



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE
(BIODINÂMICA DA MOTRICIDADE HUMANA)**

**INFLUÊNCIA DOS GENÓTIPOS/HAPLÓTIPOS DAS POSIÇÕES POLIMÓRFICAS -
786T>C, 894G>T E ÍNTRON 4B/A DO GENE NOS3 SOBRE O SISTEMA
CARDIOVASCULAR E A ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM ADULTOS
SUBMETIDOS AO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO**

CARLOS HENRIQUE GROSSI SPONTON

dezembro - 2013

Carlos Henrique Grossi Sponton

Influência dos genótipos/haplótipos das posições polimórficas -786T>C, 894G>T e Íntron 4b/a do gene NOS3 sobre o sistema cardiovascular e a atividade das enzimas antioxidantes em adultos submetidos ao treinamento físico aeróbio

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Motricidade.

Orientador: Profa. Dra. Angelina Zanesco

Rio Claro
2013

575.1 Sponton, Carlos Henrique Grossi
S765i Influência dos genótipos/haplótipos das posições
polimórficas -786T>C, 894G>T e Íntron 4b/a do gene NOS3
sobre o sistema cardiovascular e a atividade das enzimas
antioxidantes em adultos submetidos ao treinamento físico
aeróbico / Carlos Henrique Grossi Sponton. - Rio Claro, 2013
132 f. : il., figs., gráfs., tabs., quadros

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Angelina Zanesco

1. Genética. 2. Fisiologia cardiovascular. 3. Óxido nítrico.
4. Doenças cardiovasculares. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE RIO CLARO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE RIO CLARO

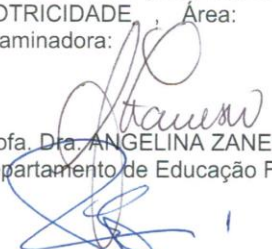
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Influência do genótipos/haplótipos das posições polimórficas -786T>C, 894G>T e Intron 4b/a do gene NOS3 sobre o sistema cardiovascular e a atividade das enzimas antioxidantes em adultos submetidos ao treinamento físico aeróbio

AUTOR: CARLOS HENRIQUE GROSSI SPONTON

ORIENTADORA: Profa. Dra. ANGELINA ZANESCO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE, Área: BIODINAMICA DA MOTRICIDADE HUMANA, pela Comissão Examinadora:



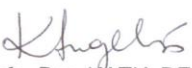
Profa. Dra. ANGELINA ZANESCO

Departamento de Educação Física / Instituto de Biociências de Rio Claro - SP



Prof. Dr. EDSON ANTUNES

Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas - SP



Profa. Dra. KATIA DE ANGELIS

Universidade Nove de Julho, PPG em Ciências da Reabilitação - São Paulo/SP



Profa. Dra. FABIOLA TAUFIC MÔNICA IGLESIAS

Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas - Campinas/SP



Profa. Dra. ANA PAULA COUTO DAVEL

Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia - Campinas/SP

Data da realização: 16 de dezembro de 2013.

AGRADECIMENTOS

AOS MEUS PAIS (PAULO E ROSA) E IRMÃOS (DANIELE, FABIANE E ADRIANO) POR
TODA A BASE MORAL E EDUCACIONAL DA MINHA VIDA.

AOS AMIGOS DO LABORATÓRIO DE FISIOLOGIA CARDIOVASCULAR E ATIVIDADE
FÍSICA (RODRIGO, ALINE, MAYCON, CHADI) QUE PARTICIPARAM INTEGRALMENTE
DO DESENVOLVIMENTO DESSE PROJETO E QUE SEM OS QUAIS EU JAMAIS TERIA
FINALIZADO

AOS PROFESSORES E AMIGOS (MARIA ANDRÉIA, RÔMULO, CAMILA E
FERNANDA) POR TODA AJUDA DURANTE O PERÍODO DA PÓS GRADUAÇÃO

AO LABORATÓRIO DE EVOLUÇÃO MOLECULAR (CYNARA, ALEXANDRE, CAROL,
MIAGUI, JOANA, CYNTHIA, PROF. MAURÍCIO BACCI) E AOS AMIGOS DO CEIS
(MARIANA, SR. SEBASTIÃO, FRANCO) PELA AJUDA COM AS ANÁLISES
GENÉTICAS, BIOQUÍMICAS E AS LONGAS DISCUSSÕES SOBRE CIÊNCIA E
BIOLOGIA MOLECULAR

A TODOS OS VOLUNTÁRIOS DE PESQUISA POR SUA DEDICAÇÃO E
COMPROMISSO COM O DESENVOLVIMENTO DESSE PROJETO

AO POGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE - UNESP E A
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO – FAPESP
PELO SUPORTE FINANCEIRO E POSSIBILIDADE DE DESENVOLVIMENTO DESSE
DOUTORADO

À PROFESSORA ANGELINA ZANESCO PELA OPORTUNIDADE, AJUDA, AMIZADE,
CONFIANÇA E ORIENTAÇÃO DURANTE TODO ESSE PERÍODO

À MINHA ESPOSA AMANDA SPONTON POR TODO O COMPANHEIRISMO, AJUDA,
CARINHO E COMPREENSÃO AO LONGO DE TODOS ESSES ANOS

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência dos polimorfismos -786T>C, 894G>T e Íntron 4 do gene NOS3 sobre os parâmetros cardiovasculares e bioquímicos em adultos submetidos ao treinamento físico aeróbio. Oitenta e seis voluntários, sendo cinquenta e cinco normotensos ($49,6 \pm 0,6$ anos) e trinta e um hipertensos ($52,9 \pm 1,2$ anos) finalizaram todas as etapas do estudo. Em relação aos parâmetros antropométricos, foram avaliados o índice de massa corporal e circunferência abdominal. Para os parâmetros cardiovasculares, foram avaliados a pressão arterial sistólica e diastólica (através do método auscultatório - *tycos®* e o monitoramento ambulatorial da Pressão Arterial – Dyna MAPA®), frequência cardíaca de repouso e exercício (FC), mensurada através monitor de frequência cardíaca (Polar® RS 800CX) e consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}) (através do teste de 1 milha). Para os parâmetros bioquímicos, foram avaliados o perfil lipídico (colesterol total - CT, HDL-C, LDL-C, VLDL-C e triglicerídeos – TG), creatinina, glicemia (através do método enzimático automático – Cobas Mira Plus®), atividade da superóxido dismutase, catalase, concentrações de nitrito e nitrato (NO_x^-) e malondialdeído (MDA) pelo método colorimétrico, através do espectrofotômetro (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). A determinação dos polimorfismos para as três posições do gene NOS3 analisadas no estudo foi realizada através da extração de DNA, utilizando protocolo clorofórmio-fenol, seguida pela reação em cadeia da polimerase – PCR em termociclador (Mastercycler® Eppendorf) e sequenciada para as regiões de interesse através do sequenciador (ABI 3500 Applied Biosystems). O treinamento físico aeróbio (TFA) aeróbio foi realizado por 24 sessões em um período de oito semanas (frequência de três vezes/semana, com duração de trinta a quarenta minutos por sessão). A determinação da intensidade do treinamento físico aeróbio foi realizada através do teste de máxima fase estável de lactato. O desenho experimental foi caracterizado como ensaio clínico controlado cruzado e duplo cego. Os principais resultados do presente estudo foram: 1) O treinamento físico aeróbio promoveu redução significativa da pressão arterial de repouso tanto para os voluntários normotensos quanto para os hipertensos, sendo a magnitude de redução da pressão arterial diastólica maior para os hipertensos (tabela 3 e figura 12). Por outro lado, não foram observadas alterações em relação a

