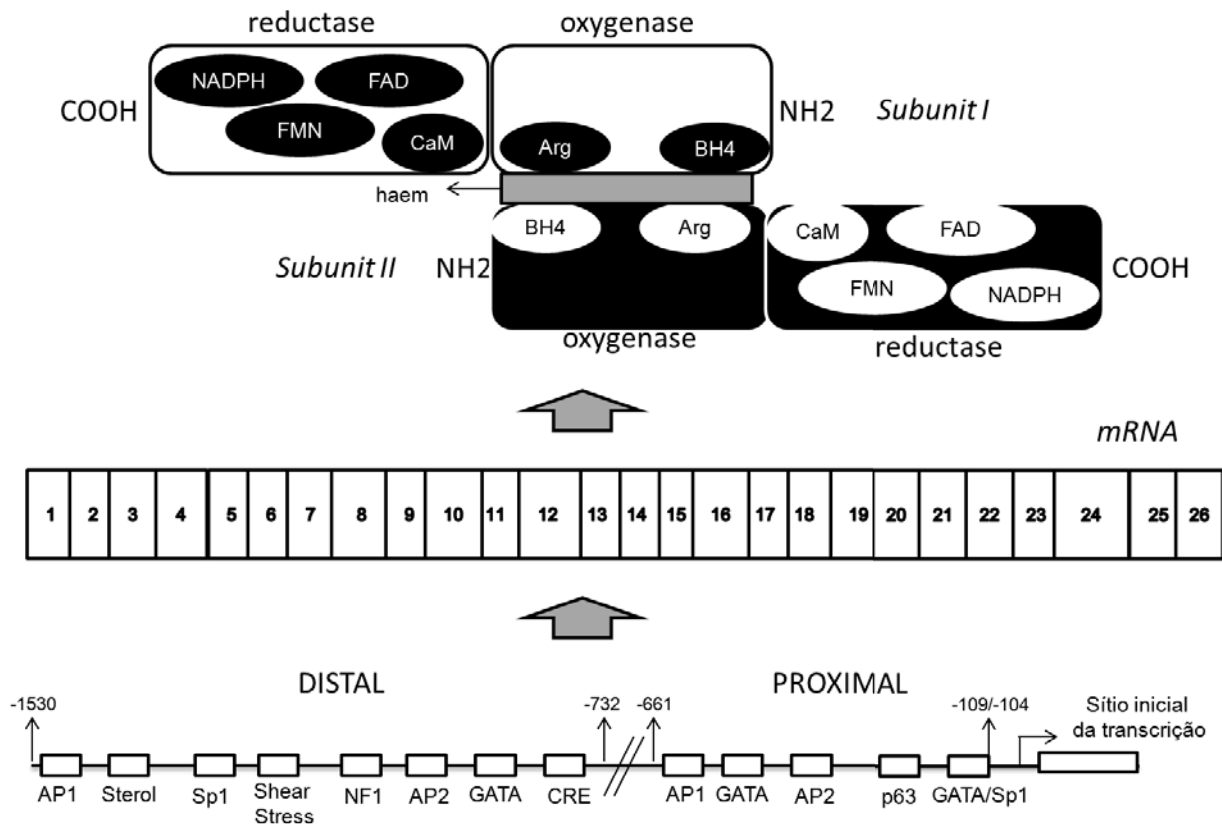


**Figura 4.** Mecanismo de ação do óxido nítrico e relaxamento do músculo liso vascular, de ZANESCO & ZAROS, 2009).

### 2.3 Estrutura do Gene da eNOS

O gene da eNOS está localizado no cromossomo 7 (Gen Bank D26607), mais especificamente no longo braço do cromossomo, na região 7q35-36, apresentando este um comprimento genômico de 4.4kb compreendendo 25 íntrons e 26 éxons, responsável pela síntese de um RNA mensageiro (RNAm) de 4052 nucleotídeos. A codificação do gene da eNOS, leva a formação de uma enzima de cadeia polipeptídica contendo 1203 aminoácidos e um peso molecular de 135-kD. (MARSDEN et al., 1993). Em relação à região promotora, foi observada a ausência da região regulatória “TATA box” e verificado a presença de um sítio de ligação rico em CG localizado próximo ao sítio inicial da transcrição chamado de SP1. Além deste, outros sítios de ligação foram observados como: GATA, AP-1, AP-2, NF-1, CF-1, metal pesado, PEA-3 e shear stress, onde se observa uma complexa interação entre os fatores de transcrição (SP1, variantes SP3, Ets-1, Elf-1 e MAZ) na regulação transcricional da região promotora do gene da eNOS (SEARLES, 2006).

A enzima eNOS consiste-se em um dímero, formado por dois monômeros idênticos (**figura 5**), que podem ser funcional e estruturalmente divididos em dois domínios: um domínio redutase C-terminal (*Carboxy-terminal reductase*) e um domínio oxigenase N-terminal (*amino-terminal oxygenase*). O domínio C-terminal contém sítios de ligação para NADPH, FAD e FMN, e o domínio N-terminal para a L-arginina e BH<sub>4</sub>. Além disso, entre esses domínios é observado o sítio de ligação para a calmodulina, que apresenta papel fundamental na regulação da enzima (STUEHR, 1997; ANDREW & MAYER, 1999).



**Figura 5.** Região promotora do gene da eNOS, o RNAm e a enzima eNOS.

#### 2.4 Expressão, Estabilidade e Atividade da eNOS

A regulação transcricional do gene da eNOS é mediada por uma complexa interação de diferentes fatores (LI, WALLERATH & FORSTERMANN, 2002), como:

- i) fatores de crescimento (fator de crescimento dos fibroblastos [*Fibroblast Growth Factor* - FGFb], fator transformador do crescimento [*Transforming Growth Factor* – TGFβ], fator de crescimento vascular endotelial [*Vascular Endothelial Growth Factor* – VEGF] e o fator de crescimento derivado de plaquetas [*Platelet-Derived Growth Factor* – PDGF]);
- ii) liberação de hormônios (estrogênio, insulina, angiotensina II e endotelina-1);
- iii) componentes como a lisofosfatidilcolina, responsáveis por aumentar a expressão da eNOS. Por outro lado, as citocinas como o TNFα, a IL-1, LDL oxidado (oxLDL) e os LPS estão relacionados com a diminuição da expressão da eNOS.

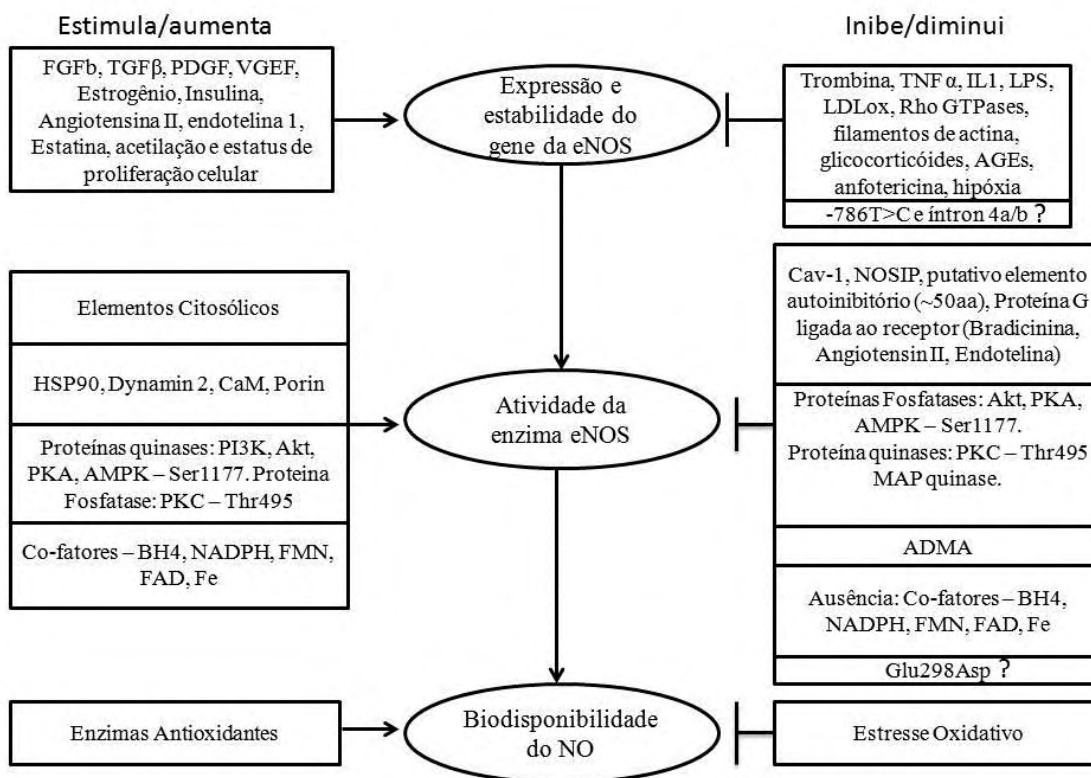
Em nível pós transcricional, a eNOS também é regulada por diversas substâncias, sendo estes: TNFα, LPS, estatinas, trombina, Rho GTPases, filamentos de actina, VGEF,

oxLDL, produtos avançados de glicosilação (AGEs), anfotericina, glicocorticóides, hipóxia e o estatus de proliferação celular (LI, WALLERATH & FORSTERMANN, 2002), veja **figura 6** para detalhes.

Em relação a sua atividade, a eNOS é regulada por diferentes substâncias e cofatores envolvidos em seu mecanismo de sinalização intracelular como: o complexo cálcio calmodulina ( $\text{Ca}^{2+}$  /CaM), caveolina-1 (CAV-1), dimetil arginina assimétrica (Asymmetric Dimethylarginine, ADMA) e a HSP (heat shock protein, Hsp90), fosforilação de proteínas quinases ou fosfatases (Fosfatidilinositol-3 quinase [*Phosphoinositide-3 kinases* - PI3K], proteína quinase B ou Akt [*Protein Kinase B or Akt*], proteína quinase A [*Protein Kinase A* - PKA], proteína quinase ativada por AMP [*AMP-actived protein kinase* - AMPK], proteína quinase ativada por mitógeno [*Mitogen-Actived Protein Kinase* - MAP], sendo estas proteínas fosforiladas em resíduos proteicos Serina/Treonina); através da acilação dos cofatores e substratos celulares como a BH<sub>4</sub>, Fe<sup>+</sup>, FAD, FMN e NADPH e, por fim, através da localização subcelular (caveolina, Golgi e elementos citosólicos), (BERNIER, HALDAR & MICHEL, 2000; FLEMING & BUSSE, 2003).

Em condições basais, a eNOS é mantida em estado inativo por diversos mecanismos independentes, os quais podemos destacar: a CAV-1 (considerada o principal regulador que interage com a eNOS reprimindo a sua atividade), um elemento autoinibitório (um resíduo de ~50 aminoácidos) presente no domínio de ligação para a FNM o qual impede a interação da CaM com a eNOS, algumas proteínas G ligadas a receptores como o receptor de bradicinina (B2), o receptor da angiotensina II (AT1) e o receptor da endotelina-1 (ETb) e a proteína NOSIP demonstrada estar regulando negativamente a translocação e atividade da eNOS. Evidências mostram que a bradicinina estimula a fosforilação (no resíduo tirosina) do receptor B2, promovendo uma dissociação da eNOS com este receptor, aumentando assim a produção do NO (BOO & JO, 2003). Por outro lado, além do complexo  $\text{Ca}^{+2}$ /CaM, outras proteínas existem interagindo com a eNOS regulando sua atividade positivamente, entre elas: a proteína HSP90, que foi inicialmente demonstrada como uma proteína tirosina fosforilada associada a eNOS (ENAP), a proteína dynamin 2 (uma proteína de ligação ao GTP), e a proteína porin (um canal de voltagem ânion dependente), (BOO & JO, 2003), veja **figura 6**.





**Figura 6.** Fatores reguladores da expressão gênica e atividade da eNOS, assim como da biodisponibilidade do NO.

## 2.5 Biodisponibilidade do Óxido Nítrico

As espécies reativas de oxigênio, também chamadas de radicais livres de oxigênio são átomos, íons ou moléculas que contém oxigênio com um elétron não pareado em sua órbita externa. Estes são caracterizados por grande instabilidade, e por isso apresentam elevada reatividade, e tendem a ligar o elétron não pareado com outros presentes em estruturas próximas de sua formação, comportando-se como receptores (oxidante) ou como doadores (redutores) de elétrons (KOURY, 2003; ANDRADE et al., 2005). As principais espécies reativas de oxigênio são o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxila (OH $\cdot$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), e o peroxinitrito (ONOO $\cdot$ ). Estes radicais são formados por atividade enzimática intra e extracelular, sendo a xantina oxidase, o citocromo P450, a via da ciclooxigenase, a eNOS desacoplada e a NADPH oxidase, as principais enzimas envolvidas neste processo (PARAVICINI & TOUYZ, 2008).

Diversos trabalhos tem mostrado que a redução da biodisponibilidade do NO é considerado fator fundamental para o desenvolvimento de DCVs, como aterosclerose, HAS,

hipercolesterolemia, trombose, diabetes mellitus e doenças cerebrovasculares (TOUYZ & SCHIFFRIN, 2004; NAPOLI et al., 2006). A reação do  $O_2^-$  com o NO, considerado fator fundamental na redução da biodisponibilidade do NO, resulta na formação de uma molécula altamente instável, o  $OONO^-$ , capaz de oxidar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, provocando danos celulares por meio da ativação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), fatores de crescimento, e de citocinas, que por sua vez desencadeiam alterações estruturais e funcionais, como o remodelamento vascular, aumento da deposição de proteínas da matriz extracelular, aumento do processo inflamatório e da permeabilidade endotelial nos tecidos envolvidos (BECKMAN & KOPPENOL, 1996).

Por outro lado, as enzimas antioxidantes compõem a principal linha de defesa aos componentes oxidantes produzidos pelo organismo. Dentre as enzimas antioxidantes presentes no tecido vascular, temos a catalase (CAT), a glutaciona peroxidase (GSH-Px) e mais três tipos de superóxido dismutase (SOD), sendo a SOD-1 dependente de Cu/Zn, presente no núcleo e no citosol, a SOD-2 dependente de Mn, presente na mitocôndria e a SOD-3 dependente de Cu/Zn, presente na matriz extracelular. O papel da enzima SOD é promover a dismutação do  $O_2^-$  formando assim o  $H_2O_2$ . As enzimas CAT e a GSH-Px promovem a eliminação de  $H_2O_2$ , promovendo assim a formação de água, mantendo os níveis de EROS reduzidos no organismo. O perfeito equilíbrio entre as enzimas antioxidantes e a formação de EROS é fator determinante para a integridade celular, pois a SOD, CAT e GSHPx evitam o acúmulo das moléculas altamente reativas de oxigênio, evitando o dano celular (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004).

## **2.6 Mutações Genéticas e os Polimorfismos.**

As mutações gênicas são classificadas como alterações naturalmente observadas na sequência do DNA, sendo essas caracterizadas por substituições, inserções ou mesmo deleções de nucleotídeos. Os polimorfismos diferem-se das mutações gênicas devido a sua frequência observada na população. Classicamente, as mutações gênicas são caracterizadas por apresentarem frequência populacional  $< 1\%$ , resultando normalmente em uma patologia; já os polimorfismos são caracterizados por apresentarem frequência populacional  $>1\%$ , não resultando em patologias. Entretanto, recentes trabalhos têm mostrado que este clássico conceito apresenta algumas limitações, uma vez que nem todas as mutações gênicas resultam em doenças, e alguns polimorfismos apresentam-se funcionalmente importantes, podendo estes estar envolvidos na fisiopatologia de algumas doenças.

Os polimorfismos apresentam-se normalmente em: i) polimorfismos de único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphism* - *SNP*), caracterizados por inserções ou deleções de únicos ou múltiplos nucleotídeos, ii) um variável número de repetições em tandem (*variable number tandem repeats* - *VNTR*) caracterizados por pequenas sequências de nucleotídeos (10 a 100 pb) que se repetem até centenas de vezes em uma sequência de DNA (BALASUBRAMANIAN et al., 2004).