pressão arterial ambulatorial para os voluntários hipertensos em resposta ao treinamento físico aeróbio, apesar das diferenças para os voluntários normotensos (tabelas 4 e figuras 13,14). A FC (tabela 2 e figura 10), assim como os biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo e concentrações de NOx^- (tabela 6 e figura 17) não justificam esses resultados. 2) O polimorfismo localizado na posição íntron 4b/a atenuou a redução tanto da pressão arterial de repouso (tabela 10 e figuras 23,24) quanto da ambulatorial (tabela 11 e figuras 29,30) frente ao treinamento físico aeróbio. Diferentemente, os polimorfismos para as posições - 786T>C e 894G>T não influenciaram as respostas tanto da pressão arterial de repouso (tabela 10 e figuras 23,24) quanto da ambulatorial (tabela 11 e figuras 25, 26,27,28) em resposta ao treinamento físico aeróbio. Entretanto, a FC (tabela 9 e figuras 20,21,22), assim como os biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo e concentrações de NOx^- (tabela 12 e figuras 31,32,33) não justificaram essas respostas. 3) Por fim, a resposta de redução tanto da pressão arterial de repouso (tabela 17 e figura 36), quanto ambulatorial (tabelas 18,19 e figuras 37,38) foram atenuadas pelos grupos haplotípicos TGa e CGb. Novamente, a FC (tabelas 15,16 e figura 35), assim como os biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo e concentrações de NOx^- (tabelas 20,21 e figuras 39,40) não justificaram essas respostas. Em conclusão, nossos dados demonstram que o polimorfismo localizado no íntron 4, assim como os haplótipos TGa e CGb inibem a resposta de redução da pressão arterial frente ao treinamento físico aeróbio em adultos de meia idade. Entretanto, os mecanismos para esses resultados ainda não são conhecidos.

Palavras-chave: Treinamento Físico Aeróbio, Polimorfismos do gene NOS3, Óxido Nítrico, Hipertensão Arterial.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of NOS3 gene polymorphisms at -786T>C, 894G>T e Intron 4 on the cardiovascular and biochemical parameters in middle-aged trained adults. Eighty six volunteers (fifty five normotensive [49,6±0,6 years] and third one hypertensive volunteers [52,9±1,2 years]) finished the study. The anthropometric (body mass index – BMI and waist circumference – WC), cardiovascular (office blood pressure - *tycos®*; ambulatory blood pressure - *Dyna MAPA®*; VO_2 peak – one mile treadmill test; heart rate (HR) - *Polar® RS 800CX*) and biochemical (lipid profile, glycemia, creatinine - *Cobas Mira Plus®*, superoxide dismutase, catalase, nitrate/nitrite, malondialdehyde - *Cayman Chemical*, Ann Arbor, MI, USA). The NOS3 gene polymorphisms were performed by DNA extraction, followed by PCR (*Mastercycler® Eppendorf*) and genotype sequence (*ABI 3500 Applied Biosystems*). The aerobic exercise training was performed by 24 sessions (during 8 weeks), 3 times per week, 30-40min, in the maximal lactate steady state intensity. The crossover and double blind study were performed. Follow the main results: 1) Office blood pressure decreased for both normotensive and hypertensive groups in response of exercise training. The hypertensive group showed higher reduction of diastolic blood pressure than normotensive group (table 3 and figure 12). On the other hand, the ambulatory blood pressure did not change for hypertensive group in response of exercise training, whereas the normotensive group decrease both daytime and 24h (table 4 and figures 13,14). The cardiovascular HR (table 2 e figure 10), oxidative stress and NO_x^- (table 6 and figure 17) parameters did not explain the results. 2) The intron 4b/a polymorphism blunted both office (table 10 and figures 23,24) and ambulatory (table 11 and figures 29,30) blood pressure in response of exercise training. However, the -786T>C and 894G>T polymorphisms did not change both the office (table 10 and figures 23,24) and ambulatory (table 11 and figures 25,26,27,28) blood pressure in response of exercise training. The cardiovascular HR (table 9 and figures 20,21,22), oxidative stress and NO_x^- (table 12 and figures 31,32,33) parameters did not explain the results. 3) Finally, the haplotypes TGa and CGb groups blunted both office (table 17 and figure 36) and ambulatory (table 18,19 and figures 37,38) blood pressure response of exercise training. As previously showed, the cardiovascular HR (tables 15,16 and figure 35),

oxidative stress and NOx- (tables 20,21 and figures 39,40) parameters did not explain the results. In conclusion, our results shows that the intron 4b/a polymorphism as well as the haplotypes TGa and CGb groups blunted the benefits effects of exercise training on blood pressure in middle-aged volunteers. However, the real mechanisms are unknown.

Keywords: Aerobic Exercise Training, NOS3 gene polymorphisms, Nitric Oxide, Hypertension.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	09
1.1 Objetivo	19
2. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3. RESULTADOS	32
3.1 Parte 1 (Geral)	32
3.2 Sumário dos Resultados (Parte 1)	50
3.3 Parte 2 (Genótipos)	52
3.4 Sumário dos Resultados (Parte 2)	78
3.5 Parte 3 (Haplótipos).....	80
3.6 Sumário dos Resultados (Parte 3)	93
4. DISCUSSÃO	94
4.1 Parte 1 (geral).....	94
4.2 Parte 2 (genótipos)	98
4.3 Parte 3 (haplótipos)	102
5. CONCLUSÃO	103
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

1. INTRODUÇÃO

Hipertensão Arterial Sistêmica

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma doença crônico degenerativa de etiologia multifatorial e poligênica, caracterizada pela presença de níveis aumentados de pressão arterial, normalmente associados a alterações metabólicas e hormonais e fenômenos tróficos (hipertrofias cardíaca e vascular), sendo considerada uma dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares (COFFMAN 2011; MESSERLI, WILLIAMS, RITZ, 2007). A HAS apresenta custos médios e socioeconômicos elevados, decorrentes principalmente de lesões em órgãos alvos tais como: coração, cérebro, vasos sanguíneos, rins e retina (MESSERLI, WILLIAMS, RITZ, 2007).

Estima-se que cerca de um bilhão de indivíduos apresentem HAS em todo mundo, sendo esta patologia responsável por aproximadamente 7,1 milhões de óbitos por ano (LAWES, VANDER HOORN, RODGERS, 2008). Desses hipertensos cerca de 50% estão entre a faixa etária de 60 e 69 anos e $\frac{3}{4}$ destes, acima de 70 anos (NOBRE et al., 2010).

No Brasil, recente meta análise demonstrou que a prevalência de HAS é de aproximadamente 30% (PICON et al., 2012). A HAS é 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 (NOBRE et al., 2010). A prevalência global de HAS mostra similaridade entre os sexos, sendo de 26,6% para os homens e 26,1% para as mulheres (KEARNEY et al., 2005; NOBRE et al., 2010).

Diversos fatores de risco estão associados ao desenvolvimento da HAS sendo os principais: a obesidade, as dislipidemias, o ganho de peso, a dieta rica em sal, as alterações nos níveis hormonais e o sedentarismo (CHOBANIAN et al., 2003; NOBRE et al., 2010; MANCIA et al., 2013). Particularmente, os indivíduos sedentários apresentam um risco aumentado de aproximadamente 30% maior para o desenvolvimento da HAS do que os indivíduos ativos (NOBRE et al., 2010).

Óxido Nítrico

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 (FÉLÉTOU, KOHLER, VANHOUTE, 2010; MICHEL; VANHOUTTE, 2010; ZANESCO; ANTUNES, 2007). As substâncias produzidas pelo endotélio podem ser divididas entre agentes vasodilatadores como: prostaciclina, óxido nítrico (NO) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e agentes vasoconstritores como: endotelinas, prostaglandina H_2 , tromboxano A_2 e as espécies reativas de oxigênio (EROs). Dentre esta variedade de substâncias, o NO merece atenção especial devido ao seu papel no mecanismo de vasodilatação.

Enzimas conhecidas como sintases do NO (NOS), as quais são divididas em dois grandes grupos de isoformas constitutivas (cNOS: eNOS-endotelial e nNOS-neuronal) e isoforma indizível (iNOS), são capazes de catalisar a oxidação do nitrogênio terminal do grupamento guanidino da L-arginina formando NO e L-citrulina. 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 GMPc, que por sua vez, diminui os níveis intracelular de cálcio Ca^{2+} . Os mecanismos pelos quais a via NO/GMPc induz a vasodilatação incluem inibição da geração do inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3), aumento do seqüestro de Ca^{2+} citosólico, desfosforilação da cadeia leve de miosina, inibição do influxo de Ca^{2+} , ativação de proteína quinase, estimulação da Ca^{2+} ATPase de membrana e abertura de canais de K^+ (IGNARRO et al., 1987; DENNIGER; MAERLETTA, 1999).

Ambas, eNOS e nNOS, são estimuladas por uma cascata bioquímica (dependente e independente de íons cálcio), que 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 (BH_4) (MOMBOULI; VANHOUTTE, 1999; VANHOUTTE, 2003). A iNOS é ativada por determinados estímulos patológicos, tais como lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) e citocinas,

incluindo a interleucina-1(IL-1) e TNF- α . É ativada independentemente do complexo Ca^{2+} e calmodulina, e libera grandes quantidades de NO por períodos de tempo relativamente longos (MONCADA, 1997) (JENKINS et al., 1995; MONCADA, 1997). Essas isoformas são codificadas por três diferentes genes localizados em três cromossomos distintos (MARSDEN, 1993).

As células endoteliais são altamente sensíveis a estímulos químicos advindos de agonistas como a acetilcolina, bradicinina e histamina, e por estímulos físicos. As forças físicas resultante da variação do fluxo sanguíneo (força de cisalhamento) é um dos mais importantes estímulos 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 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 (ADAMO ET AL., 2009; HIGASHI; YOSHIZUMI, 2004; KODJA; HAMBRECHT, 2005; TZIMA ET AL., 2005).

Estresse Oxidativo, Espécies Reativas de Oxigênio e Óxido Nítrico

Diversos trabalhos demonstram direta associação entre o aumento na produção de EROs e a fisiopatologia de diversas condições, entre elas o diabetes mellitus, o acidente vascular cerebral, o infarto do miocárdio e a aterosclerose (CHEN et al., 2012; ROBERTS; SINDHU, 2009). As principais espécies reativas de oxigênio são o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e peroxinitrito (ONOO^-). As espécies reativas de oxigênio são formadas por mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. Especificamente sobre a ação enzimática intra e extracelular na produção de EROs, temos a atividade da xantina oxidase, o citocromo P450, a via da cicloxigenase, a síntase endotelial do óxido nítrico (eNOS) desacopladora e a NADPH oxidase como as principais enzimas envolvidas neste processo. A NADPH oxidase é a principal enzima formadora de O_2^-

que possui grande citotoxicidade e está envolvida na gênese de processos patológicos como hipertensão arterial, diabetes mellitus e aterosclerose (PARAVICINI; TOUYZ, 2008). A reação do O_2^- com o NO produzido pela célula endotelial reduz a sua biodisponibilidade, levando a formação de uma molécula altamente instável, o peroxinitrito ($OONO^-$), capaz de oxidar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, provocando danos celulares por meio da ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ 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 (PACHER; BECHMAN; LIAUDET, 2007).

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 glutathiona 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 peróxido de hidrogênio (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 (PARAVICINI; TOUYZ, 2006).

Mutações Genéticas e os Polimorfismos.

Os polimorfismos são definidos como alterações na sequência do DNA, caracterizados por substituições, deleções ou inserções de nucleotídeos presentes em uma prevalência > 1% da população (BALASUBRAMANIAN et al., 2004).

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 íntrons (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).

Polimorfismos do gene NOS3 e Doenças Cardiovasculares

Diversos polimorfismos de diferentes genes têm sido relacionados ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (GUO et al., 2012; WANG et al., 2011). Dentre estes, podemos destacar o gene NOS3, que está localizado no cromossomo 7, mais especificamente na posição 7q35-36, o qual apresenta um comprimento genômico de 4.4kb compreendendo 25 íntrons e 26 éxons, sendo este responsável pela codificação de uma proteína contendo 1203 aminoácidos apresentando um peso molecular de 135-kD, o qual tem sido extensamente estudado em três posições, -786T>C, 894G>T e íntron 4 (CASAS et al., 2006; ZINTZARAS; KITSIOS; STEFANIDIS, 2006).

Polimorfismo -786T>C

Um polimorfismo muito estudado é o polimorfismo da posição -786 do gene NOS3. Este SNP caracteriza-se pela substituição da timina (T) pela citosina (C) na região promotora desse gene (MARSDEN et al., 1993; NAKAYAMA et al., 1999). A presença deste polimorfismo tem sido associada positivamente com a prevalência de doenças cardiovasculares (WANG & WANG, 2000; DENGEL et al., 2007; SPOTO et al., 2007), como espasmos coronarianos (NAKAYAMA et al., 1999); hipertensão arterial (HYNDMAN, 2002) e doença renal crônica (ZANCHI et al., 2000). Acredita-se que a alteração polimórfica observada nesta região esteja relacionada com a

modulação do gene NOS3 através da ação de uma proteína repressora chamada RPA1, gerando quantidades diminuídas de RNAm, assim como menor nível de nitrito/nitrato plasmático (MIYAMOTO et al., 2000). Além disso, prévio trabalho demonstrou que os níveis de RNAm para eNOS estão significativamente reduzidos em plaquetas de adolescentes hipertensos que apresentam o genótipo CC para NOS3 quando comparados aos genótipos TT e TC (DOSENKO et al., 2006). Por fim, prévios trabalhos demonstraram uma associação entre os polimorfismos no íntron 4 e na região promotora -786, demonstrando que o heterozigoto polimórfico (4a/b) apresenta uma possível ligação de desequilíbrio com a posição -786, sugerindo uma associação positiva entre esses polimorfismos e prevalência de doença arterial coronariana na população coreana (KIM et al., 2007).

Polimorfismo 894G>T

O polimorfismo da posição 894 caracterizado pela substituição do nucleotídeo Guanina (G) pela Timina (T), localizado no éxon 7, resulta na substituição do aminoácido Glutamato (Glu) pelo Aspartato (Asp) na sequência protéica (Glu298Asp) da enzima eNOS (MARSDEN et al., 1993). Prévios trabalhos demonstraram que esse polimorfismo está relacionado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares como: doença arterial coronariana (HINGORANI et al., 1999; GARDEMANN et al., 2002), hipertensão arterial (MIYAMOTO et al., 1998), infarto do miocárdio (SHIMASAKI et al., 1998; ANDRIKOPOULOS et al., 2008) e acidente vascular cerebral (TAO; CHEN, 2009). Prévios estudos demonstraram que essa substituição faz com que a variante Asp torne a enzima eNOS mais suscetível à clivagem proteolítica, sendo observadas a formação de fragmentos protéicos de 35 KDa amino terminal e 100 KDa carboxi terminal (TESAURO et al., 2000; PERSU et al., 2002). Por outro lado, Fairchild et al. (2001) demonstraram que esses fragmentos observados na presença do SNP estavam associados a um viés metodológico. Além disso, outros autores verificaram que a substituição do Glu para o Asp na posição 298 da proteína, não altera a atividade enzimática da eNOS em cultura de células (HINGORANI, 2001). Adicionalmente, também foi demonstrado que esse SNP localiza-se dentro de uma curvatura na superfície externa da proteína, não sendo observada sua relação tanto com o sítio ativo da enzima quanto

com sua interface de dimerização. Sugere-se assim, se funcional, o SNP do éxon 7 exerceria seus efeitos pela interação com outras proteínas, como as chaperonas (proteína subcelular que controla o tráfego da enzima) ou com outras proteínas envolvidas em seu processo de degradação, sendo esses mecanismos independentes da ação catalítica da eNOS (HINGORANI, 2001).

Polimorfismo do Íntron 4b/a

O polimorfismo para o íntron 4 constitui-se de dois alelos, os quais têm sido identificados como: o maior alelo 4b que consiste em cinco repetições em tandem da sequência GAAGTCTAGACCTGCTGCA/GG GGGTGAG, e o menor alelo 4a que consiste em apenas quatro repetições em tandem ambos com 27 bp (MARSDEN et al., 1993; WANG; WANG, 2000). Assim como os outros polimorfismos, O Íntron 4b/a tem sido relacionado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, incluindo doença arterial coronariana (KIM et al., 2007), hipertensão arterial (ZINTZARAS; KITSIOS; STEFANIDIS, 2006) e acidente vascular cerebral (TAO;CHENG, 2013). Prévios trabalhos demonstraram que o alelo 4a estava relacionado a baixos níveis de nitrito/nitrato plasmáticos, no qual os indivíduos homozigotos para esse alelo exibiram redução de 20% na concentração dos metabólitos do NO quando comparados com indivíduos com genótipos 4b/b, assim como diminuição na expressão protéica da Enos (WANG et al., 2000; TSUKADA et al., 1998). No entanto, nem todos os trabalhos confirmam estes achados (JEEROOBURKHAN et al., 2001; YOON et al., 2000).