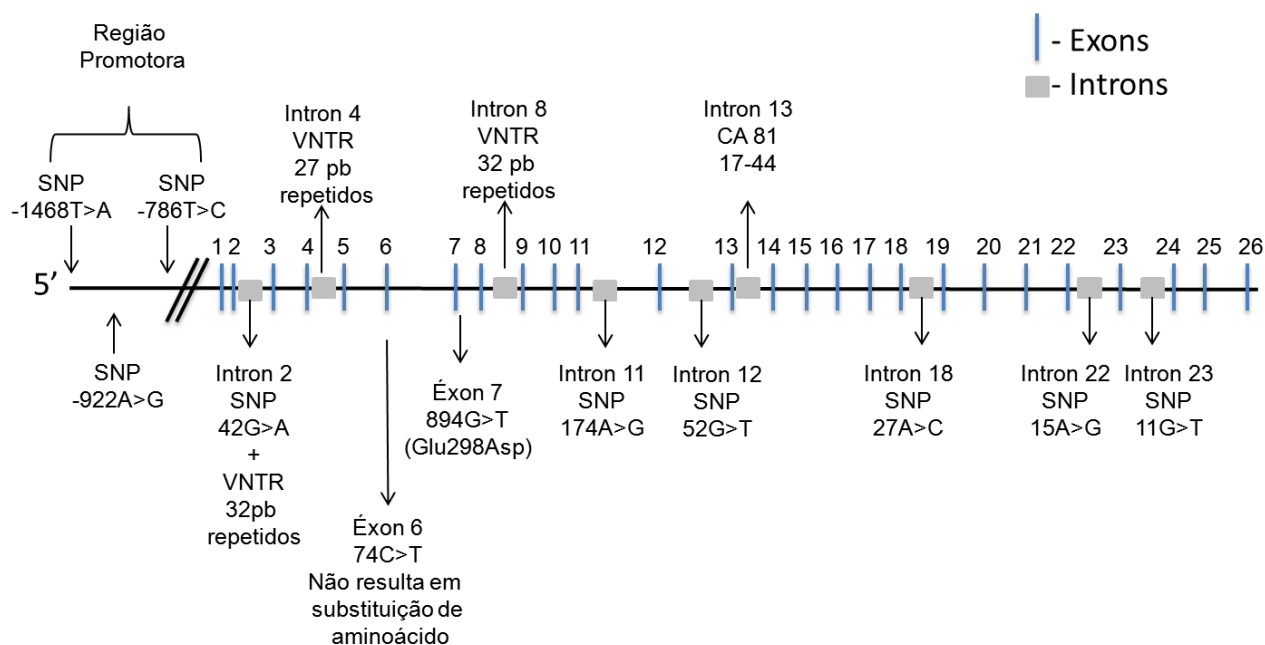
Os polimorfismos localizam-se nas mais diversas regiões do genoma humano como, a) regiões regulatórias (controle da atividade e expressão gênica); b) regiões codificantes (codificadoras de proteínas) regiões dos introns (separam regiões codificantes ou éxons em um gene) ou c) regiões inter-genes, sendo normalmente classificados como selvagens (*wild type*) quando apresentam uma sequência comum, ou raro (*rare*) quando apresentam variância alélica rara (BALASUBRAMANIAN, et al., 2004).

## 2.7 Polimorfismos do Gene da eNOS

Atualmente tem-se conhecimento de mais de 100 polimorfismos para o gene da eNOS e sua vizinhança (NCBI SNP database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>). Na região promotora foram detectados três distintos SNP: substituição do nucleotídeo timina para adenina na região promotora posição -1468 (-1468T>A); substituição do nucleotídeo adenina para guanina na posição -922 (-922A>G) e substituição do nucleotídeo timina para citosina para a posição -786 (-786T>C), sendo este último o mais estudado e clinicamente relevante SNP da região promotora. Estudo prévio demonstrou que a sequência funcional da região promotora estende-se somente até -144bp. Apesar disso, observou-se que as regiões entre -3500 bp e -1193bp apresentam função inibitória (*down-regulation*) do gene da eNOS (KARANTZOULIS-FEGARAS et al., 1999).

Outros SNPs observados para os introns do gene da eNOS são: para o intron 2 - IVS2 + 42G>A (G561A); intron 11- IVS11 +174A>G (A3185G); intron 12 - IVS12 +52G>T (G3411T); intron 18 - IVS18 +27A>C (A27C); intron 22 - IVS22 +15A>G (A6007G) e intron 23 - IVS23 + 11G>T (G6247T). VNTR foram encontrados no intron 2 e 8 (32-bp repetidos); intron 4 (27bp repetidos) e intron 13 (IVS13 +81(CA)17-44. E por fim, os SNP nos éxons: 5557G>T (G894T) no éxon 7 (E298D, uma substituição do aminoácido Glutamato para o Aspartato, normalmente conhecido como Glu298Asp) e 5172C>T (C74T) no éxon 6 (uma substituição sem alteração na sequência dos aminoácidos) (WANG & WANG, 2000) (**figura 7**).

Embora não tenham sido encontradas variações na sequência 3' não traduzida (UTR), um estudo mostrou que essa região é criticamente importante para o estado estável do RNAm da eNOS. Além disso, foi demonstrado a existência de “proteínas ligantes” para essa região, as quais levariam a uma desestabilização do RNAm. Assim, qualquer variação na UTR poderia alterar a afinidade dessas regiões ligantes, modulando a regulação postranscricional da formação da enzima eNOS (WANG & WANG, 2000).



**Figura 7.** Polimorfismos do gene da eNOS.

## 2.8 Polimorfismos do Gene da eNOS e as Doenças Cardiovasculares

Até o presente momento, cinco grandes meta análises foram conduzidas buscando analisar a associação entre os polimorfismos do gene da eNOS e as DCVs (CASAS et al., 2004; CASAS et al., 2006; ZINTZARAS et al., 2006; PEREIRA et al., 2007; TAO & CHEN, 2009). Em uma de suas meta-análises, CASAS et al. (2004) avaliando mais de 23 mil sujeitos demonstraram que os indivíduos homocigotos polimórficos para a posição Glu298Asp (OR, 1.31; 95% IC, 1.13 para 1.51) e Intron 4a/b (OR, 1.34; 95% IC, 1.03 para 1.75) tinham maior prevalência de doenças isquêmicas do coração. Entretanto, estes autores enfatizam que devido à baixa frequência alélica observada para indivíduos homocigoto polimórficos, e também a heterogeneidade alélica encontrada para a posição Glu298Asp, esses resultados deveriam ser interpretados com cautela. Posteriormente, este mesmo grupo, em uma atualização, demonstra

a associação entre os polimorfismos da eNOS (-786T>C [OR, 1.17; 95% IC, 1.07 para 1.28], Glu298Asp [OR, 1.17; 95% IC, 1.07 para 1.28] e Íntron 4a/b [ 1.12; 95% IC, 1.01 para 1.24]) e as DCVs. Estes autores destacam a necessidade de maiores estudos em diferentes grupos étnicos, assim como melhor entendimento das relações gene-gene e gene-ambiente (CASAS et al., 2006).

Outra meta-análise avaliando a associação entre os polimorfismos Glu298Asp e Intron 4 e o acidente vascular encefálico (AVE) – com 5516 casos e 6150 controles de 18 estudos, não demonstrou associação entre o polimorfismo do Intron 4a/b e o AVE (OR, 1.67; 95% IC, 0.81 para 3.45) e marginal associação entre o SNP Glu298Asp e o AVE (OR 1.14; 95% IC, 0.99 para 1.31). Os autores atribuem a limitação deste estudo ao pequeno número de trabalhos até então realizados entre os polimorfismos da eNOS e o AVE (TAO & CHEN, 2009).

Em relação à HAS, duas grandes meta-análises foram conduzidas buscando verificar a associação desta patologia e os polimorfismos do gene da eNOS. A primeira meta-análise avaliou 35 estudos, sendo analisados os polimorfismos -786T>C, Glu298Asp, Intron 4a/b e G23T. Esses autores demonstraram que apenas o polimorfismo do intron 4a/b estava associado com a HAS, sendo observado para o alelo b um efeito protetor de 15% em relação ao desenvolvimento da HAS. Entretanto, quando analisados os subgrupos como asiáticos e negros não se observou qualquer associação. Esses autores acreditam que uma mutação funcional não identificada do gene da eNOS poderia ser a razão para a ausência dessas associações. Além disso, os autores acreditam que a interação entre os polimorfismos do gene da eNOS (haplótipos) poderia ser maior determinante no desenvolvimento de DCVs do que a análise isolada dos polimorfismos. Assim, eles sugerem o desenvolvimento de futuras meta-análises relacionando os haplótipos do gene da eNOS e as DCVs (ZINTZARAS et al., 2006).

Outra meta-análise recentemente realizada, avaliou mais de 40 mil sujeitos presentes em 53 trabalhos. Este estudo foi conduzido separando três diferentes populações como: Europeus (ou descendentes de Europeus), Asiáticos (Chineses e Japoneses) e Outros (Africanos, Brasileiros, Turcos, etc). Esses autores observaram que o polimorfismo para o intron 4a/b, estava associado a um aumento (OR, 1.28; 95% IC, 1.11 para 1.47) de 28% de risco para desenvolvimento da HAS comparado aos indivíduos não polimórficos para essa posição. Além disso, eles também observaram, apenas para a população Asiática, que os indivíduos polimórficos para a posição Glu298Asp também estavam associados com a HAS (OR, 1.28; 95% IC, 1.06 para 1.54). Foi verificado também que esta associação poderia ser dependente dos níveis de colesterol observados para essa população. Entretanto, para a

posição -786T>C não foi observada associação com HAS. Assim, futuros trabalhos são necessários para avaliar a interação dos polimorfismos da eNOS (haplótipos), assim como as relações entre gene e ambiente (PEREIRA et al., 2007).

### **2.9 Polimorfismo da Região Promotora posição -786T>C**

Como já mencionado, a região promotora é a estrutura fundamental responsável pela regulação e funcionalidade do gens. Desse modo, os polimorfismos da região promotora, são considerados fundamentais na regulação do nível transcricional dos gens, podendo estes afetar diretamente a quantidade de proteína formada. Especificamente em relação ao gene da eNOS, o SNP da região promotora que apresenta maior relevância clínica é o SNP da posição -786T>C.

Em seu clássico trabalho, NAKAYAMA et al (1999) demonstraram pela primeira vez que este SNP influenciava (*in vitro*) a atividade transcricional do gene da eNOS, sendo este considerado um fator de risco independente para o desenvolvimento de espasmos coronários e infarto do miocárdio na população japonesa. Com o objetivo de demonstrar os mecanismos moleculares envolvidos nessa redução, trabalho envolvendo cultura de células HCAEC (células endoteliais de coronária humana) mostrou que a expressão do gene da eNOS estava reduzida em alelos que apresentavam o SNP -786T>C devido a interação da proteína repressora chamada RPA1 (proteína conhecida por sua participação nos processos de reparo, replicação e recombinação do DNA) com o alelo mutante (-786T>C). Além disso, verificou-se que as concentrações de NOX<sup>-</sup> estavam reduzidas nos alelos mutantes em comparação aos não mutantes para o SNP -786T>C (MIYAMOTO et al., 1998). Já em seres humanos, estudos em plaquetas (DOSENKO et al., 2006), como em células endoteliais isoladas de cordão umbilical (CATTARUZZA et al., 2004) mostraram que os indivíduos polimórficos para a posição -786T>C apresentavam menor expressão e atividade da eNOS quando comparados aos indivíduos não polimórficos para esta posição. Verificou-se também em pacientes com doença arterial coronariana que a vasodilatação dependente do endotélio era reduzida em indivíduos polimórficos para a posição -786T>C comparado aos indivíduos não polimórficos demonstrando assim a influência deste SNP sobre a vasodilatação dependente do endotélio (ERBS et al., 2006).

### **2.10 Climatério**

O climatério pode ser definido como o fim da fase reprodutiva até o início da senescência da mulher. Este período encontra-se entre os 40 aos 65 anos de idade. A

menopausa é considerada uma etapa normal do processo de envelhecimento da mulher. É definida como sendo a falência total da função ovariana em produzir hormônios esteróides e ovulação, acarretando em amenorréia permanente (GALLO et al., 2001; FREITAS et al., 2002). Na maioria das mulheres este processo ocorre no período de 50 a 70 anos.

Antes da menopausa, os valores de pressão arterial são, em geral, menores em mulheres quando comparados aos homens da mesma idade. Entretanto, após a menopausa, observa-se significativa elevação nos valores de pressão arterial (WASSERTHEIL-SMOLLER et al., 2000; REXRODE et al., 2003; RECKELHOFF & FORTEPIANI, 2004; SARTORI-VALINOTTI et al., 2007; PHILLIPS, JING & HEYMSFIELD, 2008). Os mecanismos celulares e/ou moleculares pelos quais ocorre maior incidência de hipertensão arterial em mulheres após a menopausa ainda não são claros. Uma variedade de fatores parece contribuir para a elevação de pressão arterial na menopausa, entre eles destacam-se a deficiência de estrogênio, o aumento do estresse oxidativo, a disfunção endotelial, a elevação da atividade do sistema renina-angiotensina, a elevação nos níveis plasmáticos de testosterona, as alterações no perfil lipídico e o aumento no ganho de peso (FURTADO & MARTIN, 1995; REIS et al., 2000; FORJAZ et al., 2007).

Existem fortes evidências que relacionam as reduções nas concentrações séricas de estrogênio com a elevação na pressão arterial (WASSERTHEIL-SMOLLER et al., 2000; GALLO et al., 2001; FREITAS et al., 2002; FORJAZ et al., 2007; COYLEWRIGHT et al., 2008). Sabe-se que o estradiol (um dos tipos de estrogênio) pode promover proteção cardiovascular através do controle do sistema renina-angiotensina-aldosterona, incluindo redução da expressão dos receptores AT1 em vasos e rins e reduzir a atividade da ECA (HARRISO-BERNARD et al., 2003). O efeito do estrogênio sobre o tônus vascular foi estudado, em modelos animais em diferentes artérias, como a coronária, a aorta, a mesentérica e as artérias cerebrais. Foi verificado que o endotélio vascular possui receptores para o estrogênio, e que este pode aumentar a liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio, como o NO, bem como aumentar sua biodisponibilidade para as células musculares lisas (TOSTES et al., 2003). No entanto a gênese da HAS em mulheres após a menopausa é mais complexa do que àquela observada em modelo experimental de menopausa em animais de laboratório. Além disso, a reposição hormonal em mulheres após a menopausa mostrou-se de baixa eficácia na redução dos valores de pressão arterial, como também na prevenção de eventos cardiovasculares, confirmando que os mecanismos envolvidos no controle da pressão arterial em mulheres após a menopausa são diferentes daqueles encontrados em modelos experimentais (ESHRE Capri Workshop Group, 2006). Assim, mudanças no estilo de vida,

como educação alimentar e a prática de atividade física regular, associadas à terapêutica efetiva no controle da hipertensão arterial, da hiperglicemia e da dislipidemia, parecem trazer melhores resultados na qualidade de vida de mulheres após a menopausa.