Exercício Físico, Pressão Arterial, NO e Estresse Oxidativo

O exercício físico é uma atividade realizada com repetições sistemáticas de movimentos orientados, com consequente aumento no consumo de oxigênio. O exercício físico provoca uma série de respostas fisiológicas nos sistemas corporais e, em especial no sistema cardiovascular com o objetivo de manter o equilíbrio celular em face ao aumento das demandas metabólicas e do consumo de energia (MCARDLE; KATCH; KATCH, 2010). Sabe-se que o exercício físico aeróbico de moderada intensidade, realizado continuamente, promove efeitos benéficos tanto na

prevenção quanto no tratamento das doenças cardiovasculares, e sua prática regular têm sido recomendada por diferentes associações de saúde do mundo. Seus benefícios também têm sido demonstrados na prevenção e/ou tratamento da hipertensão arterial (KINGWELL, 2000; LATERZA et al., 2007, PESCATELLO et al., 2004; ZANESCO; ANTUNES, 2007). Sendo assim, o sedentarismo e o baixo nível de condicionamento físico são considerados fatores de risco para o desenvolvimento dessas doenças (HASKELL et al., 2007). Dados experimentais mostram que a redução da pressão arterial após sessão aguda de exercício físico aeróbio varia de 18–20 mmHg (Δ) e de 7–9mmHg (Δ), respectivamente, em humanos com hipertensão leve ou moderada. Em indivíduos normotensos, a redução é de 8–10 mmHg (Δ) para a pressão sistólica e de 3–5 mmHg (Δ) para a pressão diastólica (KENNEY; SEALS, 1993) Além disso, prévias meta análises demonstraram que essas reduções são mais pronunciadas para os indivíduos hipertensos em comparação aos normotensos, tanto para a pressão arterial sistólica (HT Δ = -6,9 mmHg; NT Δ = -1,9 mmHg) quanto para a pressão arterial diastólica (HT Δ = -4,9 mmHg; NT Δ = -1,6 mmHg) em resposta ao treinamento físico aeróbio (CORNELISSEN; FAGARD, 2005; PATTYN et al., 2013).

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 estímulos poderosos para a geração de NO no sistema vascular. Assim, um dos efeitos benéficos do exercício físico regular está estreitamente relacionado à maior produção de NO e/ou sua menor inativação. Estes efeitos benéficos tem sido associados a aumento na atividade de enzima eNOS, aumento na expressão de enzimas antioxidantes ou redução na expressão de subunidades de enzimas oxidantes, principalmente a NADPH oxidase (CLAUDINO et al., 2010; De MORAES et al., 2008; KINGWELL, 2000, SESSA et al., 1994).

Exercício Físico e Polimorfismos do gene NOS3

Poucos estudos existem associando a influência do polimorfismo do gene NOS3 sobre os efeitos benéficos do treinamento físico aeróbio (TFA) sobre o sistema cardiovascular. Prévio estudo epidemiológico mostrou que indivíduos saudáveis polimórficos para a posição Íntron 4 associado a baixos níveis de

atividade física, apresentavam maiores valores da pressão arterial sistólica comparado aos indivíduos não polimórficos para essa posição. De maneira interessante, quando os indivíduos apresentavam médio e alto nível de atividade física, essa diferença desaparecia, mostrando assim a íntima relação entre um fator ambiental, como a atividade física e a os fatores genéticos (polimorfismo do Íntron 4) na modulação da pressão arterial (KIMURA, 2003). Um outro estudo demonstrou que indivíduos polimórficos para a posição 894, submetidos a um programa de TFA por 20 semanas, apresentavam menor redução da pressão arterial diastólica e do duplo produto em comparação aos indivíduos não polimórficos durante exercício submáximo (RANKINEN et al., 2000).

Mais recentemente, estudo avaliando pacientes com doença arterial coronariana que apresentavam ambos os polimorfismos para o gene NOS3 na região promotora -786T>C e/ou do éxon 7, 894G>T, observaram que a resposta vasodilatadora dependente do endotélio apresentava-se reduzida para ambos os polimorfismos. Por outro lado, o treinamento físico proporcionou melhora nessa redução, sendo essa somente observada para os pacientes que apresentavam polimorfismo para a posição 894G>T, mas não para aqueles com polimorfismo para a posição -786T>C. Estes dados mostram a interferência do polimorfismo para a posição -786T>C na resposta benéfica do exercício físico aeróbio sobre sistema cardiovascular (ERBS, 2003). Por outro lado, trabalho avaliando a influência do polimorfismo para a posição -786T>C em indivíduos hipertensos submetidos a duas sessões de exercício físico, demonstrou que os voluntários que apresentavam o alelo C respondiam melhor aos efeitos hipotensores da sessão aguda de exercício físico aeróbio comparado àqueles que apresentavam o alelo T (AUGERI et al., 2009). Assim, estes trabalhos mostram resultados conflitantes na avaliação entre a influência do polimorfismo para o gene NOS3 e os efeitos do exercício físico aeróbio no sistema cardiovascular. Além disso, estes trabalhos eram compostos apenas por homens e com doença cardiovascular. Até o presente momento nenhum trabalho buscou relacionar a presença dos genótipos/haplótipos para as posições -786T>C, 894G>T e Íntron 4b/a com o TFA em indivíduos saudáveis e com hipertensão arterial. Estudos prévios em nosso laboratório mostram que a presença de SNP para a posição -786T>C, determina menor resposta pressórica em mulheres (SPONTON et al., 2010). Dessa forma, as hipóteses desse estudo foram:

- 1. Avaliar se os polimorfismos do gene NOS3 poderiam atenuar ou inibir os efeitos benéficos do treinamento físico aeróbio sobre a pressão arterial
- 2. Avaliar se os parâmetros bioquímicos (estado redox e concentrações de nitrito/nitrato) estariam relacionados a essa resposta

1.1 Objetivo

Avaliar a influência dos genótipos e haplótipos para as posições polimórficas - 786T>C, 894G>T e Íntron 4 do gene NOS3 sobre os parâmetros cardiovasculares e bioquímicos em adultos submetidos ao treinamento físico aeróbio.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), processo 028/2010 (Anexo N). Os participantes desse estudo foram recrutados através de panfletos, jornais, telejornais, rádio e anúncios dentro da comunidade universitária, das áreas circunvizinhas à universidade, na cidade e região de Rio Claro.

Critérios de inclusão

Os voluntários (homens e mulheres) participantes do estudo deveriam apresentar idade ≥ 40 anos, ser sedentário (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 diabético (nível de glicose em jejum < 126 mg/dl), ter função renal normal (creatinina sérica < 135 mmol/L), não obeso (IMC < 30 kg/m²), não ser fumante, ser normotenso ou hipertenso, autoimunes, neurodegenerativas, renais, respiratórias, osteomioarticulares, câncer, entre outras condições que pudessem impedir a prática de exercício físico. Esses critérios foram determinados de acordo com prévias diretrizes (CHOBANIAN et al., 2003; NOBRE et al., 2010; HASKELE et al., 2007). Uma avaliação médica foi realizada previamente ao início do estudo para seleção dos voluntários de acordo com os critérios de inclusão.

Caracterização do quadro Hipertensivo (HT)

Os voluntários foram classificados como HT segundo diagnóstico previamente realizado pelo médico do paciente e de acordo com a atual diretrizes brasileira de hipertensão arterial previamente mencionada. Os participantes que se enquadravam segundo os critérios de inclusão, foram convidados a comparecerem ao Laboratório de Fisiologia Cardiovascular e Atividade física, para um exame inicial e também para uma explicação completa do estudo pelo pesquisador responsável. De acordo com as normas do CONEP CNS 196/96, um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi obtido de todos os participantes após terem sido fornecidas as

informações dos procedimentos do estudo, de seus riscos e benefícios e esclarecimento das dúvidas existentes.

Parâmetros Antropométricos

O peso corporal foi mensurado em balança digital (Toledo® 2096 PP) de acordo com as normas para a medida. A estatura foi mensurada com o estadiômetro da própria balança, isenta de rodapés ou irregularidades. O índice de massa corporal (IMC) foi determinado pela razão peso corporal/ altura². O valor da circunferência abdominal (CA) foi também medido para avaliar o efeito do treinamento físico sobre o tecido adiposo abdominal, sendo as medidas tomadas em triplicata entre a crista ilíaca e a última costela, com a utilização de uma fita metálica antropométrica com precisão em milímetros (mm) (HEYWARD; STOLARCZYK, 1998).

Parâmetros Cardiovasculares

Medida da frequência cardíaca de repouso (FC de repouso)

Para determinação da FC de repouso, ao chegarem ao Laboratório, os voluntários permaneceram em repouso durante 15 minutos, sendo os valores de FC registrados e armazenados através de um frequencímetro da marca Polar (RS 800CX). A determinação da FC de repouso foi realizada utilizando-se o valor médio dos 15 minutos de registro efetuados. Para esta avaliação, os voluntários foram orientados a não consumirem qualquer bebida/medicamento que pudesse alterar a resposta da FC de repouso.

Medida da pressão arterial de repouso

Após 15 minutos de repouso, a pressão arterial foi aferida na posição sentada utilizando-se o esfigmomanômetro aneróide (Tycos, Raleigh, NC, USA). As medições foram realizadas em triplicata em diferentes dias conforme a recomendação da atual diretriz brasileira de hipertensão (NOBRE et al., 2010).

Monitoramento Ambulatorial da Pressão Arterial (MAPA)

Os valores pressóricos dos voluntários foram avaliados previamente (Período Intermediário) e após (Período Final) TFA através do monitoramento ambulatorial da pressão arterial (MAPA) de 24 horas (*Dyna-MAPA⁺, São Paulo, Brasil*). O MAPA registrou a pressão arterial a cada 15 minutos durante o dia (período de vigília) e a cada 30 minutos durante a noite (período de sono). Todos os voluntários foram instruídos a manterem suas atividades habituais e a preencherem um recordatório sobre as atividades realizadas no dia do exame.

Coleta Sanguínea

Após jejum noturno 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. As coletas sanguíneas foram realizadas em um laboratório de análises clínicas.

Parâmetros Bioquímicos

Perfil Lipídico e Glicose.

Amostras de soro foram utilizadas para a determinação dos níveis de colesterol total (CT), HDL Colesterol (HDL – C), LDL Colesterol (LDL – Colesterol) VLDL Colesterol (VLDL – C), Triglicerídeos (TG), Creatinina e Glicose pelo método espectrofotométrico automático (Cobas Mira Plus®).

Estresse oxidativo e concentrações de nitrito/nitrato (NOx⁻)

Amostras de plasma ou soro foram utilizadas para determinação das concentrações de NOx⁻, peroxidação lipídica (através da determinação das concentrações de malondialdeído -MDA) e da atividade enzimática da SOD e catalase através do método colorimétrico, utilizando-se de kit colorimétrico (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Especificamente para as concentrações de NOx⁻, as

amostras de plasma foram ultra filtradas por meio de micro filtros (Microcon Centrifugal Filter Units, 10 kDa; Millipore, Bedford, MA, USA), sendo o filtrado posteriormente utilizado na análise dos metabólitos.

SOD

A reação para determinação da atividade da SOD ocorre inicialmente pela ação catalisadora da xantina oxidase sobre a xantina (hipoxantina) levando a formação do O_2^- . Posteriormente, o O_2^- sofre dismutação pela ação da SOD levando à formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Quando não dismutado pela SOD, o O_2^- reage (reduz) o sal tetrazólio formando o composto conhecido como formazan. Uma unidade (U) de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para exibir 50% de dismutação (IC_{50}) do radical superóxido. A determinação da atividade da SOD foi realizada pela avaliação da absorbância em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 440 nm. As amostras foram analisadas em duplicata. Os coeficientes de variação intra e inter amostra apresentaram-se dentro dos limites recomendado pelo fabricante.

Catalase

A determinação da atividade da catalase foi realizada através da sua atividade peroxidásica. Esse método é baseado na reação da enzima com o metanol (CH_3OH) na presença de uma concentração ótima de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A formação do formaldeído é mensurado colorimetricamente com o 4-amino-3-hidrazino-5-mercaptop-1,2,4-triazol (Purpald) como o composto cromogênico. O Purpald forma especificamente um composto bicíclico heterocíclico com os aldeídos, que em estado de oxidação muda para a coloração roxa. A determinação da atividade da catalase foi realizada pela avaliação da absorbância em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 540 nm. As amostras foram analisadas em duplicata. Os coeficientes de variação intra e inter amostra apresentaram-se dentro dos limites recomendado pelo fabricante.

NO_x⁻

Para determinação da produção endógena de NO, foi realizada a quantificação dos ânions nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻), produtos terminais da oxidação do NO. A primeira fase da reação se dá pela conversão das concentrações de nitrato para nitrito através da reação enzimática da nitrato redutase. Posteriormente, a adição da sulfanilamida (Griss 1) e em seguida do N-(1-Naphthyl) ethylenediamine (Griss 2) promove a formação de um componente “azo” caracterizado como um cromóforo de coloração roxa, sendo quantificado através do método espectrofotométrico em comprimento de onda de 540-550 nm.

MDA

Para determinação da peroxidação lipídica, foram quantificadas as concentrações séricas de MDA. A reação do MDA ocorre pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) sob alta temperatura (90 - 100°C) formando o componente “MDA-TBA adduct”, sendo as concentrações mensuradas colorimetricamente por espectrofotômetro em comprimento de onda de 530-540nm.

Parâmetros Genéticos

Extração do DNA genômico

O DNA dos participantes foi obtido dos leucócitos, a partir do protocolo Clorofórmio-Fenol modificado. O sangue foi centrifugado a 2650 rpm por 10 minutos, o plasma descartado e os eritrócitos lisados com uma mistura de soluções contendo NH₄Cl 0,144M e NH₄HCO₃ 0,01M. Após centrifugação o sobrenadante foi desprezado e este último passo repetido mais duas vezes. A seguir, a solução denominada TKM1 (Tris-HCl 10mM; pH 7,6; KCl 10mM; MgCl₂ 10mM; EDTA 20mM) foi adicionada ao precipitado juntamente com 1 gota de Triton X-100. As amostras, depois de homogeneizadas, foram centrifugadas a 2650 rpm por 10 minutos, e posteriormente o sobrenadante foi descartado obtendo-se o precipitado de leucócitos.

Para lisar os leucócitos, foram adicionados 400 µl da solução TKM2 (Tris-HCl 10 mM pH 7,6; KCl 10mM; MgCl₂ 10mM; NaCl 0,4M; EDTA 20mM) e 25µl de SDS 10% e incubado à 55°C por 30 min. Após esse período, 180µl de NaCl 5M foram adicionados à solução anterior e mantida em temperatura ambiente por 15 minutos. A amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante transferido para outro tubo, sendo adicionado 400µl de fenol pH 8,0 e igual volume de uma solução clorofórmio/álcool isoamílico (proporção 24:1) para precipitação de proteínas, seguido de homogeneização, centrifugação e transferência do sobrenadante para outro tubo. Para a completa remoção de proteínas da amostra, 900µl 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 5,2 e 900µl de etanol absoluto gelado. O tubo foi centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o DNA precipitado foi lavado com 1ml de etanol 70% gelado. Posteriormente o DNA foi solubilizado em 30µl de tampão Tris-EDTA (TE) estéril e armazenado em geladeira até o dia seguinte. O DNA foi quantificado em equipamento NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc, WILMINGTON, DE, USA) e a análise qualitativa realizada em gel de agarose 1,0%.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica de amplificação de DNA *in vitro* proposta por (SAIKI et al., 1992). 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. A reação 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 do DNA; aproximadamente 55°C - anelamento dos *primers*, e 72°C – extensão, etapa em que há a incorporação dos nucleotídeos, resultando em um acúmulo exponencial do fragmento. Os *primers* utilizados na PCR para a obtenção do fragmento que pode conter o polimorfismo para a posição -786T>C e 894G>T foram desenhados no Laboratório de Bioquímica e Genoma na Unicamp através do

programa Gene Runner. Já os *primers* para o Íntron 4b/a do gene NOS3 foram sintetizados de acordo com Wang et al., (1996) com modificações. Detalhes dessa metodologia estão demonstrados nas tabelas abaixo.