### **2.11 Exercício Físico e a Pressão Arterial**

Sabe-se que o exercício físico aeróbio de moderada intensidade, realizado continuamente, promove efeitos benéficos tanto na prevenção quanto no tratamento das DCVs, e sua prática regular têm sido recomendada por diferentes associações de saúde do mundo (AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE, 2004; AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2007). Seus benefícios também têm sido demonstrados na prevenção e/ou tratamento da hipertensão arterial (KINGWELL, 2000; LATERZA et al., 2007; ZANESCO & ANTUNES, 2007). Recente meta análise claramente demonstrou que o exercício físico aeróbio dinâmico é capaz de promover efeitos benéficos sobre a pressão arterial (STAFFILENO et al., 2007). Sabe-se que o exercício físico aumenta o fluxo sanguíneo pulsátil e a pressão que o sangue exerce sobre a parede vascular e a força de cisalhamento sob as células endoteliais são considerados estímulos poderosos para a geração de NO no sistema vascular. Assim, um dos efeitos benéficos do exercício físico regular está estreitamente relacionado à sua capacidade de estimular a síntese de NO pelas células endoteliais (SESSA et al., 1994; KINGWELL, 2000; ZANESCO & ANTUNES, 2007). O aumento na produção de NO promove também efeitos antitrombóticos, prevenindo as doenças tromboembólicas e a aterosclerose, devido à inibição da agregação plaquetária pelo NO. Além de estimular a produção de NO, o exercício físico promove também elevação da expressão de enzimas antioxidantes, como a SOD-1, aumentando a biodisponibilidade do NO para as células musculares lisas, promovendo melhor relaxamento da musculatura lisa vascular, e, conseqüentemente, reduzindo os valores de pressão arterial (DE MORAES et al., 2008). Além disso, prévios estudos têm demonstrado que o treinamento físico é capaz de promover efeitos benéficos sobre a pressão arterial devido a diferentes mecanismos, como redução nas concentrações plasmáticas de angiotensina II, redução do tônus simpático e/ou aumento da sensibilidade dos barorreceptores aórticos e carotídeos, redução da vasoconstrição adrenérgica (aumento da sensibilidade dos adrenoreceptores  $\beta_2$ -vasculares e/ou a diminuição da sensibilidade dos adrenoreceptores  $\alpha$ ) devido a maior produção de NO, diminuição dos níveis plasmáticos de renina e aldosterona, aumento da liberação de peptídeos natriuréticos, aumento da atividade da SOD tanto plasmática quanto cardíaca, modulação dos canais de potássio e aumento na expressão de cardioprotetores com a apelina e seu receptor APJ (CHEN &



CHIANG, 1996; KRIEGER, BRUM & NEGRÃO, 1998; BOWLES & WAMHOFF, 2003; KOHNO et al., 2002; QUINDRY et al., 2005; BOISSIERE et al., 2006; ZHANG et al., 2009).

Dados experimentais mostram que a redução da pressão arterial após exercício aeróbio crônico é maior em indivíduos hipertensos, principalmente quando os indivíduos estão classificados nos estágios 1 e 2 de hipertensão arterial, do que em normotensos, tanto em humanos quanto em modelo animal. A redução dos valores de PAS e PAD decorrente de atividade física varia de 18–20 mmHg ( $\Delta$ ) e de 7–9 mmHg ( $\Delta$ ), respectivamente, em humanos com hipertensão leve ou moderada. Em indivíduos normotensos, a redução é de 8–10 mmHg ( $\Delta$ ) para a pressão sistólica e de 3–5 mmHg ( $\Delta$ ) para a pressão diastólica (DUNCAN et al., 1985; KENNEY & SEALS, 1993; HAGBERG et al., 2003). Recente meta-análise demonstrou que a redução da PA, medida através do monitoramento ambulatorial da pressão arterial é de 3.0/2.4 mmHg quando avaliada na condição de repouso, e 3.3/3.5 mmHg observada durante o dia. Além disso, foram observadas reduções da resistência vascular sistêmica (7.1%), norepinefrina plasmática (29%), atividade da renina plasmática (20%), peso corporal (1.2kg), circunferência abdominal (28cm), do percentual de gordura corporal (1.4%) e elevação do HDL-C (0.032 mmol/l) (FAGARD & CORNELISSEN, 2007).

O exercício aeróbio é eficaz como terapia alternativa, ou concomitante com terapia farmacológica, no tratamento da hipertensão arterial leve ou moderada. A recomendação dos programas de condicionamento físico para hipertensos preconizam a prática regular de exercícios físicos, cinco vezes por semana, durante pelo menos 30 minutos por sessão (máximo de 60 minutos), em intensidade moderada (40-60% do  $VO_2$ máx), (AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE, 2004). Os exercícios de baixa e moderada intensidade (40-60% de  $VO_2$ máx) apresentam melhores resultados na redução da pressão arterial do que exercícios de maior intensidade. A duração do exercício também possui grande influência para a redução da pressão arterial pós-exercício. Além disso, observa-se que mulheres hipertensas respondem melhor e de maneira mais consistente a um programa de exercício físico do que os homens, com intensidade entre 75 a 85% do consumo máximo de oxigênio ( $VO_2$ máx), durante 35 a 45 minutos, três vezes por semana, durante dois meses. Em relação à pressão arterial sistólica, as mulheres apresentam redução de cerca de 14,7 mmHg enquanto que os homens, de cerca de 8,7 mmHg após programa de exercício físico contínuo. Em relação à PAD, resultados mostram que 89% das mulheres apresentaram uma redução média de 10,5 mmHg enquanto que 82% dos homens apresentaram redução nos valores de cerca de 7,8 mmHg (BRANDÃO et al., 2002).

## **2.12 Polimorfismos da eNOS e Atividade Física.**

Em relação aos polimorfismos do gene da eNOS, poucos trabalhos buscaram relacionar estes polimorfismos com a atividade física. Prévio estudo demonstrou em voluntárias sedentárias e polimórficas para a posição -786T>C que estas apresentavam maior resistência vascular periférica comparada aos seus pares não polimórficos. Entretanto, quando essa comparação era realizada em mulheres com alta aptidão cardiorrespiratória, essa diferença desaparecia (DATA et al., 2003). Do mesmo modo, outro estudo realizado em pacientes com DAC observou que os indivíduos polimórficos tanto para a posição -786T>C quanto para posição Glu298Asp apresentavam vasodilatação dependente do endotélio reduzida em comparação aos seus congêneres não polimórficos. Quando esses indivíduos foram submetidos a um período de treinamento físico aeróbio por 4 semanas, verificou-se que somente os pacientes polimórficos para a posição Glu298Asp apresentaram melhora na vasodilatação dependente do endotélio e que o polimorfismo da posição -786T>C prejudicava a função vascular em pacientes com DAC independente da aptidão física aeróbia (ERBS et al., 2003). Além disso, outro estudo demonstrou que indivíduos polimórficos para a posição Glu298Asp, submetidos a um programa de treinamento físico aeróbio por 20 semanas, apresentavam menores reduções da PAD e do duplo produto em comparação aos indivíduos não polimórficos para esta posição (RANKINEN et al., 2000). Por outro lado, recente estudo demonstrou que os indivíduos polimórficos para a posição -786T>C apresentavam melhor resposta hipotensora frente ao exercício físico aeróbio quando comparado aos seus pares não polimórficos (AUGERI et al., 2009).

Baseado nesses dados, nossa hipótese inicial foi que mulheres normotensas e hipertensas que apresentassem polimorfismo para o gene da eNOS na posição -786T>C seriam refratárias a redução da pressão arterial após exercício ou teriam menor redução nos valores de pressão arterial do que àquelas sem este polimorfismo.

### **3. OBJETIVO**

O objetivo deste trabalho foi verificar a influência do polimorfismo da posição -786T>C do gene da eNOS sobre as respostas pressóricas e as concentrações plasmáticas de NOX<sup>-</sup> em mulheres normotensas e hipertensas submetidas ao exercício físico aeróbio por 6 meses.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Participantes

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho UNESP (protocolo número 099/2008) e, após todos os participantes terem suas dúvidas respondidas, um termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado. Os participantes desse estudo foram recrutados através de panfletos e anúncios dentro da comunidade universitária da e de áreas circunvizinhas à universidade.

4.2 Critérios de inclusão - Para ser incluso no estudo, as voluntárias deveriam ter idade acima de 40 anos, serem sedentárias (tempo < 150 minutos de atividade física semanal de intensidade moderada ou < 60 minutos de atividade física semanal de intensidade vigorosa nos últimos 3 meses); não fumantes; não diabéticos; ter função renal normal (creatina sérica < 135 mmol/L); apresentar IMC < 30 kg/m<sup>2</sup> evitando-se assim a interferência da obesidade; apresentar PAS ≤140-149mmHg e PAD ≤90-99mmHg, (estágio 1 de hipertensão – SBH); não ter nenhuma outra condição médica que poderia impedir a prática de exercício físico.

As participantes qualificadas foram convidadas a comparecerem ao Laboratório de Atividade Física e Saúde para um exame inicial, e também para uma explicação completa do estudo pelo pesquisador responsável. De acordo com o Comitê de Ética, um termo de consentimento foi obtido de todos os participantes após terem sido fornecidas as informações de todos os procedimentos do estudo, de seus riscos e benefícios e após todas as dúvidas dos participantes serem respondidas.

### 4.3 Grupos Experimentais

Inicialmente, as participantes foram divididas em dois grupos:

Normotensos (NT); n=28

Hipertensos (HT); n=28

Posteriormente, estes grupos foram subdivididos de acordo com o genótipo observado para a posição -786T>C do gene da eNOS.

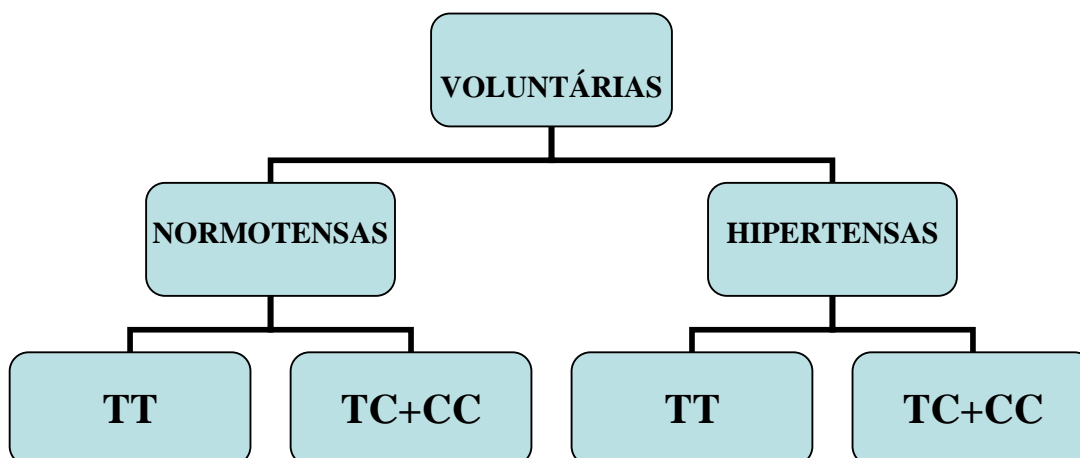
Normotenso (TT) – n= 9

Normotenso (TC+CC) – n= 19

Hipertenso (TT) – n= 5

Hipertenso (TC+CC) – n= 22

Abaixo segue o organograma com a divisão dos grupos:



#### 4.4 Avaliação Antropométrica

O cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC) foi realizado com base na avaliação antropométrica (peso e altura) levando em consideração a razão entre o peso corporal e o quadrado da estatura ( $\text{kg/m}^2$ ), realizado através de uma balança digital marca Plenna® estando os voluntários vestidos com o mínimo de roupa possível e descalços para a pesagem. A estatura foi mensurada através de uma fita métrica que foi fixada a parede, estando as voluntárias descalças para esta avaliação.

#### 4.5 Medida da frequência cardíaca de repouso ( FC de repouso)

Para determinação da FC de repouso, ao chegarem ao laboratório as voluntárias permaneciam em repouso total durante 15 minutos, onde foram registrados os menores valores de FC através de um frequencímetro da marca Polar (FS1). Para o dia da avaliação, as voluntárias foram orientadas a não consumirem café ou qualquer bebida/medicamento que pudesse alterar as respostas da FC de repouso.

#### 4.6 Cálculo da FC de reserva

Para o cálculo da FC de reserva, utilizou-se a equação de Karvonen (1957) conforme abaixo descrito:

$$\text{FC reserva} = \text{FC rep} + X(\text{FCmáx} - \text{FCrep})$$

Onde:

FC rep – Frequência Cardíaca de repouso.

FC máx – Frequência Cardíaca máxima estimada ( $220 - \text{idade}$ )

X – Intensidade de treinamento em decimais. Ex: 70% = 0,70.

#### 4.7 Consumo máximo de oxigênio ( $VO_2$ máx) através do teste de 1 milha

O  $VO_2$ máx foi definido de forma indireta e submáxima através da realização do teste de 1 milha (1.609 metros) preconizado por Kline et al. (1987). Este teste consiste em caminhar esta distância pré-estabelecida, o mais rápido possível, sem correr. Para o cálculo do  $VO_2$ máx foram mensuradas as variáveis de frequência cardíaca final do teste e o tempo gasto para realizar o percurso. Para a realização desse teste, foram utilizados um frequencímetro da marca Polar (modelo FS1) e um cronômetro digital. O protocolo de Kline et al. (1987) apresenta alta correlação para predizer o  $VO_2$ máx ( $r = 0,92$ ) em mulheres. As voluntárias hipertensas que realizavam terapia anti-hipertensiva através do uso de  $\beta$  bloqueadores não realizaram o teste de 1 milha. De posse desses dados, o  $VO_2$  max foi calculado conforme equação abaixo descrita:

$$VO_2máx = 132,853 - (0,0769 \times \text{peso corporal em libras}) - (0,3877 \times \text{idade}) + (6,315 \times \text{gênero}) - (3,2649 \times \text{tempo de caminhada}) - (0,1565 \times \text{frequência cardíaca final})$$

Sendo:

**Peso corporal em libras** – O peso corporal foi convertido de kg para libras (1 libra = 0.4539kg);

**Idade** – A idade foi representada em anos;

**Gênero** – Foi utilizado o número 0, conforme proposto pela equação para o sexo feminino;

**Tempo de caminhada** – O tempo de caminhada foi representado em minutos;

**Frequência cardíaca final** – Avaliada imediatamente após o término da caminhada, através dos batimentos por minutos (bpm).

O teste de 1 milha foi aplicado em dois momentos: (a) inicial – após o período de adaptação; e (b) após 24 semanas de treinamento físico.

#### 4.8 Consumo máximo de oxigênio através do teste de Astrand)

Para determinação do  $VO_2$ max, foi realizado um protocolo submáxima em cicloergômetro (ASTRAND & RYHMING, 1954). Este teste consiste de um aquecimento de 2 minutos com carga inicial de 25 watts. Posteriormente, foi selecionada uma carga (100 a 150 watts) a qual as voluntárias pedalarão durante 6 minutos (registrando-se a FC no 5° e 6° minutos e calculando-se a média) em um ritmo de pedalada de  $160 \pm 10$  rotações por minuto (RPM) ou 26~28 km/h. A FC durante o teste foi controlada em valores entre 130 e 170 bpm.

Para cálculo do VO<sub>2</sub>máx (L/min) foi utilizado a equação segundo Araújo (1984, p.71): As voluntárias hipertensas que realizavam terapia anti-hipertensiva através do uso de β bloqueadores não realizaram o teste de Astrand.

$$\text{VO}_2 \text{ teste (L/min)} = \frac{\text{FC máx} - \text{FC repouso}}{\text{FC esf.} - \text{FC repouso}} \times \text{VO}_2 \text{ carga}$$

**Onde:**

**FC máx.** – Estimativa da FC máxima do avaliado (220-idade).

**FC repouso.** – Obtido antes do início do teste com o avaliado em repouso.

**FC esf.** - Média da FC obtida no 5º e 6º. minutos da carga

**VO<sub>2</sub> carga.** - Consumo máximo de O<sub>2</sub> necessário para pedalar uma dada carga definida.

Obtido pela seguinte equação:

$$\text{VO}_2 \text{ carga (L/min}^{-1}) = 0.014 \times \text{carga (watts)} + 0.129$$

Para maior especificidade do VO<sub>2</sub>máx, foi utilizado um fator de correção pela idade (F) citado por MARINS (1998, p. 137).

$$F = -0.009 \times \text{idade} + 1.212$$

Sendo assim:

**VO<sub>2</sub>máx = (VO<sub>2</sub> teste x fator de correção)**

Os dados do consumo máximo de oxigênio obtidos em litros por minuto (L/min) foram convertidos para mililitro quilograma por minutos (ml/kg/min) através da multiplicação por “mil” dos valores obtidos na equação acima citado e dividido pelo peso corporal de cada voluntária.

**Ex: VO<sub>2</sub>máx = 2,35 L/min - (2,35x1000/70kg) = 33,5 ml/kg/min**

Para a realização do teste de 1milha e do teste de Astrand foram utilizados frequencímetros da marca Polar e cronômetros digitais.

#### 4.9 Percepção Subjetiva de Esforço

Para percepção subjetiva de esforço foi utilizada a escala de Borg (2000). Abaixo segue os valores representativos da percepção subjetiva de esforço.

**PERCEPÇÃO SUBJETIVA DE ESFORÇO**  
(Borg & Noble, 1974)

6	-
7	muito fácil
8	-
9	fácil
10	-
11	relativamente fácil
12	-
13	ligeiramente cansativo
14	-
15	cansativo
16	-
17	muito cansativo
18	-
19	exaustivo
20	-

**Figura 8.** Percepção Subjetiva de Esforço

#### 4.10 Medida da pressão arterial

Para os dias determinados para aferição da pressão arterial, as voluntárias foram instruídas a não realizarem exercício físico. Pela manhã (07:00h a 10:00h), as voluntárias deveriam comparecer ao laboratório. Após 15 minutos de repouso total, a pressão arterial era aferida na posição sentada utilizando um esfigmomanômetro aneróide (Tycos, Raleigh, NC, USA). Estas medições foram feitas pelo mesmo experiente avaliador no início e durante todo protocolo de treinamento de 24 semanas. Para determinação das médias da PAS e PAD, pelo menos três medidas foram feitas em dias distintos.

#### 4.11 Treinamento Físico Aeróbio

O treinamento físico aeróbio foi realizado no Departamento de Educação Física (UNESP/Rio Claro). Todas as participantes foram submetidas a 3 sessões/semana de treinamento físico supervisionado durante 24 semanas. As sessões de familiarização,



realizadas durante a primeira semana, consistiram de 25 a 30 minutos de exercício aeróbio com aproximadamente 50% da FC máxima. Em seguida, de posse dos dados da FC repouso, realizou-se o cálculo da FC reserva. Durante as primeiras 12 semanas, o treinamento físico foi realizado em uma intensidade de 50-60% da FC de reserva com duração de 30 minutos. Após as 12 semanas iniciais de treinamento físico, nova avaliação da FC repouso e posteriormente da FC de reserva foram realizadas conforme acima descrito. Para as últimas 12 semanas, o treinamento foi realizado em uma intensidade de 60-70% da FC de reserva com duração de 40 minutos. Os aumentos na intensidade e duração do treinamento ocorreram somente quando as participantes completaram suas prescrições de exercício por três sessões consecutivas sem sinais ou sintomas cardiovasculares ou fadiga excessiva. Os exercícios incluíram atividades na esteira ergométrica e em cicloergômetro. As voluntárias hipertensas que realizavam terapia anti-hipertensiva através do uso de  $\beta$  bloqueadores foram instruídas a controlar a intensidade do exercício através da escala de Borg (números 13 e 14 da escala de percepção subjetiva de esforço). Prévio estudo demonstrou que esses valores da escala de percepção de esforço representam uma intensidade entre 50% e 70% do  $VO_2\text{max}$  (BORG, 1982).

#### 4.12 Coleta Sanguínea

Após jejum de aproximadamente 12 horas, as amostras de sangue foram obtidas de veia antecubital (15 ml), através da técnica asséptica com material de punção venosa, descartável e apropriado para a população estudada. Uma enfermeira especializada foi contratada para a coleta.

#### 4.13 Nitrito e nitrato ( $NO_x^-$ )

Amostras de plasma foram utilizadas para determinação da produção endógena de NO por meio da quantificação dos ânions nitrito ( $NO_2^-$ ) e nitrato ( $NO_3^-$ ), produtos terminais da oxidação do NO. As amostras foram ultra filtradas por meio de microfiltros (Microcon Centrifugal Filter Units, 10 kDa; Millipore, Bedford, MA, USA). Após esse procedimento, as concentrações de  $NO_x^-$  foram determinadas utilizando kit comercial (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) seguindo as instruções do fabricante. As absorbâncias dos picos foram determinadas a 540 - 550 nm.

#### 4.14 Extração do DNA Genômico

A extração do DNA genômico foi realizada pela técnica de fenol-clorofórmio modificada. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm por 10 min, o plasma descartado e os

eritrócitos lisados com uma mistura de soluções contendo  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,144M e  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,01M. Após centrifugação o sobrenadante foi desprezado. A seguir, a solução denominada TKM1 (Tris-HCl 10mM; pH 7,6; KCl 10mM;  $\text{MgCl}_2$  10mM; EDTA 20mM) foi adicionada ao precipitado juntamente com 1 gota de Triton X-100. As amostras, depois de homogeneizadas, foram centrifugadas a 3000 rpm por 20 min e posteriormente o sobrenadante foi descartado, obtendo-se o precipitado de leucócitos.

Para lisar os leucócitos, foram adicionados 400 $\mu\text{l}$  da solução TKM2 (Tris-HCl 10 mM pH 7,6; KCl 10mM;  $\text{MgCl}_2$  10mM; NaCl 0,4M; EDTA 20mM) e 25 $\mu\text{l}$  de SDS 10% e incubado à 55°C por 30 min. Após esse período, 180 $\mu\text{l}$  de NaCl 5M foram adicionados à solução anterior e mantida em temperatura ambiente por 15 min. A amostra foi centrifugada a 12000 rpm por 5 min e o sobrenadante transferido para outro tubo, adicionando 400 $\mu\text{l}$  de fenol pH 8,0 e igual volume de uma solução clorofórmio/álcool isoamílico (proporção 24:1), seguido de homogeneização, centrifugação e transferência do sobrenadante para outro tubo. Para a completa remoção de proteínas da amostra, 900 $\mu\text{l}$  da mistura clorofórmio/álcool isoamílico foram adicionados ao tubo, centrifugado e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Para a precipitação do DNA, foram adicionados 10% do volume do sobrenadante de acetato de sódio 3M pH 5,3 e 1ml de etanol absoluto gelado. O tubo foi centrifugado a 12000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi desprezado e o DNA precipitado foi lavado com 1ml de etanol 70% gelado. Posteriormente o DNA foi solubilizado em água deionizada estéril e quantificado em equipamento NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc, WILMINGTON, DE, USA) e a análise qualitativa realizada em gel de agarose 1,0%.

#### 4.15 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica de amplificação de DNA *in vitro*. A reação, catalisada por uma enzima termoestável (*Taq* DNA polimerase), utiliza primers que se hibridizam em fitas opostas de regiões específicas do DNA, delimitando o fragmento. Para esse procedimento, utilizou-se primers específicos para posição -786T>C do gene da eNOS, sendo estes: Sense - F: 5'- CACCCAGGCCACCCCAACT-3' e Antisense - R:5'-GCCGCAGGTCGACAGAG AGACT-3'. A reação então é levada ao termociclador e a amplificação desta região, a partir de uma pequena quantidade de DNA, ocorre em decorrência dos repetidos ciclos de temperatura: 94-96°C – desnaturação da dupla fita do

DNA; 55°C - anelamento dos *primers*, e 72°C – extensão dos mesmos, sendo observada para essa etapa, a incorporação dos nucleotídeos, resultando em um acúmulo exponencial dos fragmentos de DNA. A tabela 1 apresenta os produtos necessários para a PCR.

**Tabela 1-:** Produtos utilizados para a PCR

<b>Componentes</b>	<b>Volumes (µl)</b>
<b>eNOS -786T&gt;C</b>	
Tampão (10X)	3,0
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,2
dNTP's (10mM)	0,5
<i>Primer Sense</i> (10 µM)	0,5
<i>Primer Antisense</i> (10 µM)	0,5
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U/µl)	0,2
DNA (200 ng)	1,0
dH <sub>2</sub> O	23,1
<b>Volume Final (µl)</b>	<b>30,0</b>

**Tabela 2-:** Condições da reação de PCR para o polimorfismo -786T>C do gene da eNOS.

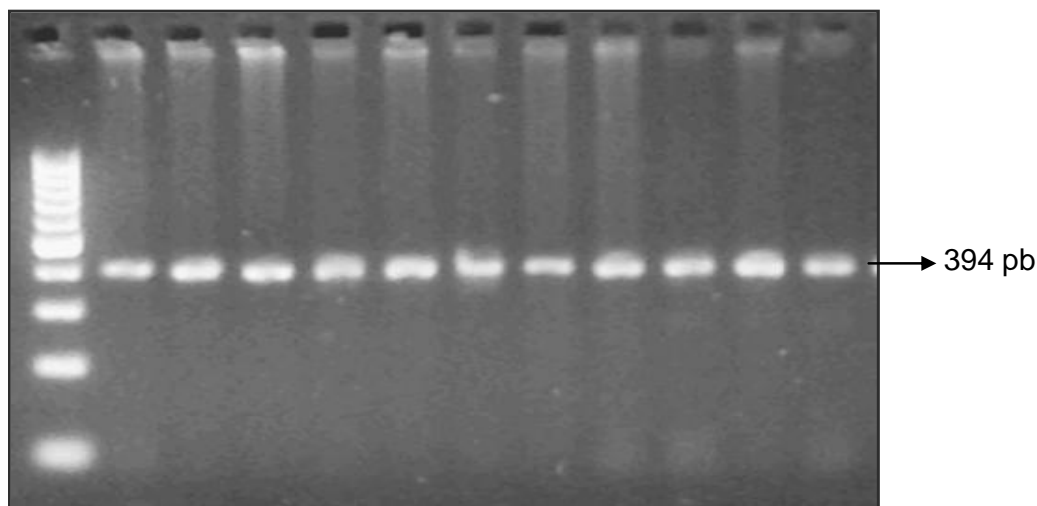
<b>Região</b>	<b>Desnaturação inicial</b>		<b>Desnaturação Anelamento Extensão 35 ciclos</b>				<b>Extensão Final</b>			
	T(°C)	Tempo	T(°C)	Tempo	T(°C)	Tempo	T(°C)	Tempo	T(°C)	Tempo
<b>eNOS -786</b>	94	2'	96	30''	54	30''	72	1'	72	5'

```

CTTATCCTCC ACTGCTTTTC AGAGGAGTCT GGCCAACACA AATCCTCTTG
TTTGTGGTGC TGTCTGTCTG CTGCTCCTAG TCTCTGCCTC TCCAGTCTC
TCAGCTTCCG TTTCTTTCTT AAACCTTCTC TCAGTCTCTG AGGTCTCGAA
ATCACGAGGC TTCGACCCCT GTGGACCAGA TGCCCAGCTA GTGGCCTTTC
TCCAGCCCCT CAGATGGCAC AGAACTACAA ACCCCAGCAT GCACTCTGGC
CTGAAGTGCC TGGAGAGTGC TGGTGTACCC CACCTGCATT CTGGGAACTG
TAGTTTCCCT AGTCCCCCAT GCTCCCACCA GGGCATCAAG CTCTTCCCTG
GCT(C)GGCTGAC CCTGCCTCAG CCCTAGTCTC TCTGCTGACC TGCG

```

**Figura 9.-:** Sequência Genotípica da Posição -786T>C do gene da eNOS (NCBI).



**Fig 10-** Produto da amplificação (PCR) do gene da eNOS para a posição -786T>C

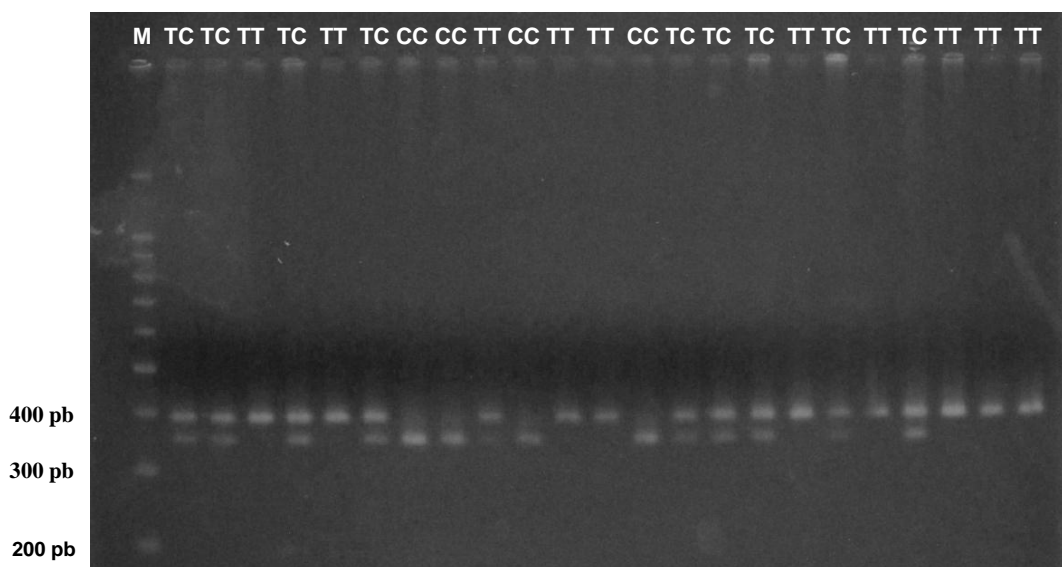
**Tabela 3-:** Primers utilizados para a PCR.

Gene	Sequência dos Primers (5'→ 3')	Produto PCR	Enzima	Produto Digestão
eNOS (-786T>C)	Sense - CTTATCCTCCACTGCTTTTCAGAG Anti Sense - CGCAGGTCAGCAGAGAGACTAG	394pb	<i>MspI</i>	352pb + 42pb

#### 4.16 Determinação do polimorfismo por análise de restrição (RFLP).

A determinação do polimorfismo da eNOS para posição -786T>C foi realizada pela PCR seguida de análise de restrição. Após confirmação da amplificação, o produto da PCR foi digerido utilizando endonucleases de restrição apropriadas para cada sítio polimórfico.

Para a análise utilizando endonucleases de restrição, foram utilizados: 8,0 µl do produto amplificado, 1,5 µl do tampão da enzima 10X e 2U da enzima correspondente a cada polimorfismo. Água deionizada e estéril foi adicionada para completar o volume de 15,0 µl e a mistura foi conduzida ao banho-maria a 37°C *overnight* (16 horas). O produto foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1000 a 2,5% (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), corado com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotografado.



**Fig. 11-** Produto da Digestão para a posição -786T>C do gene da eNOS

Utilizou-se um marcador de Peso Molecular Ladder de 100pb

Após a digestão, foram observadas as seguintes características para a região de interesse:

**Homozigoto Normal (T/T)** - 394pb;

**Heterozigoto (T/C)** - 394pb + 352pb + 42pb

**Homozigoto Mutante (C/C)** - 352pb + 42pb

A análise gênica de todos os participantes foi realizada no Hemocentro da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

#### 4.17 Análise Estatística

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para determinação da normalidade do conjunto de dados analisados. Posteriormente, utilizou-se uma análise descritiva (média e erro-padrão) seguida pelo teste t pareado para determinação da magnitude do efeito do treinamento sobre as variáveis estudadas. Por fim, utilizou-se o teste t não pareado para comparação dos momentos início do treinamento (Início T) e após treinamento (Após T) entre os subgrupos TT e TC+CC para normotensos e hipertensos. Adotou-se o nível de significância de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Resultados Gerais sem Avaliação Genética

Em relação à participação do estudo, das cento e uma voluntárias selecionadas apenas cinquenta e seis voluntárias realizaram todas as etapas do estudo, sendo observada uma perda amostral de 55,4%.

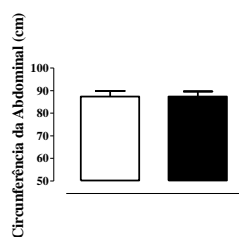
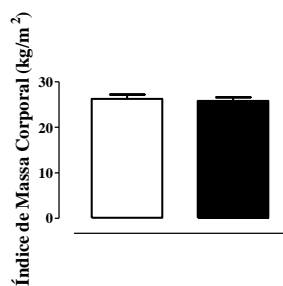
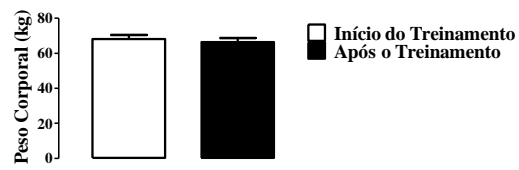
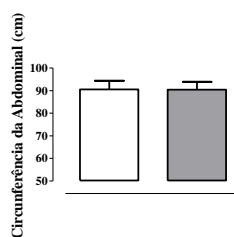
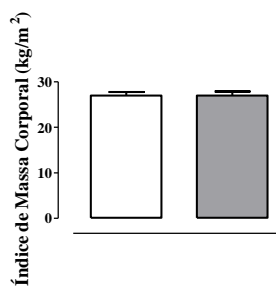
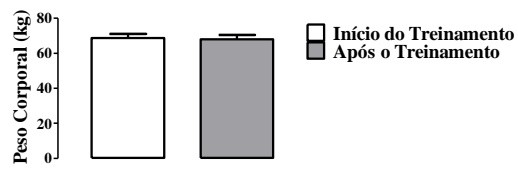
O grupo normotenso tinha em média  $51 \pm 4$  anos de idade e o grupo hipertenso tinha em média  $59 \pm 2$  anos de idade.