Quadro 1. “*Primers*” utilizados na PCR para as diferentes regiões do gene NOS3 e tamanho dos produtos de amplificação.

Região NOS3	Tamanho	Sense (5'-3')	Antisense (5'-3')
- 786	394 pb	CACCCAGGCCCAACCCCAACT	GCCGCAGGTCGACAGAGAGACT
894	248 pb	AAGGCAGGAGACAGTGGATGG	CCCAGTCAATCCCTTTGGTGCTC
Íntron 4	420 pb	AGGCCCTATGGTAGTGCCTTG	TCTCTTAGTGCTGTGGTCACAG

Quadro 2. Ciclos da PCR e reação de sequenciamento das posições -786T>C, 894G>T e Íntron 4b/a do gene NOS3.

Região	Desnaturação inicial		Desnaturação 35 ciclos				Extensão		Extensão Final	
	T(°C)	Tempo	T(°C)	Tempo	T(°C)	Tempo	T(°C)	Tempo	T(°C)	Tempo
NOS3 - 786/894/Íntron 4	96	2'	96	30''	55	30''	72	1'	72	5'

Purificação da PCR

Os produtos da PCR foram purificados através da enzima de purificação Exosap-IT PCR clean-up kit (GE Healthcare) utilizando um mix de (0,4 µL de Exosap + 3,6 µLH₂O) e posterior reação em termociclador conforme abaixo descrito (tabela 2). Posteriormente, os produtos da PCR purificada foram determinados através da quantificação em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Quadro 3. Ciclos da purificação da PCR.

Incubação		Desnaturação da Enzima	
Temperatura (°C)	37	Temperatura (°C)	80
Tempo (min)	60	Tempo (min)	15

Reação de Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se DNA molde (5-20ng), BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) (2 µL), *primer* (0,5 µL), tampão “Save Money” (1 µL) e água deionizada (q.s.p) num volume final de 10 µL. As condições de amplificação e os *primers* utilizados estão descritos acima (Tabela 1). Posteriormente, os produtos da reação de sequenciamento foram sequenciados em ambas as direções (sense e antisense), utilizando sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems).

Avaliação da capacidade cardiorrespiratóriaFamiliarização com o ergômetro.

Previamente ao início do treinamento físico, os voluntários foram familiarizados (3-5 sessões) com o ergômetro utilizado durante o estudo (esteira ergométrica).

Determinação da Máxima Fase Estável do Lactato (MFEL).

A MFEL pode ser definida como a maior intensidade de esforço onde se observa um equilíbrio entre a produção e a remoção do lactato sanguíneo, sendo essa condição normalmente associada à capacidade do indivíduo de sustentar um exercício contínuo por períodos prolongados de tempo (BENEKE; HÜTLER; LEITHÄUSER, 2000). A MFEL é considerada a melhor intensidade de esforço para o aprimoramento da aptidão cardiorrespiratória.

O protocolo para determinação da MFEL foi constituído de cargas constantes e duração fixa de 30 minutos, com coletas sanguíneas para medição do lactato realizadas no repouso e no 10º e 30º minutos do teste (BENEKE, 2003). Para a caracterização da MFEL, os incrementos na concentração de lactato [Lac] não deveriam ser superiores a 1mmol/l do 10º ao 30º minuto do teste. Os testes foram realizados em dias não consecutivos (2-5 dias) com intensidades diferentes a cada dia de teste.

As amostras de sangue foram coletadas no lóbulo da orelha, em capilares heparinizados (25µL) e armazenadas em tubos (1,5 ml) diluídas em ácido tricloroacético (400 µL). Posteriormente, as amostras foram analisadas pela determinação da absorbância em espectrofotômetro.

Teste do Consumo Pico de Oxigênio ($VO_{2\text{ pico}}$)

O $VO_{2\text{ pico}}$ foi definido de forma indireta e submáxima através da realização do teste de 1 milha (1.609 metros) preconizado originalmente por Kline et al., (1987), e adaptado para esteira por Widrick et al., (1992). Em um período prévio (~5 minutos), os voluntários foram instruídos a selecionarem a velocidade mais rápida de caminhada (sem correr) na qual seria possível sustentá-la por aproximadamente 15 a 20 minutos. Após esse período, o teste foi iniciado e a velocidade determinada previamente foi mantida até a execução dos 1609 metros. Para o cálculo do $VO_{2\text{ pico}}$, 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 RS800CX) e o cronômetro digital da própria esteira. Os voluntários hipertensos que faziam terapia anti-hipertensiva através do uso de β bloqueadores não realizaram o teste de 1 milha. De posse desses dados, o $VO_{2\text{ pico}}$ foi calculado conforme equação proposta por (POBER et al., 2002).

$VO_{2\text{ pico}} = 92,08 - 0,10$ (peso corporal em libras) – $0,34$ (idade em anos) + $9,72$ (gênero; masculino=1; feminino= 0) – $1,01$ (tempo de caminhada em minutos e centésimos de minuto) – $0,13$ (frequência cardíaca final em bpm) + $0,86$ (nível de atividade física)

Percepção Subjetiva de Esforço

Para percepção subjetiva de esforço foi utilizada durante o exercício a escala psicofísica de Borg (1998) variando de um valor de mínimo esforço (número 6 da tabela) a um valor de máximo esforço (número 20 da tabela). A figura 1 demonstra 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 1. Escala de percepção subjetiva de esforço (escala de Borg)

Treinamento Físico Aeróbio (TFA)

O TFA foi realizado no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular e Atividade Física – Departamento de Educação Física (UNESP/Rio Claro). O programa de atividade física foi realizado em uma sala com temperatura ambiente de 20-24°C e umidade do ar entre 40% a 60%. Todos os participantes foram submetidos a três sessões/semana de TFA em esteira ergométrica (Movement® RT 250 PRO) sob supervisão direta durante oito semanas. Nas primeiras 04 semanas o TFA foi realizado com duração de 30 minutos em intensidade a 100% da MFEL. Posteriormente, nas 04 semanas finais, o TFA foi realizado com duração de 40 minutos em intensidade a 100% da MFEL. A duração do treinamento foi controlada pelo cronômetro digital da própria esteira ergométrica e a intensidade com base nos valores pré-determinados nos testes de MFEL. Durante todas as sessões do TFA foram registrados os valores individuais de FC e percepção subjetiva de esforço a

cada 10 minutos, sendo realizadas três medidas nas 04 semanas iniciais e quatro medidas nas 04 semanas finais.

Desenho Experimental.

O desenho experimental foi realizado através do modelo ensaio clínico controlado cruzado, sendo este dividido em 3 diferentes períodos de avaliações:

PI – Período Inicial;

PINT – Período Intermediário;

PF – Período Final

As avaliações do PI e PF foram realizadas em aproximadamente 1 semana, enquanto as do PINT em aproximadamente 2 semanas.

Além dos períodos de avaliação acima citados, o estudo foi caracterizado por dois diferentes momentos:

Controle – Período no qual os voluntários permaneceram 8 semanas sem a realização de atividade física regular;

Treinamento Físico Aeróbio – Período no qual os voluntários realizaram TFA por 24 sessões durante 8 semanas.

O desenho experimental foi constituído por ciclos de aproximadamente 5 meses, sendo que para esse estudo foram estabelecidos 4 ciclos, totalizando aproximadamente 20 meses de coleta de dados. Os voluntários que não realizaram efetivamente todas as avaliações/testes estabelecidos foram excluídos do estudo. A Figura 2 ilustra o desenho experimental.