A **tabela 4** mostra as características antropométricas das voluntárias normotensas e hipertensas antes e após um programa de 6 meses de treinamento físico aeróbio. Podemos observar que o treinamento físico aeróbio por 6 meses não provocou qualquer alteração dos parâmetros avaliados como peso corporal, índice de massa corporal (IMC) e circunferência abdominal (CA). As voluntárias normotensas e hipertensas apresentaram sobrepeso segundo classificação para o IMC (WHO, 2002). A **figura 12** ilustra esses dados.

**Tabela 4.** Valores de peso corporal, índice de massa corporal (IMC) e circunferência abdominal (CA) de voluntárias normotensas e hipertensas no início (Início T) e após (Após T) um programa de treinamento físico aeróbio por 6 meses.

	Normotensas		Hipertensas	
	Início T	Após T	Início T	Após T
Peso (kg)	68,1 $\pm$ 2,4	66,4 $\pm$ 2,3	68,8 $\pm$ 2,2	68,0 $\pm$ 2,4
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	26,3 $\pm$ 0,9	25,8 $\pm$ 0,8	27,0 $\pm$ 0,8	27,0 $\pm$ 0,9
CA (cm)	87,4 $\pm$ 2,5	87,4 $\pm$ 2,2	90,6 $\pm$ 3,8	90,5 $\pm$ 3,4

Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média para voluntárias normotensas (n=28) e hipertensas (n=27).

**NORMOTENSAS****HIPERTENSAS**

**Figura 12.** Valores de peso corporal, índice de massa corporal e circunferência abdominal de voluntárias normotensas e hipertensas no início e após treinamento físico aeróbio por 6 meses. Os valores representam as médias  $\pm$  erro padrão para 28 mulheres normotensas e hipertensas em cada grupo.



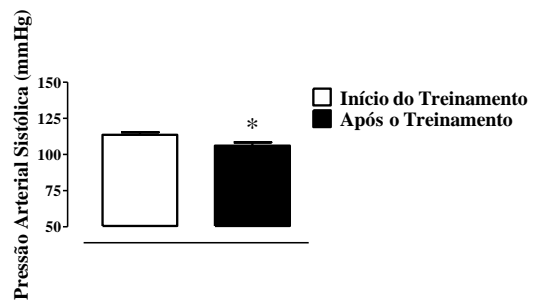
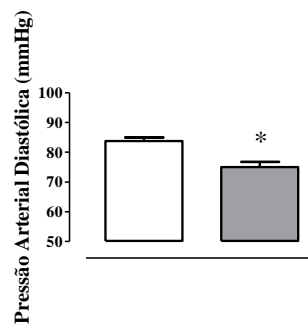
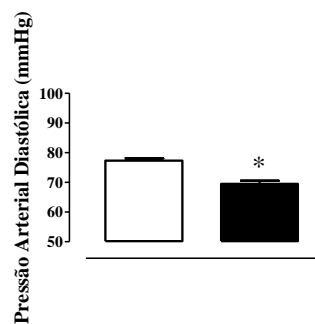
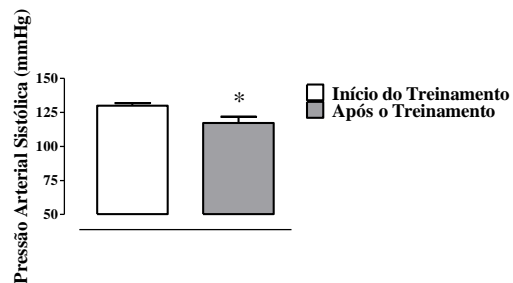
A **tabela 5** mostra os valores de PAS e PAD de voluntárias normotensas e hipertensas no início e após treinamento físico por 6 meses. Podemos observar que o programa de treinamento físico empregado foi efetivo em reduzir os níveis pressóricos de maneira significativa tanto para a PAS (grupo normotenso: **-6,5%** e grupo hipertenso: **-9,6%**) quanto para PAD (grupo normotenso: **-10%** e grupo hipertenso: **-10%**). A **figura 13** ilustra esses dados.

**Tabela 5.** Valores de PAS e PAD para o grupo de voluntárias normotensas e hipertensas no início (Início T) e após (Após T) 6 meses de treinamento aeróbio.

	Normotensas		Hipertensas	
	Início T	Após T	Início T	Após T
<b>PAS (mmHg)</b>	113,6±1,8	106,2±2,2*	130,0±1,8	117,4±4,4*
<b>PAD (mmHg)</b>	77,3±0,8	69,5±1,1*	83,8±1,2	75,0±1,8*

Os dados estão expressos em média ± erro padrão.

\*Diferente significativamente dos valores obtidos no início do estudo. PAS: Pressão Arterial Sistólica; PAD: Pressão Arterial Diastólica. Voluntárias normotensas (n=28) e hipertensas (n=28).

**NORMOTENSAS****HIPERTENSAS**

**Figura 13.** Valores de PAS e PAD do grupo de voluntárias normotensas e hipertensas no início e após um programa de treinamento físico aeróbio por 6 meses. Os valores representam as médias  $\pm$  erro padrão (n=28 para ambos os grupos) \*p<0,05.

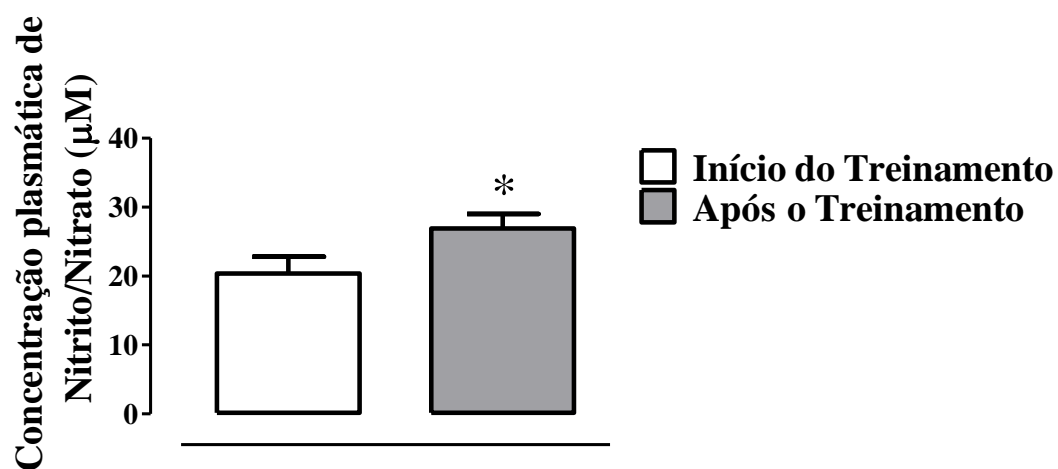
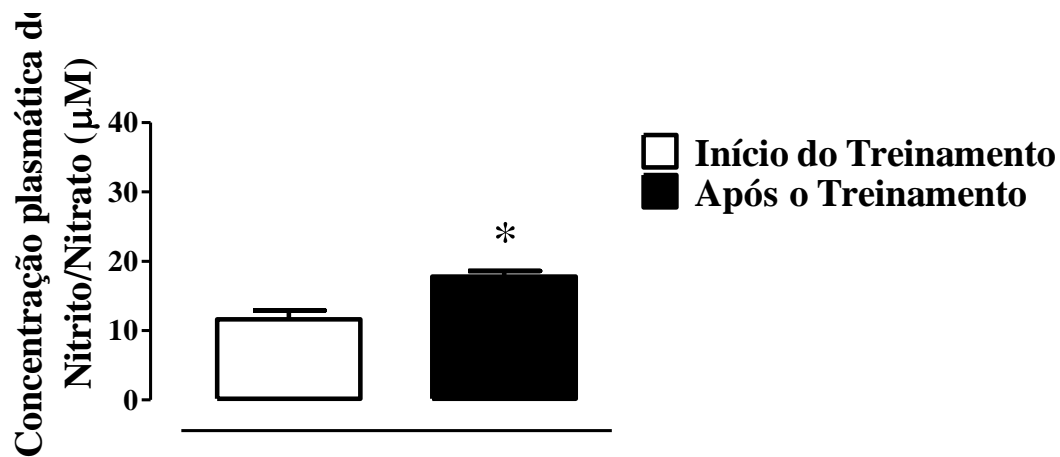
O protocolo de treinamento físico aeróbio foi eficaz em aumentar as concentrações plasmáticas de NOX<sup>-</sup>, que reflete a produção de óxido nítrico (NO). Os valores de NOX<sup>-</sup> plasmático em voluntárias normotensas aumentaram em 34,8%, enquanto que para as voluntárias hipertensas a elevação foi de 24,1%, sendo estes valores estatisticamente significativos para ambos os grupos (normotensas e hipertensas). A **tabela 6** e **figura 14** mostram esses dados.

**Tabela 6.** Valores de NOX<sup>-</sup> plasmáticos em voluntárias normotensas e hipertensas no início (Início T) e após (Após T) 6 meses de treinamento aeróbio.

	Normotensas		Hipertensas	
	Início T	Após T	Início T	Após T
NOX <sup>-</sup> ( $\mu$ M)	11,6 $\pm$ 1,3	17,8 $\pm$ 0,8*	20,4 $\pm$ 2,4	26,9 $\pm$ 2,1*

Dados estão expressos como média  $\pm$  SEM.

\*Diferente significativamente dos valores obtidos no início do estudo. NOX<sup>-</sup>: Concentrações plasmáticas de nitrito e nitrato. Voluntárias normotensas (n=28) e hipertensas (n=28).



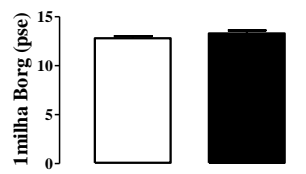
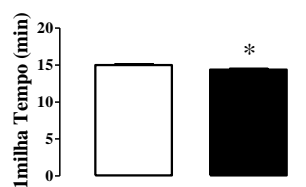
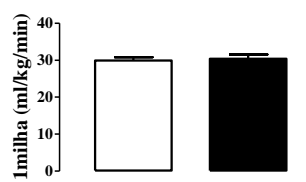
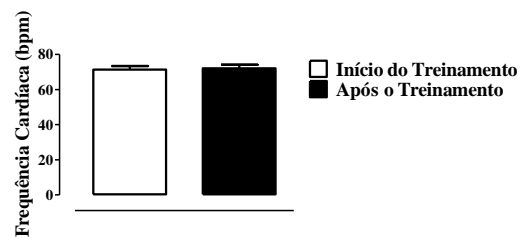
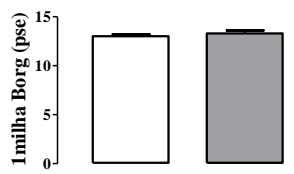
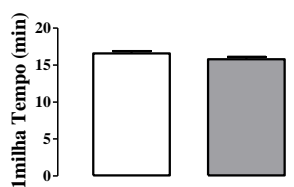
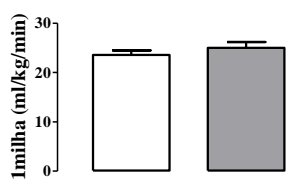
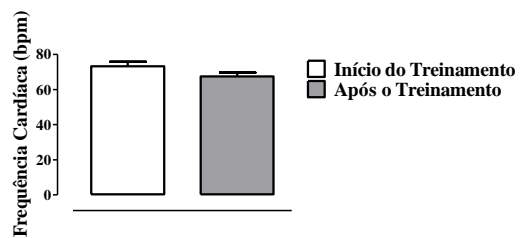
**Figura 14.** Concentração plasmática de  $\text{NOX}^-$  de voluntárias normotensas e hipertensas no início e após treinamento físico aeróbio por 6 meses. Os valores representam as médias  $\pm$  SEM para 28 voluntárias normotensas e 28 voluntárias hipertensas. \* $P < 0,05$ .

O treinamento físico aeróbio por 6 meses não modificou os valores de frequência cardíaca, VO<sub>2</sub> máximo e da percepção subjetiva de esforço para as voluntárias normotensas assim como para as voluntárias hipertensas. Os dados estão sumarizados na **tabela 7**. Em relação ao tempo de execução para o teste de 1 milha, foi observada redução estatisticamente significativa após treinamento físico aeróbio para o grupo de voluntárias normotensas, sendo esta redução de 4%. Entretanto, para o grupo de voluntárias hipertensas não foi observada redução estatisticamente significativa após treinamento físico aeróbio por 6 meses. Os dados estão mostrados abaixo na **tabela 7** e ilustrados nas **figura 15**.

**Tabela 7.** Valores de frequência Cardíaca. (FC ), consumo máximo de oxigênio teste de 1 milha (1milha), consumo máximo de oxigênio teste de Astrand (Astrand), Tempo de execução do teste de 1 milha (1 milha T) e Percepção Subjetiva de Esforço (1 milha borg) durante o teste de VO<sub>2</sub> max para as voluntárias normotensas e hipertensas no início (Início T) e após (Após T) treinamento físico aeróbio por 6 meses.

	Normotensas		Hipertensas	
	Início T	Após T	Início T	Após T
<b>FC (bpm)</b>	71,4±2,0	72±2,1	73,3±2,5	67,5±2,2
<b>1 milha (ml/kg/min)</b>	29,9±0,9	30,4±1,2	23,6±0,9	25,0±1,2
<b>1milha T (min)</b>	15,0±0,1	14,4±0,1*	16,4±0,3	15,8±0,3
<b>1milha borg (pse)</b>	12,8±0,2	13,3±0,3	13,0±0,2	13,3±0,3
<b>Astrand (ml/kg/min)</b>	23,4±0,9	23,7±1,4	18,9±0,8	19,1±0,9

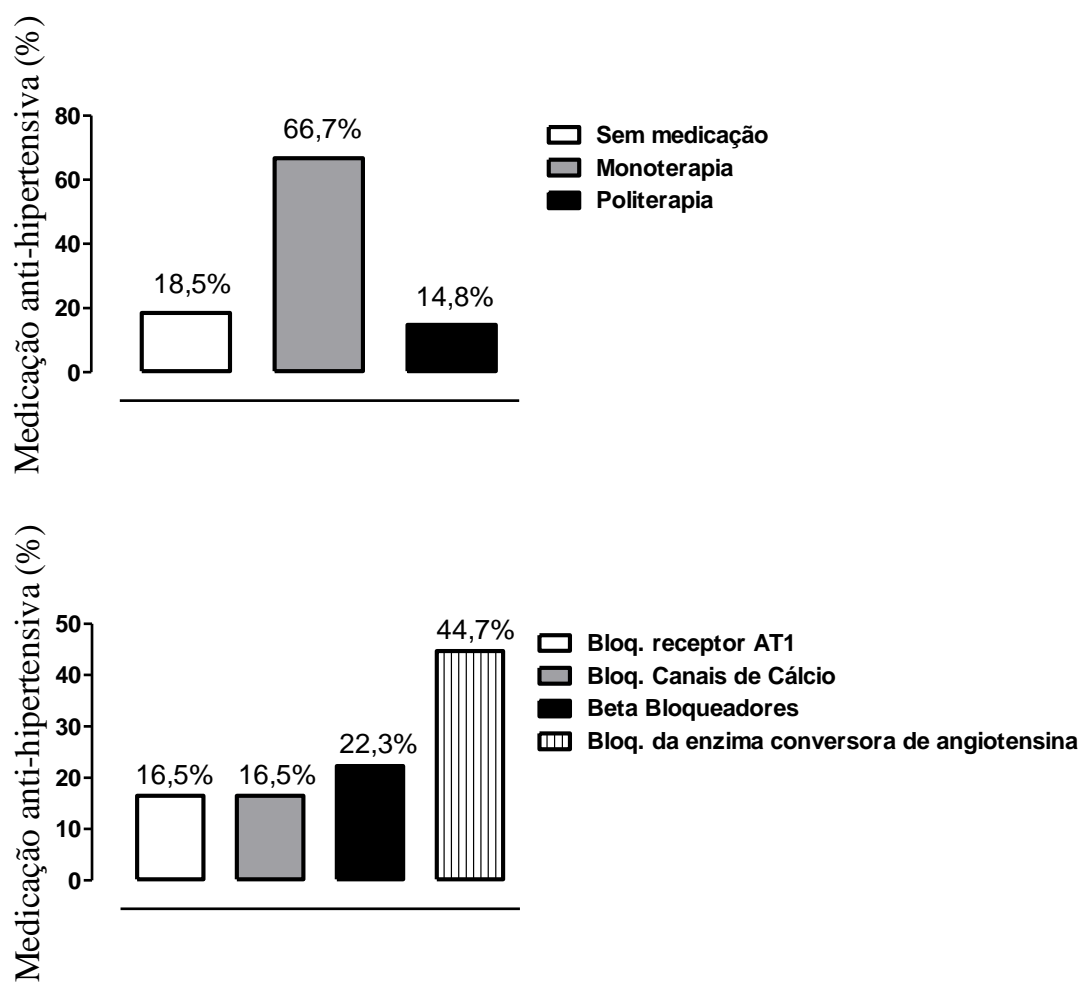
\*Diferente significativamente dos valores obtidos no início do estudo. Os dados estão expressos em média ± erro padrão. FC - Frequência Cardíaca (bpm); 1milha - consumo máximo de oxigênio teste de 1milha (ml/kg/min); Astrand - consumo máximo de oxigênio teste de Astrand (ml/kg/min); VO<sub>2</sub>máx T - Tempo de execução do teste de 1 milha (min) e VO<sub>2</sub> Borg pse – Percepção Subjetiva de Esforço. Voluntárias normotensas (n=28) e hipertensas (n=28); \*p<0,05%.

**NORMOTENSAS****HIPERTENSAS**



**Figura 15.** Frequência Cardíaca, consumo máximo de oxigênio do teste de 1milha, Tempo de Execução do Teste de 1 milha, Percepção Subjetiva de Esforço do teste de 1milha e consumo máximo do teste de Astrand do grupo de voluntárias normotensas e hipertensas no início e após um programa de treinamento físico aeróbio de 6 meses. Os valores representam as médias  $\pm$  erro padrão para 28 voluntárias normotensas e 28 voluntárias hipertensas. \* $p < 0,05$ .

Em relação a medicação anti-hipertensiva, do total de 28 voluntárias hipertensas, 18,5% não fazia uso de medicação, 66,7% fazia uso de monoterapia e 14,8% fazia uso de politerapia. Do total de monoterapias, 16,5% fazia uso dos bloqueadores do receptor AT1, 16,5% fazia uso dos bloqueadores dos canais de cálcio, 22,3% fazia uso dos beta bloqueadores e 44,7% fazia uso dos inibidores da enzima conversora de angiotensina (**figura 16**).



**Figura 16.** Percentual de medicamentos anti-hipertensivos utilizados pelas voluntárias hipertensas



### 5.2 Resultados com Avaliação Genética

Todas as voluntárias foram avaliadas para o polimorfismo da posição -786T>C do gene da eNOS com base nas amostras de DNA. Após análise de RFLP, foi possível identificar três genótipos: TT (32,1% e 17,8%), TC (57,2% e 67,8%) e CC (10,7% e 10,7%) no grupo de voluntárias normotensas e hipertensas respectivamente. **Tabela 8** mostra essa distribuição para os genótipos.

**Tabela 8.** Divisão genotípica para a posição -786T>C e porcentagem de voluntárias normotensas e hipertensas de acordo com a presença ou ausência do polimorfismo do gene da eNOS na posição -786T>C.

Genótipo	NT		HT	
	n	%	n	%
TT	9	32,1	5	17,8
TC	16	57,2	19	67,8
CC	3	10,7	3	10,7
<b>TC+CC</b>	<b>19</b>	<b>67,9</b>	<b>22</b>	<b>78,5</b>

Onde: TT – Homozigoto não Mutante; TC – Heterozigoto; CC – Homozigoto Mutante.

A partir das análises genéticas, as voluntárias normotensas e hipertensas foram divididas em dois grupos de acordo com base na sequência de nucleotídeos observados para a posição -786T>C do gene da eNOS.

A **Tabela 9** mostra os valores de PAS e PAD das voluntárias normotensas e hipertensas com ou sem o polimorfismo para a posição -786T>C do gene da eNOS no início e após treinamento físico aeróbio realizado por 6 meses.

Em relação ao grupo de voluntárias normotensas, o subgrupo TT apresentou uma redução estatisticamente significativa para a PAS bem como para a PAD, de cerca de 11,7% e 9,0%, respectivamente. Para o subgrupo TC+CC foi observada redução estatisticamente significativa apenas para a PAD, de cerca de 9,3%.

Em relação ao grupo de voluntárias hipertensas, o subgrupo TT não apresentou redução dos valores pressóricos tanto para a PAS quanto para a PAD. Entretanto, para o subgrupo TC+CC foram observadas reduções significativas tanto para a PAS quanto para a PAD, de cerca de 7,7% e 9,0%, respectivamente (**Tabela 9**). As **figuras 17 e 18** ilustram esses dados.

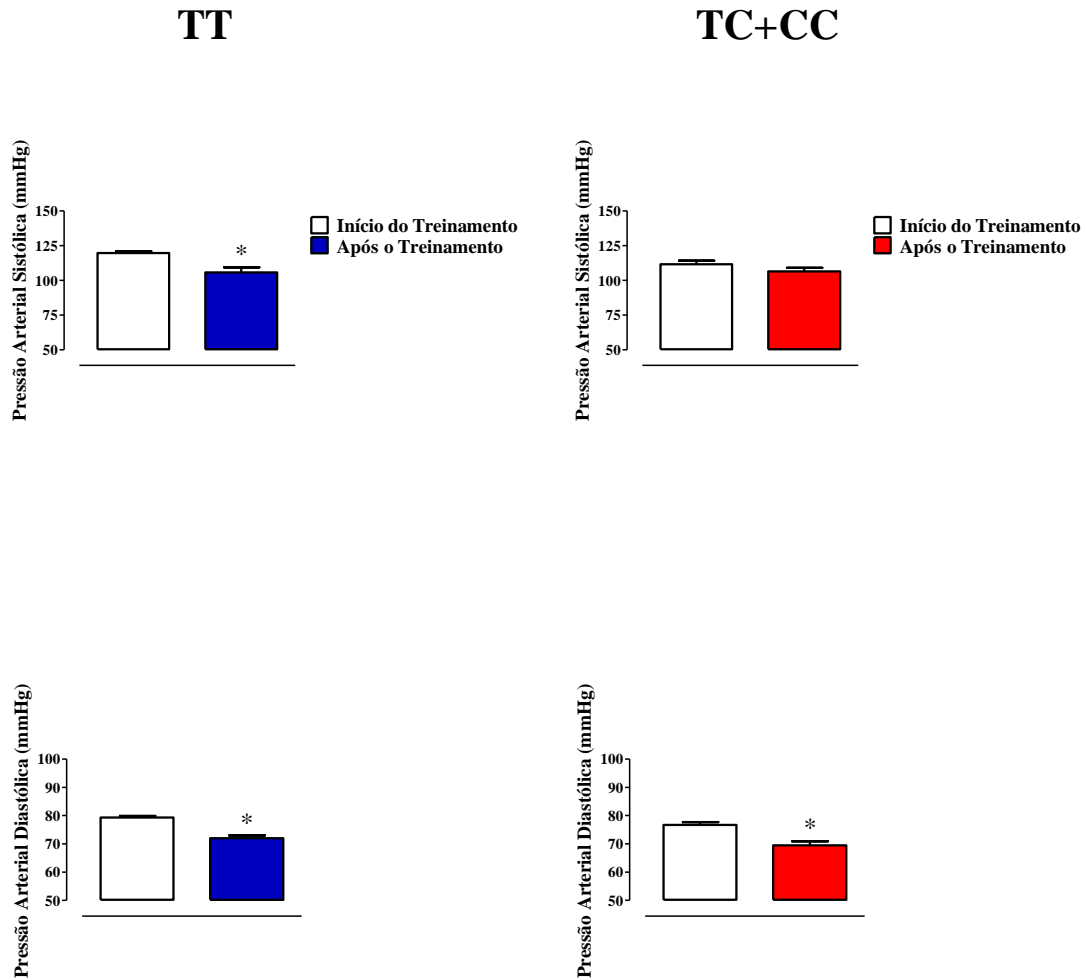
**Tabela 9.** Valores de pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica em mulheres normotensas e hipertensas, subdivididas em relação ao genótipo para a posição -786T>C do gene da eNOS, no início (Início T) e após (Após T) treinamento físico aeróbico de 6 meses com ou sem polimorfismo para o gene da eNOS para a posição -786T>C.

Parâmetros	NT				HT							
	TT (n=9)		TC+CC (n=19)		TT (n=5)		TC+CC (n=22)					
	Início T	Após T	Δ%	Início T	Após T	Δ%	Início T	Após T	Δ%			
PAS, mmHg	119.7±1.3	105.7±3.8*	-11.6	111.7±2.4	106.5±2.5	-4.6	126.0±3.4	119.6±4.8	-5.1	130.3±2.0	120.3±2.5	-7.7
PAD, mmHg	79.3±0.6	72.0±1.0*	-9.0	76.7±1.0	69.5±1.4*	-9.3	82.0±2.2	70.2±5.6*	-14.4	84.2±1.4	76.6±1.8*	-9.0

Os dados estão expressos em média ± erro padrão.

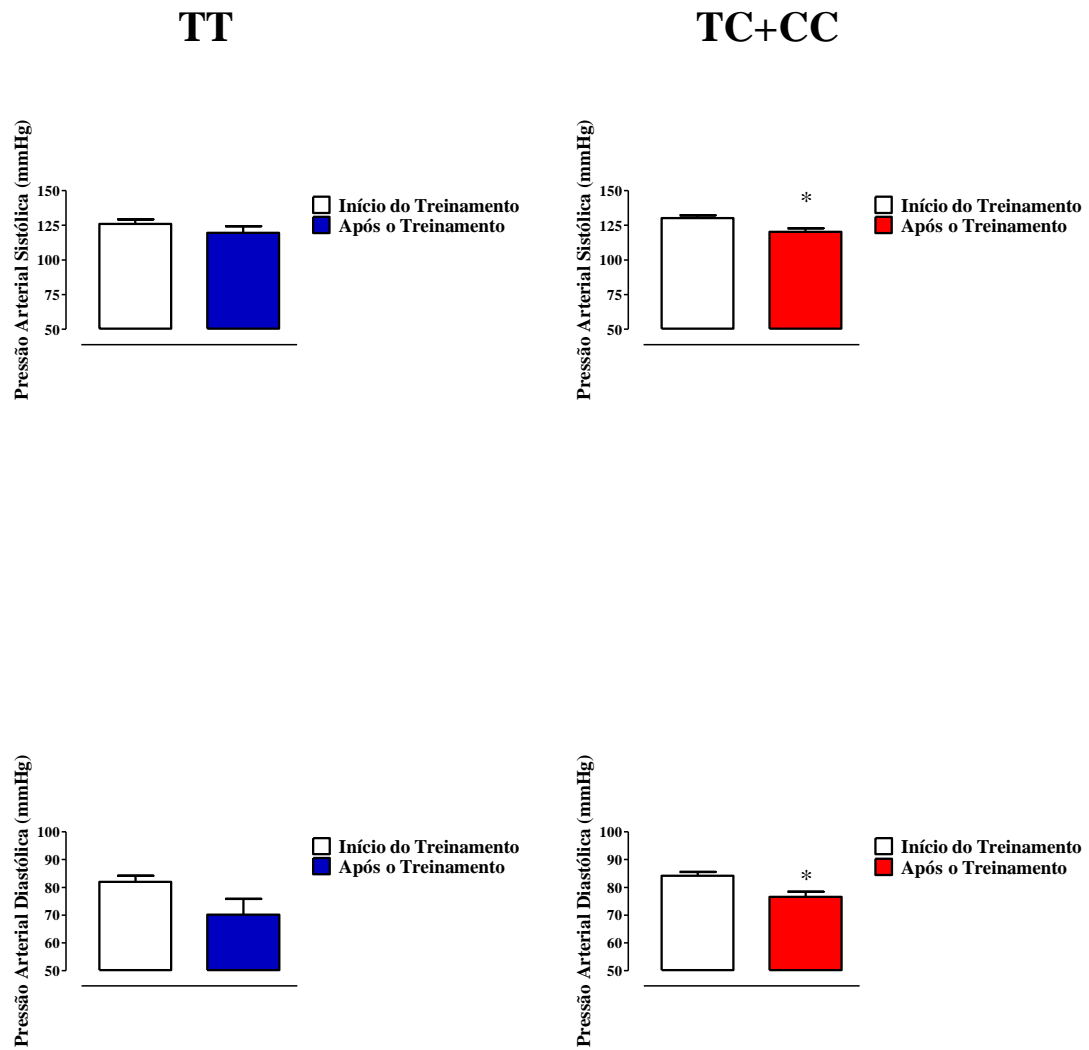
\*Diferente significativamente dos valores obtidos no início do estudo. PAS: pressão arterial sistólica e PAD: pressão arterial diastólica.  
p<0,05%.

## NORMOTENSAS



**Figura 17.** Pressão arterial sistólica e pressão arterial diastólica do grupo de voluntárias normotensas subdivididas em relação ao genótipo para a posição -786T>C do gene da eNOS no início e após um programa de treinamento físico aeróbio de 6 meses. \* $p < 0,05$ .

# HIPERTENSAS



**Figura 18.** Pressão arterial sistólica e pressão arterial diastólica do grupo de voluntárias hipertensas subdivididas em relação ao genótipo para a posição -786T>C do gene da eNOS no início e após um programa de treinamento físico aeróbio de 6 meses. \* $p < 0,05$ .

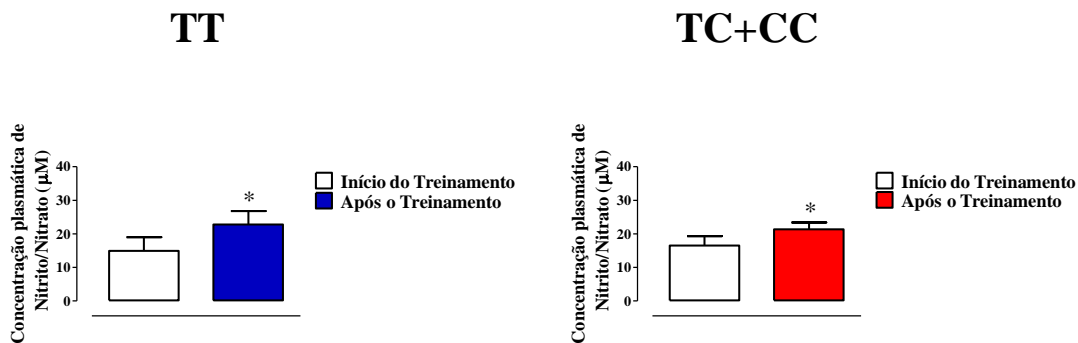
O programa de treinamento físico aeróbio promoveu elevação significativa dos níveis plasmáticos de NOX<sup>-</sup> para ambos os grupos (normotensos e hipertensos) em relação à subdivisão pelo genótipo (TT e TC+CC), sendo: Normotensas TT – 53% e TC+CC – 29.7%; Hipertensas TT – 91% e TC+CC – 30%. A **Tabela 10** e a **figura 19** resumizam esses dados.

**Tabela 10.** Valores das concentrações plasmáticas de NOX<sup>-</sup> em mulheres normotensas e hipertensas subdivididas em relação ao genótipo para a posição -786T>C do gene da eNOS no início (Início T) e após (Após T) treinamento físico aeróbio de 6 meses.