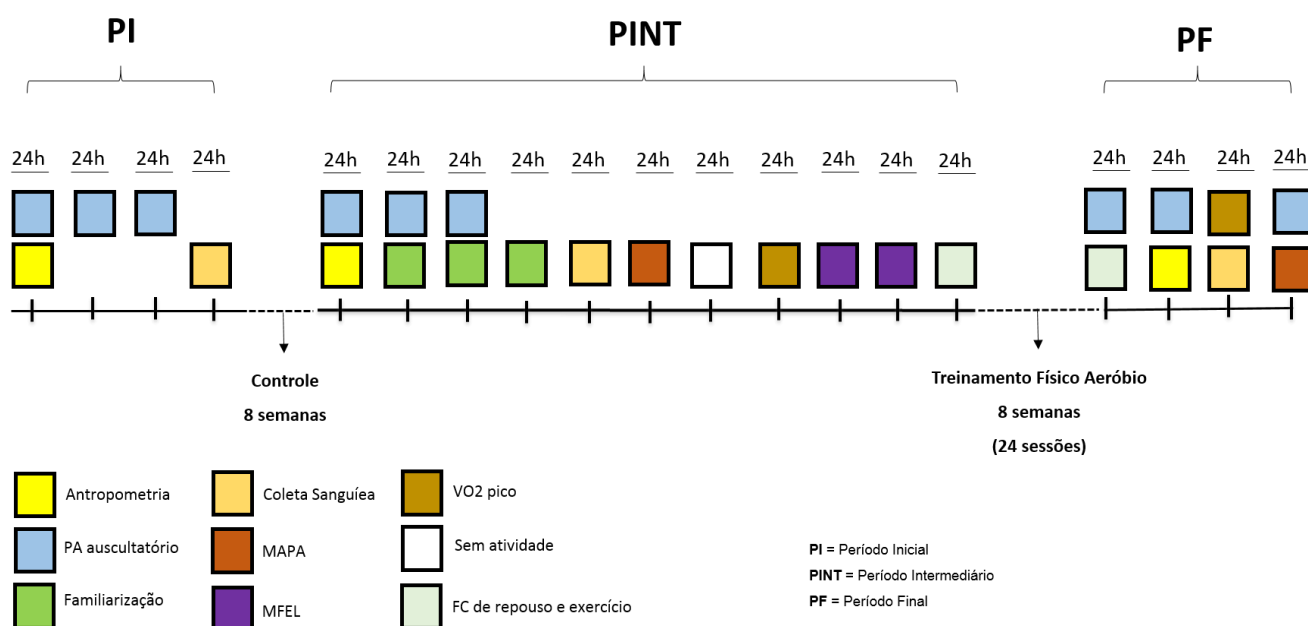


Figura 2. Desenho Experimental

Análise Estatística

As análises de normalidade e esfericidade foram realizadas através dos testes de Kolmogorov Smirnov e Mauchly respectivamente. Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Para comparação entre os grupos (normotensos x hipertensos; não polimórficos x polimórficos) e períodos (PI x PINT x PF) foram utilizados os testes abaixo descritos:

- Teste *t de Student* não pareado: comparação entre os grupos para cada um dos períodos de estudo, assim como para a comparação entre o Δ (PF – PINT).
- Teste *t de Student* pareado: comparação entre o PINT x PF dentro de cada grupo do estudo.
- ANOVA medidas repetidas/*pós hoc tukey*: comparação entre PI x PINT x PF dentro de cada grupo.
- Teste de qui quadrado (χ^2): comparação percentual das patologias/medicações entre os grupos do estudo.

Foram determinados os valores de frequência (f) referentes aos genótipos e haplótipos para as posições analisadas dos voluntários do estudo.

O nível de significância de $p < 0,05$ foi aceito como diferente estatisticamente.

3. RESULTADOS:

3.1 PARTE 1

NORMOTENSOS VERSUS HIPERTENSOS: EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO

Para esse estudo foi utilizado um banco de dados com um total de 502 voluntários. Desse total, 304 voluntários foram excluídos por não atenderem aos critérios de inclusão exigidos, sendo 198 voluntários qualificados a iniciar as avaliações. Posteriormente, 67 voluntários foram excluídos durante os períodos de avaliação inicial e intermediário, sendo que 131 iniciaram o TFA. Por fim, 45 voluntários foram excluídos durante o TFA ou avaliação final, sendo que 86 voluntários cumpriram todas as etapas do estudo. As questões pessoais por parte dos voluntários do estudo, assim como o não cumprimento do critérios estabelecidos no presente estudo, são classificadas como as principais razões relacionadas a descrita perda amostral conforme ilustrado na Figura 3.

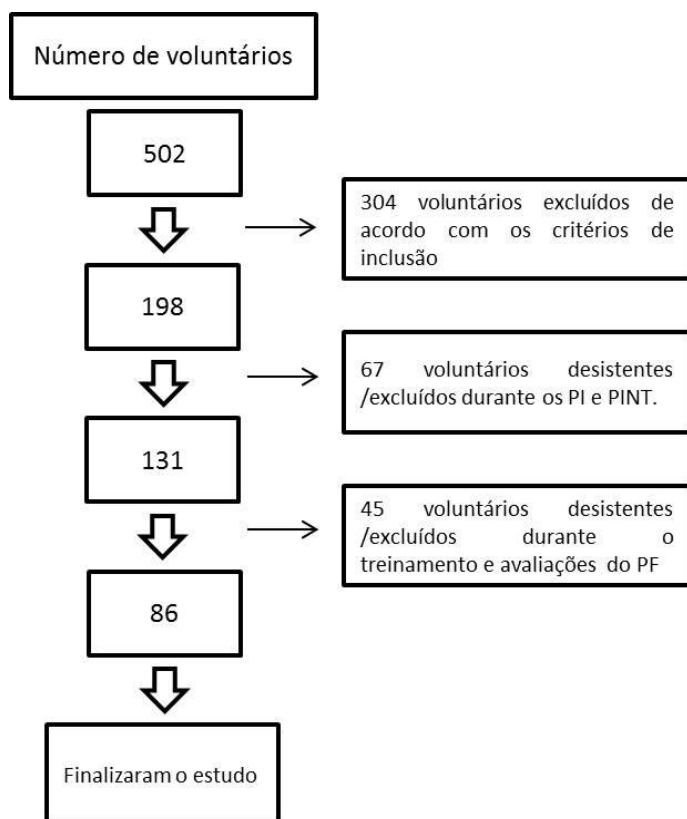


Figura 3. Caracterização da seleção dos voluntários

Dessa forma, todos os dados estão baseados nos 86 voluntários que finalizaram todas as etapas do estudo. Desse total, 55 voluntários foram classificados como NT (idade: $49,6 \pm 0,6$ anos) e 31 voluntários foram classificados como HT (idade: $52,9 \pm 1,2$ anos). Não foram observadas diferenças significativas na comparação entre ambos os grupos. O grupo de voluntários NT foi constituído de 39 mulheres (71%) e 16 homens (29%), enquanto o grupo de voluntários hipertensos foi constituído de 23 mulheres (74%) e 8 homens (26%). Não foram observadas diferenças significativas quanto ao sexo na comparação entre os grupos. Especificamente em relação as mulheres, também não foram observadas diferenças significativas em relação as concentrações dos hormônios folículo estimulante e luteinizante (caracterizando as fases do climatério) entre os grupos analisados (dados não apresentados).

Antropometria

Os voluntários apresentavam sobrepeso em ambos os grupos e o TFA não provocou qualquer alteração no IMC, tanto para o grupo de voluntários NT quanto para os HT. Quanto à circunferência abdominal, observamos que os voluntários HT apresentaram maiores valores de circunferência abdominal (CA) no PF quando comparados aos voluntários NT. O treinamento físico reduziu significativamente a CA em voluntários NT (PINTxPF: -1,6%), sem diferenças significativas para o grupo de voluntários HT. Os dados estão sumarizados na Tabela 1 e Figura 4.

Tabela 1. Efeito 24 sessões de TFA sobre os parâmetros antropométricos (índice de massa corporal e circunferência abdominal) de voluntários normotensos e hipertensos.