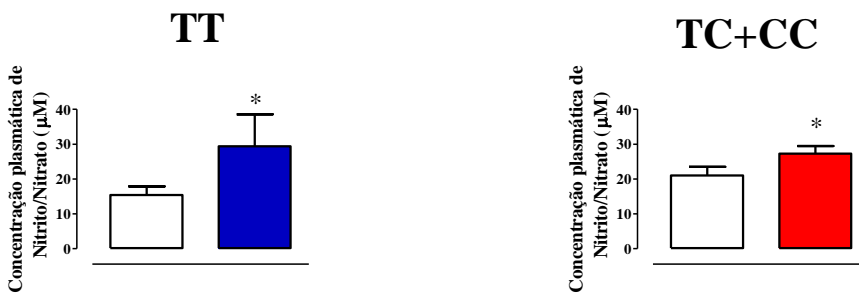
Parâmetro	NT				HT							
	TT (n=9)		TC+CC (n=19)		TT (n=5)		TC+CC (n=22)					
	Início T	Após T	Δ%	Início T	Após T	Δ%	Início T	Após T	Δ%			
NOX <sup>-</sup> , uM	14.9±4.1	22.8±4.0*	53.0	16.5±2.8	21.4±2.0*	29.7	15.4±2.5	29.4±9.2*	90.9	21.0±2.5	27.3±2.2*	30.0

Os dados estão expressos em média ± erro padrão. \*Diferente significativamente dos valores obtidos no início do estudo. NOX<sup>-</sup> - concentração plasmática de nitrito/nitrato. p<0,05%.

## NORMOTENSAS



## HIPERTENSAS



**Figura 19.** Concentração plasmática de  $\text{NO}_x^-$  do grupo de voluntárias normotensas e hipertensas subdivididas em relação ao genótipo para a posição -786T>C do gene da eNOS no início e após um programa de treinamento físico aeróbio de 6 meses. \* $p < 0,05$ .

## 6. RESUMO DOS RESULTADOS

**Tabela 11.** Resumo dos resultados sem divisão genotípica para o polimorfismo da posição -786T>C do gene da eNOS para o grupo de voluntárias normotensas (NT) e hipertensas (HT) em resposta ao treinamento físico aeróbio realizado por 6 meses.

<b>Parâmetros</b>	<b>NT</b>	<b>HT</b>
Peso	n.s	n.s
IMC	n.s	n.s
CA	n.s	n.s
PAS	Redução significativa	Redução significativa
PAD	Redução significativa	Redução significativa
NOX	Incremento significativo	Incremento significativo
1 milha	n.s	n.s
1 milha T	Redução significativa	n.s
1 milha borg	n.s	n.s
Astrand	n.s	n.s
FC	n.s	n.s

n.s = não significativo,  $p < 0,05$ .

**Tabela 12.** Resumo dos resultados com divisão genotípica para o polimorfismo da posição -786T>C do gene da eNOS para o grupo de voluntárias normotensas (NT) e hipertensas (HT) em resposta ao treinamento físico aeróbio realizado por 6 meses.

<b>Parâmetros</b>	<b>NT</b>		<b>HT</b>	
	<b>TT</b>	<b>TC+CC</b>	<b>TT</b>	<b>TC+CC</b>
PAS	Redução significativa	n.s	n.s	n.s
PAD	Redução significativa	Redução significativa	Redução significativa	Redução significativa
NOX-	Incremento significativo	Incremento significativo	Incremento significativo	Incremento significativo

n.s = não significativo,  $p < 0,05$ .



## 7. DISCUSSÃO

Sabe-se que a prática de exercício físico promove maior longevidade e menor morbidade. Além disso, o exercício físico acarreta melhor controle de peso. Nossos resultados mostram que seis meses de treinamento não promoveram qualquer alteração nos parâmetros antropométricos. Esse dado é similar ao observado em estudo prévio realizado em nosso laboratório onde mulheres após a menopausa apresentaram maior dificuldade em reduzir seu peso corporal em resposta ao exercício físico (ZAROS et al., 2009). A razão para isso poderia ser que as voluntárias não tiveram restrição calórica durante o estudo. Além disso, um estudo mostrou que a redução do peso corporal é observada principalmente quando o treinamento físico é realizado em associação com a restrição calórica (HANSEN et al., 2007). Outra possibilidade para explicar a falta de mudança no IMC poderia estar relacionada ao incremento da massa muscular observada durante o treinamento físico. Prévio estudo demonstrou que o percentual de gordura estava diminuído e a massa magra estava aumentada em mulheres treinadas (STARON et al., 1990). Considerando a faixa etária e a queda no metabolismo em mulheres de meia idade e na menopausa, nossos dados mostram que o exercício físico foi efetivo em evitar ganho de peso corporal na população estudada.

Com relação à capacidade aeróbia, observamos que o protocolo de treinamento físico não provocou qualquer alteração nos valores de  $VO_2$  máx em ambos os grupos de voluntárias, normotensas e hipertensas. No entanto, é necessário enfatizar que as mulheres normotensas apresentaram maior consumo de oxigênio quando comparadas às voluntárias hipertensas. Além disso, as voluntárias normotensas apresentaram redução significativa no tempo total de execução do teste após 6 meses de treinamento.

Estudos prévios mostram de maneira consistente que a utilização de exercícios aeróbios de intensidade baixa a moderada (40 -70 de  $VO_2$  máx) é mais eficaz para a promoção da redução da pressão arterial do que a utilização de intensidade acima de 75% do  $VO_2$  máx (extenuante) (HAGBERG et al, 2003; FAGARD, 2001; JONES et. al., 2009). Além disso, resultados obtidos em nosso laboratório mostram que os efeitos benéficos do exercício físico estão diretamente associados à maior produção de NO ou aumento na expressão de enzimas antioxidante, aumentando a biodisponibilidade do NO para as células musculares lisas (MORAES et al., 2008; ZAROS et al., 2009). Nossos resultados mostram que tanto as mulheres normotensas como hipertensas (sem subdivisão por genótipo) apresentaram redução significativa da pressão arterial mostrando que tanto a intensidade do exercício para essa faixa etária quanto a duração do exercício físico aeróbio mostraram-se eficientes na promoção da

redução dos níveis pressóricos. Os mecanismos pelos quais ocorre redução da pressão arterial em resposta ao exercício físico são múltiplos e complexos. Acredita-se que a liberação de substâncias vasodilatadoras pelas células endoteliais é um dos principais mecanismos da redução de pressão arterial após exercício físico. De fato, o aumento do fluxo sanguíneo e consequentemente da força de cisalhamento (shear stress) pode ser considerado como um poderoso estímulo para a liberação do NO pelas células endoteliais (ZANESCO & ANTUNES, 2007). No entanto, trabalhos estudando pacientes com polimorfismo para o gene da eNOS na posição -786T>C, mostram que a presença do alelo C reduz em 50% a produção de NO (MIYAMOTO et al., 1998). Nossos resultados mostram que os valores basais de NO não foram diferentes entre as voluntárias com ou sem o polimorfismo para o gene da eNOS na posição -786T>C em ambos os grupos, normotensas e hipertensas, confirmando trabalhos prévios que mostraram não haver diferença na concentração plasmática de  $\text{NOx}^-$  em voluntários hipertensos e normotensos (METZER ET AL., 2005; SANDRIM ET AL., 2007). Por outro lado, o estímulo físico pelo treinamento físico aeróbio por 6 meses mostrou claramente que as mulheres com genótipo TT para o gene da eNOS na posição -786T>C são mais responsivas para a produção de NO quando comparadas àquelas com genótipo TC+CC, pois tiveram um aumento de 50-90% na concentração plasmática de  $\text{NOx}^-$ , enquanto que o grupo com polimorfismo a elevação da concentração plasmática de  $\text{NOx}^-$  em resposta ao exercício físico foi de cerca de 30%. De fato, trabalho prévio avaliando o efeito do shear stress em cultura de células endoteliais mostrou que a expressão do RNAm para eNOS era genótipo dependente, sendo  $\text{TT} \gg \text{TC} \gg \text{CC}$  (CATTARUZZA et al., 2004).

Com relação à presença de polimorfismo para o gene da eNOS na posição -786T>C, redução de pressão arterial e concentração plasmática de  $\text{NOx}^-$  em resposta ao exercício físico, nossos dados mostram que em alguns grupos existe uma correlação positiva, enquanto que em outros isso não ocorre, isso possivelmente deve-se ao número de voluntárias (n = 5), pois quando associamos todas as voluntárias, verificamos que as mulheres com o genótipo TT são mais responsivas ao exercício físico na redução da pressão arterial do que àquelas com genótipo TC+CC (SPONTON et. al , 2010).

## 8. CONCLUSÕES

Nosso estudo mostra que:

- A presença do polimorfismo para a posição -786T>C do gene da eNOS não afeta a concentração basal de NOX<sup>-</sup>, mas quando empregado um estímulo, exercício físico, a concentração de NOX<sup>-</sup> é significativamente menor nas voluntárias com polimorfismo para esta posição tanto em mulheres normotensas quanto hipertensas;
- A redução da pressão arterial em resposta ao exercício físico das voluntárias mostrou-se ser genótipo dependente.

## 9. REFERÊNCIAS

ACSM/AHA. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. **Circulation**. v. 28, n. 116(9), p. 1081-93, 2007.

AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. Position Stand. Exercise and hypertension. **Med Sci Sports Exerc**. v. 36(3), p. 533-53, 2004.

AMERICAN HEART ASSOCIATION (AHA). Heart Disease and Stroke Statistics 2010 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v.121(7), n.23, p. e46-e215, 2010.

ANDREW P.J.; MAYER B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. **Cardiovasc Res.**; v. 43(3), p.521-31, 1999.

ANDRADE, D.R.; SOUZA, R.B.; SANTOS, S.A.; ANDRADE, D.H. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **J Bras. Pneumol.**, v. 31, p. 60-68, 2005.

ARAÚJO, C. G. S. **Manual de testes de esforço**. 2o ed. Rio de Janeiro. Ao livro Técnico, 1984.

ASTRAND P.O.; RYHMING I. A nomogram for calculation of aerobic capacity (physical fitness) from pulse rate during sub-maximal work. **J Appl Physiol**. v. 7(2), p. 218-21, 1954.

ÂSTRAND, Per-olof. **Tratado de fisiologia do exercício**. 2o ed. Rio de Janeiro: Gunabara, 1987.

AUGERI, A.L.; TSONGALIS, G.J.; VAN HEEST, J.L.; MARESH, C.M.; THOMPSON, P.D.; PESCATELLO, L.S. The endothelial nitric oxide synthase -786 T>C polymorphism and the exercise-induced blood pressure and nitric oxide responses among men with elevated blood pressure. **Atherosclerosis**, v. 204, n.2, p. 28-34, 2009.

BALASUBRAMANIAN, S.P.; COX, A.; BROWN, N.J.; REED, M.W. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. **Eur J Surg Oncol**, v. 30, p. 593-601, 2004.

BECKMAN, J.S.; KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am J Physiol.**, v. 271, n.5 (Pt 1), p. C1424-37, 1996.

BERNIER, S.G.; HALDAR, S.; MICHEL, T. Bradykinin-regulated interactions of the mitogen-activated protein kinase pathway with the endothelial nitric-oxide synthase. **J Biol Chem**, v. 275, p. 30707–30715, 2000.

BLOCH, K.V.; RODRIGUES, C.S.; FISZMAN, R. Epidemiologia dos fatores de risco para hipertensão arterial – uma revisão crítica da literatura brasileira. Ver. **Bras. Hipertens.**, v.13, n. 2, 134-43, 2006.

BOISSIERE, J. ; LEMAIRE, M.C. ; ANTIER, D. ; COURTEIX, D. ; BONNET, P. Exercise and vasorelaxing effects of CO-releasing molecules in hypertensive rats. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 38, n. 4, p. 652-9, 2006.

BOO, Y.C.; JO, H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v. 285, n. 3, p. C499-508, 2003.

BORG GA. Psychophysical bases of perceived exertion. **Med Sci Sports Exerc.**v. 14(5), p. 377-81, 1982.

BORG, G. **Escala de Borg para a dor e esforço percebido**. São Paulo . Manole, 2000.

BOWLES, D.K.; WAMHOFF, B.R. Coronary smooth muscle adaptation to exercise: does it play a role in cardioprotection? **Acta Physiol Scand.**, v.178, n. 2, p. 117-21, 2003.

BRANDÃO RONDON, M.U.P.; BRUM, P.C. Exercício físico como tratamento não-farmacológico da hipertensão arterial. Revista Brasileira de Hipertensão. V. 10, n.2, p. 134-139, 2003

BUSSE, R.; MÜLSCH, A.; FLEMING, I.; HECKER, M. Mechanism of Nitric Oxide release from the vascular endothelium. **Circulation**, v.87, suppl., p.18-25, 1993.

CASAS, J.P.; BAUTISTA, L.E.; HUMPHRIES, S.E.; HINGORANI, A.D. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. **Circulation**, v. 109, n. 11, p. 1359-65, 2004.

CASAS, J.P.; CAVALLERI, G.L.; BAUTISTA, L.E.; SMEETH, L.; HUMPHRIES, S.E.; HINGORANI, A.D. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: a HuGE review. **Am J Epidemiol.**, v. 164, n. 10, p. 921-35, 2006.

CATTARUZZA, M.; GUZIK, T.J.; SLODOWSKI, W.; PELVAN, A.; BECKER, J.; HALLE, M.; BUCHWALD, A.B.; CHANNON, K.M.; HECKER, M. Shear stress insensitivity of endothelial nitric oxide synthase expression as a genetic risk factor for coronary heart disease. **Circ Res.**, v.95, n. 8, p.841-7, 2004.

CHEN, H.I.; CHIANG, I.P. Chronic exercise decreases adrenergic agonist-induced vasoconstriction in spontaneously hypertensive rats. **Am J Physiol.**, v. 271, p. H977-83, 1996.

CHOBANIAN A.V.; BAKRIS G.L.; BLACK H.R.; CUSHMAN W.C.; GREEN L.A.; IZZO J.L. Jr.; JONES D.W.; MATERSON B.J.; OPARIL S.; WRIGHT J.T JR.; ROCCELLA E.J.; Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **Hypertension.** v. 42(6), p. 1206-52, 2003.

COYLEWRIGHT, M.; RECKELHOFF, J.F.; OUYANG, P. Menopause and hypertension: an age-old debate. **Hypertension.**, v. 51, n. 4, p. 952-9, 2008.

DALY, A.K.; DAY, C.P. Candidate gene case – control association studies: advantages and potential pitfalls. **Br J Clin Pharmacol.**, v.52, p. 489-99, 2001.

DATA, S.A.; ROLTSCH, M.H.; HAND, B.; FERRELL, R.E.; PARK, J.J.; BROWN, M.D. eNOS T-786C Genotype, Physical Activity and Peak forearm Blood Flow in Females. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v.35, p. 1991-7, 2003.

DIMMELER, S.; FLEMING, I.; FISSLTHALER, B.; HERMANN, C.; BUSSE, R.; ZEIHNER, A.M. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. **Nature**, v.399, p. 601-5, 1999.

V DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL (SBH). Arq. Bras. Cardiol.v.89, n.3, p. e24-e79, 2007

DÓREA, E.L.; LOTUFO, P.A. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica. **Hipertensão.** v. 7, p. 86-9, 2004.

DOSENKO, V.E.; ZAGORIY, V.Y.; HAYTOVICH, N.V.; GORDOK, O.A.; MOIBENKO, A.A. Allelic polymorphism of endothelial NO-synthase gene and its functional manifestations. **Acta Biochim Pol**, v.53, p. 299-302, 2006.

DUNCAN, J.J.; FARR, J.E.; UPTON, S.J.; HAGAN, R.D.; OGLESBY, M.E.; BLAIR, S.N. The effects of aerobic exercise on plasma catecholamines and blood pressure in-patients with mild essential hypertension. **JAMA**, v. 254, p. 2609-13, 1985.

ERBS, S.; BAITHER, Y.; LINKE, A.; ADAMS, V.; SHU, Y.; LENK, K.; GIELEN, S.; DILZ, R.; SCHULER, G.; HAMBRECHT, R. Promoter but not exon 7 polymorphism of endothelial nitric oxide synthase affects training-induced correction of endothelial dysfunction. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 23, n. 10, p. 1814-9, 2003.

ERBS S.; MÖBIUS-WINKLER S.; LINKE A.; ADAMS V.; DOLL N.; GIELEN S.; GUMMERT J.F.; MOHR F.W.; SCHULER G.; HAMBRECHT R. Both T-786C and G894T polymorphism of endothelial nitric oxide synthase affect in-vitro endothelium-dependent relaxation of internal mammary artery rings from patients with coronary artery disease. **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.** n. 13(5), p. 826-31, 2006

ESHRE Capri Workshop Group. Hormones and cardiovascular health in women. **Hum Reprod Update**, v.12, n. 5, p. 483-97, 2006.

FAGARD RH. Exercise characteristics and the blood pressure response to dynamic physical training. **Med Sci Sports Exerc.** v. 33(6 Suppl), p. S484-92, 2001.

FAGARD, R.H ; COMELISSEN, V.A. Effect of exercise on blood pressure control in hypertensive patients. **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.**, v. 14, p. 12-7, 2007.

FISHER, A.B.; CHIEN, S.; BARAKAT, A.I.; NEREM, R.M. Endothelial cellular response to altered shear stress. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.**, v. 281, n.3, p. L529-33, 2001.

FLEMING, I.; BUSSE, R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 84, p. R1-12, 2003.

FORJAZ, C. L. M.; CARDOSO, C. G. JR.; ONEDA, B.; MORIYAMA, C. K.; TINUCCI, T.; FONSECA, A. M. Climatério, hipertensão arterial e qualidade de vida: efeitos do treinamento aeróbico e da terapia hormonal. **Hipertensão arterial**, v. 10, n. 4, p. 144-151, 2007.

FREITAS, E.V., PY, L.; NERI, A.L.; CANÇADO, F.A.X.; GORZONI, M. L.; ROCHA, S. M. **Tratado de Geriatria e Gerontologia**. Guanabara Koogan, 2002.

FURTADO, M.R.; MARTINS, J.F. Hipertensão arterial na mulher: um caso especial ? **Arq Bras Cardiol**, v. 64, p.141-4, 1995.

GALLO, J. J.; BUSBY-WHITEHEAD, J.; RABINS, P. V.; SILLIMAN, R. A.; MURPHY, J. B. Reichel. Assistência ao Idoso: **Aspectos Clínicos do Envelhecimento**. Guanabara Koogan, 5ª edição, 2001.

HAGBERG, J.M.; PARK, J.J.; BROWN, M.D. The role of exercise training in the treatment of hypertension: an update. **Sports Med.**, v. 30, n. 3, p. 193-206, 2003.

HAMBRECHT, R.; ADAMS, V.; ERBS, S.; LINKE, A.; KRÄNKEL, N.; SHU, Y.; BAITHER, Y.; GIELEN, S.; THIELE, H.; GUMMERT, J.F.; MOHR, F.W.; SCHULER, G. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. **Circulation**, v. 107, p. 3152-8, 2003.

HANSEN, K.C.; ZHANG, Z.; GOMEZ, T.; ADAMS, A.K.; SCHOELLER, D.A. Exercise increases the proportion of fat utilization during short-term consumption of a high-fat diet. **Am J Clin Nutr.**, v. 85, p. 109-16, 2007.

HARRISON-BERNARD, L. M.; SCHULMAN, I. H.; RAIJ, L. Postovariectomy Hypertension is Linked to increased renal AT1 receptor and salt sensitivity. **Hypertension**, v. 42, p. 1157-1163, 2003.

HIGASHI, Y.; YOSHIZUMI, M. Exercise and endothelial function: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. **Pharmacol Ther.**, v. 102, n. 1, p. 87-96, 2004.

IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; BYRNS, R.E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 9265-9269, 1987.

IGNARRO, L.J. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. **J Physiol Pharmacol.**, v. 53, n. 4, p. 503-14, 2002.

JONES, H.; GEORGE, K.; EDWARDS, B.; ATKINSON, G. Exercise intensity and blood pressure during sleep. **Int J Sports Med.**, v. 30, n. 2, p. 94-9, 2009.

KARANTZOULIS-FEGARAS F.; ANTONIOU H.; LAI S.L.; KULKARNI G.; D'ABREO C.; WONG G.K.; MILLER T.L.; CHAN Y.; ATKINS J.; WANG Y.; MARSDEN P.A.; Characterization of the human endothelial nitric-oxide synthase promoter. **J Biol Chem.** v. 274(5). n. 29. p. 3076-93, 1999.

KENNEY, M.J.; SEALS, D.R. Postexercise hypotension. **Hypertension**, v. 22, p. 653-664, 1993.



KINGWELL, B.A. Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease. **FASEB J.**, v. 4, p. 1685-96, 2001.

KLINE G.M.; PORCARI J.P.; HINTERMEISTER R.; FREEDSON P.S.; WARD A.; MCCARRON R.F.; ROSS J.; RIPPE J.M. Estimation of VO<sub>2</sub>max from a one-mile track walk, gender, age, and body weight. **Med Sci Sports Exerc.** v. 19(3), p. 253-9, 1987.

KOHNO, H.; FURUKAWA, S.; NAITO, H.; MINAMITANI, K.; OHMORI, D.; YAMAKURA, F. Contribution of nitric oxide, angiotensin II and superoxide dismutase to exercise-induced attenuation of blood pressure elevation in spontaneously hypertensive rats. **Jpn Heart J.**, p.25-34, 2002.

KOJDA, G.; HAMBRECHT, R. Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? **Cardiovasc Res.**, v. 67, p. 187-97, 2005.

KOURY, J.C.; DONANGELO, C.M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev. Nut.**, v. 16, p. 433-441, 2003.

KRIEGER, E.M.; BRUM, P.C.; NEGRÃO, C.E. Role of arterial baroreceptor function on cardiovascular adjustments to acute and chronic dynamic exercise. **Biol. Res.**, n.31(3), p.273-279, 1998.

LATERZA, M.C.; de MATOS, L.D.; TROMBETTA, I.C.; BRAGA, A.M.; ROVEDA, F.; ALVES, M.J.; KRIEGER, E.M.; NEGRÃO, C. E.; RONDON, M. U. Exercise training restores baroreflex sensitivity in never-treated hypertensive patients. **Hypertension.**, v. 49, p. 1298-306, 2007.

LEWINGTON, S.; CLARKE, R.; QIZILBASH, N.; PETO, R.; COLLINS, R. For the Prospective Studies Collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. **Lancet**, v.360, p. 1903–13, 2002.

LI, H.; WALLERATH, T.; FOSTERMANN, U. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial – type NO synthase. **Nitric Oxide** v.7, p.132-47, 2002.

MARSDEN, P.A.; HENG, H.H.; SCHERER, S.W.; STEWART, R.J.; HALL A.V.; SHI, X.M.; TSUI, L.C, SCHAPPERT, K.T. Structure and crossosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. **J Biol Chem.**, v. 268, p. 17478-17488, 1993.

METZGER, I.F.; SOUZA-COSTA, D.C.; MARRONI, A.S.; NAGASSAKI, S.; DESTA, Z.; FLOCKHART, D.A.; TANUS-SANTOS, J.E. Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes associated with circulating concentrations of nitric oxide products in healthy men. **Pharmacogenet Genomics.**, v. 15, n. 8, p. 565-70, 2005.

MIYAMOTO, Y.; SAITO, Y.; KAJIYAMA, N.; YOSHIMURA, M.; SHIMASAKI, Y.; NAKAYAMA, M.; KAMITANI, S.; HARADA, M.; ISHIKAWA, M.; KUWAHARA, K.; OGAWA, E.; HAMANAKA, I.; TAKAHASHI, N.; KANESHIGE, T.; TERAOKA, H.; AKAMIZU, T.; AZUMA, N.; YOSHIMASA, Y.; YOSHIMASA, T.; ITOH, H.; MASUDA, I.; YASUE, H.; NAKAO, K. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. **Hypertension**, v. 32, p. 3-8, 1998.

MOMBOULI, J.V.; VANHOUTTE, P.M. Endothelial dysfunction: from physiology pathophysiology to therapy. **J. Mol Cell Cardiol.**, v. 31, p. 61-74, 1999.

MONCADA, S.; et al. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Reviews**, v. 43, n. 2, p. 109-42, 1991.

MONCADA, S. Nitric Oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. **An New York Acad. Sci.**, v. 811, p. 60-7, 1997.

DE MORAES, C.; DAVEL, A.P.; ROSSONI, L.V.; ANTUNES, E.; ZANESCO, A. Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. **BMC Physiol.**, v. 29, p. 8-12, 2008.

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

NAPOLI C.; DE NIGRIS F.; WILLIAMS-IGNARRO S.; PIGNALOSA O.; SICA V.; IGNARRO L.J. Nitric oxide and atherosclerosis: an update. **Nitric Oxide**. v. 15(4). p. 265-79, 2006.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION – NCBI. **Single Nucleotide Polymorphism (SNP) database**. [www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/). Acesso em: 18 maio. 2010.

NEGRÃO, C.E.; BARRETTO, A.C.P. **Cardiologia do exercício do atleta ao cardiopata**. Manole, São Paulo, 2ª edição, 2006.

PARAVICINI, T.M.; TOUYZ, R.M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. **Diabetes Care.**, v.31 Suppl 2, p. S170-80, 2008.

PEREIRA, T.V.; RUDNICKI, M.; CHEUNG, B.M.; BAUM, L.; YAMADA, Y.; OLIVEIRA, P.S.; PEREIRA, A.C.; KRIEGER, J.E. Three endothelial nitric oxide (NOS3) gene polymorphisms in hypertensive and normotensive individuals: meta-analysis of 53 studies reveals evidence of publication bias. **J Hypertens.**, v. 25, p. 1763-74, 2007.

PHILLIPS, G.B.; JING, T.; HEYMSFIELD, S.B. Does insulin resistance, visceral adiposity, or a sex hormone alteration underlie the metabolic syndrome? Studies in women. **Metabolism.**, v. 57, p. 838-844, 2008.

QUINDRY, J.; FRENCH, J.; HAMILTON, K.; LEE, Y.; MEHTA, J.L.; POWERS, S. Exercise training provides cardioprotection against ischemia-reperfusion induced apoptosis in young and old animals. **Exp Gerontol.**, v. 40, n. 5, p. 416-25, 2005.

RANKINEN, T.; RICE, T.; ÉRUSSE, L.; CHANGNON, Y.C.; GAGNON, J.; LEON, A.S.; SKINNER, J.S.; WILMORE, J.H.; RAO, D.C.; BOUCHARD, C. NOS3 Glu298Asp genotype and blood pressure response to endurance training: the HERITAGE family study. **Hypertension**, v. 36, p. 885-9, 2000.

RECKELHOFF, J.F.; FORTEPIANI, L.A. Novel mechanisms responsible for postmenopausal hypertension. *Hypertension.*, v. 43, p. 918-923, 2004.

REIS, C. M. R.F.; MELO, N. R.; VEZZOZO, D. P.; MEIRELLES, E. S. e HALPEN, A. Composição Corpórea, Distribuição de Gordura e Metabolismo de Repouso em Mulheres Histerectomizadas no Climatério - Há Diferenças de Acordo com a Forma da Administração do Estrogênio? **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 44, n. 2, p. 178-85, 2000.

SANDRIM, V.C.; de SYLLOS, R.W.; LISBOA, H.R.; TRES, G.S.; TANUS-SANTOS, J.E. Influence of eNOS haplotypes on the plasma nitric oxide products concentrations in hypertensive and type 2 diabetes mellitus patients. **Nitric Oxide.**, v. 16, n. 3, p. 348-55, 2007.

SARTORI-VALINOTTI, J.C.; ILIESCU, R.; FORTEPIANI, L.A.; YANES, L.L.; RECKELHOFF, J.F. Sex differences in oxidative stress and the impact on blood pressure control and cardiovascular disease. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 34, p. 938-945, 2007.

SCHNEIDER, C.D.; de OLIVEIRA, A.R. Radicais livre e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev. Bras. Med. Esporte.** v. 10, n.4, p. 308-313, 2004.

SEARLES, C.D. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v. 291, n. 5, p. C803-16, 2006.

SESSA, W.C.; PRITCHARD, K.; SEYEDI, N.; WANG, J.; HINTZE, T.H. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. **Circ Res.**, v. 74, p. 349-53, 1994.

SIMKIN-SILVERMAN, L.; WING, R. R.; HANSEN, D.H.; KLEM, M.L.; PASAGIAN-MACAULAY, A.P.; MEILAHN, E.N.; KULLER, L.H. Prevention of cardiovascular risk factor elevations in healthy premenopausal women. **Preventive Medicine**, v. 24, p. 509-517, 1995.

SIMKIN-SILVERMAN, L.R.; WING, R.R.; BORAZ, M.A.; KULLER, L.H. Lifestyle intervention can prevent weight gain during menopause: results from a 5-year randomized clinical trial. **Ann Behav Med.**, v. 26, n. 3, p. 212-20, 2003.

SPONTON, C.H.; REZENDE, T.M.; MALLAGRINO, P.A.; FRANCO-PENTEADO, C.F.; BEZERRA, M.A.; ZANESCO, A. Women with TT genotype for eNOS gene are more responsive in lowering blood pressure in response to exercise. **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.**, 2010. [Epub ahead of print]

STAFFILENO, B.A.; MINNICK, A.; COKE, L.A.; HOLLENBERG, S.M. Blood pressure responses to lifestyle physical activity among young, hypertension-prone African-American women. **J Cardiovasc Nurs.**, v. 22, p. 107-17, 2007.

STARON, R.S.; MALICKY, E.S.; LEONARDI, M.J.; FALKEL, J.E.; HAGERMAN, F.C.; DUDLEY, G.A. Muscle hypertrophy and fast fiber type conversions in heavy resistance-trained women. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol.**, v. 60, p. 71-9, 1990.

STUEHR, D.J. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, v. 37, p. 339-59, 1997.

TAO, H.M.; CHEN, G.Z. Endothelial NO synthase gene polymorphisms and risk of ischemic stroke: a meta-analysis. **Neurosci Res.**, v. 64, n. 3, p. 311-6, 2009.

TOSTES, R.C.; NIGRO, D.; FORTES, Z.B; CARVALHO, M.H.C. Effects of estrogen on the vascular system. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 9, p. 1143-1158, 2003.

TOUYZ R.M.; SCHIFFRIN E.L.; Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. **Histochem Cell Biol.** v. 122(4), n. 339-52, 2004.

VANHOUTTE, P.M. Endothelial control of vasomotor function – From health to coronary disease. **Circulation Journal**, v. 67, p. 572-5, 2003.

WANG, X.L.; WANG, J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. **Mol Genet Metab.**, v. 70, p. 241-51, 2000.

WASSTERTHEIL-SMOLLER, S.; ANDERSON, G.; PSATY BM, BLACK HR, MANSON J, WONG N, FRANCIS J, GRIMM R, KOTCHEN T, LANGER R, LASSER N. Hypertension and its treatment in postmenopausal women: baseline data from the Women's Health Initiative. **Hypertension.**, v. 36, p. 780-789, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The World Health Report. Reducing risks and promoting healthy life.** Geneva, World Health Organization, p. 1-248, 2002.

ZAGO, A.S.; ZANESCO, A. Nitric oxide, cardiovascular disease and physical exercise. **Arq Bras Cardiol.**, v. 87, n. 8, p. 264-70, 2006.

ZANESCO A, ANTUNES E. **Células Endoteliais.** In: Hernandes F. Carvalho; Carla B. Collares-Buzato. (Eds). Células. São Paulo: Manole; 2005.

ZANESCO, A.; ANTUNES, E. Effects of exercise training on the cardiovascular system: Pharmacological approaches. **Pharmacol Ther.**, v. 114, p. 307-17, 2007.

ZAROS, P.R.; PIRES, C.E.; BACCI, M.J.R.; de MORAES, C.; ZANESCO A. Effect of 6-months of physical exercise on the nitrate/nitrite levels in hypertensive postmenopausal women. **BMC Womens Health**, v. 19, p. 9-17, 2009.

ZANESCO, A.; ZAROS, P.R. Physical exercise and menopause. **Rev Bras Ginecol Obstet.**, v. 31, n. 5, p. 254-61, 2009.

ZINTZARAS, E.; KITSIOS, G.; STEFANIDIS, I. Endothelial NO synthase gene polymorphisms and hypertension: a meta-analysis. **Hypertension.**, v. 48, p. 700-10, 2006.

ZHANG, J.; REN, C.X.; QI, Y.F.; LOU, L.X.; CHEN, L.; ZHANG, L.K.; WANG, X.; TANG, C. Exercise training promotes expression of apelin and APJ of cardiovascular tissues in spontaneously hypertensive rats. **Life Sci.**, v. 79, p. 1153-9, 2009.