	NT (<i>n</i> = 55)			HT (<i>n</i> = 31)		
	PI	PINT	PF	PI	PINT	PF
IMC (kg/m ²)	26,3±0,3	26,4±0,3	26,2±0,3	27,4±0,4	27,3±0,4	27,3±0,4
CA (cm)	84,0±1,2	83,6±1,2	82,3±1,1*	87,6±1,4	86,9±1,5	86,6±1,5#

PI = Período Inicial; PINT = Período Intermediário; PF = Período Final; IMC = Índice de Massa Corporal; CA = Circunferência Abdominal; Os dados estão expressos em média ± EPM. *= *p*<0,05 em relação ao PI e PINT; # = *p*<0,05 em relação ao mesmo período do grupo NT.

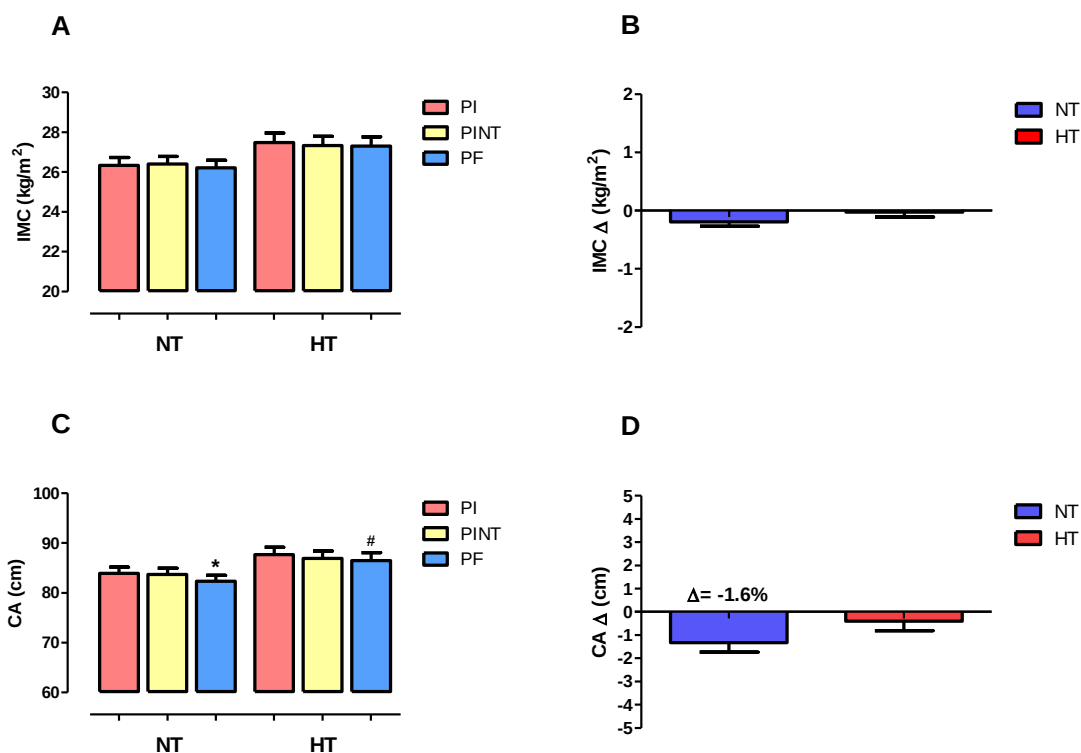


Figura 4. Efeito de 24 sessões de TFA sobre os parâmetros antropométricos (**A.** Índice de massa corporal; **B.** Delta Índice de massa corporal; **C.** Circunferência Abdominal; **D.** Delta Circunferência Abdominal) entre os períodos inicial (PI), intermediário (PINT) e final (PF) para os grupos de voluntários normotensos (*n*=55) e hipertensos (*n*=31). *= *p*<0,05 em relação ao PI e PINT; # = *p*<0,05 em relação ao mesmo período do grupo NT.

Em relação à MFEL, não foram observadas diferenças significativas para as concentrações plasmáticas de lactato entre o grupo de voluntários normotensos e hipertensos (Figura 5). Por outro lado, foram observadas diferenças significativas em relação à frequência cardíaca e percepção subjetiva de esforço entre os dois momentos (10min e 30min) durante a realização do exercício físico na intensidade da MFEL (Figura 6).

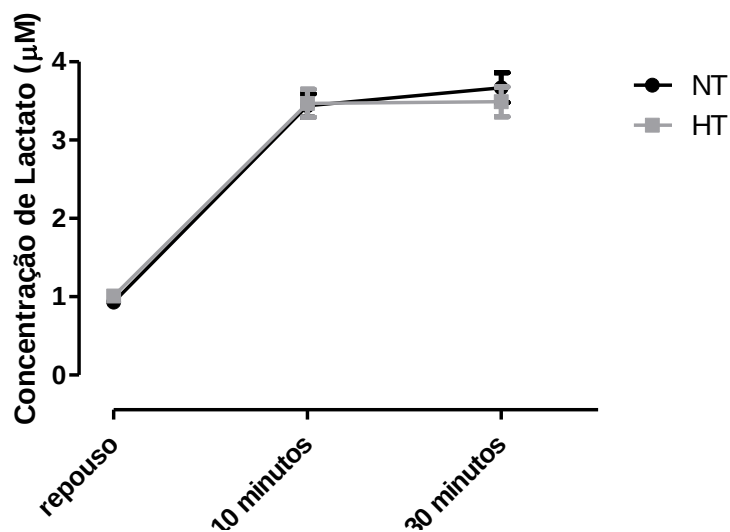


Figura 5. Concentração de lactato relativa à intensidade da MFEL

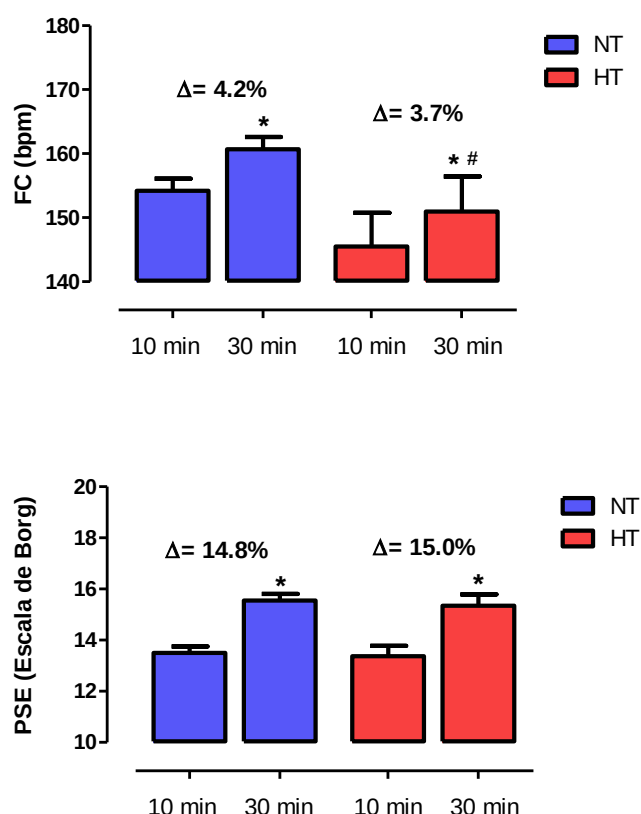


Figura 6. Resposta da frequência cardíaca e percepção subjetiva de esforço (PSE) relativa à intensidade da máxima fase estável de lactato (MFEL). *= $p < 0,05$ em relação ao PI e PINT; # = $p < 0,05$ em relação ao mesmo período do grupo NT.

Do total de hipertensos, 13 voluntários (41,9%) não faziam uso de terapia anti-hipertensiva. Além disso, 11 voluntários (35,5%) faziam uso de monoterapia anti-hipertensiva (45,5% inibidores da ECA, 36,4% antagonistas do receptor AT1, 9,1% Inibidores dos canais de cálcio e 9,1% β bloqueadores). Por fim, 7 voluntários (22,6%) faziam uso de politerapia anti-hipertensiva (28,6% antagonistas AT1 + Diurético, 28,6% antagonistas AT1 + bloqueadores dos canais de cálcio, 14,3% antagonistas AT1 + bloqueadores dos canais de cálcio + diuréticos, 14,3% β bloqueadores + bloqueadores dos canais de cálcio e 14,3% antagonistas AT1 + β bloqueadores). As Figuras 7, 8 e 9 ilustram esses dados.

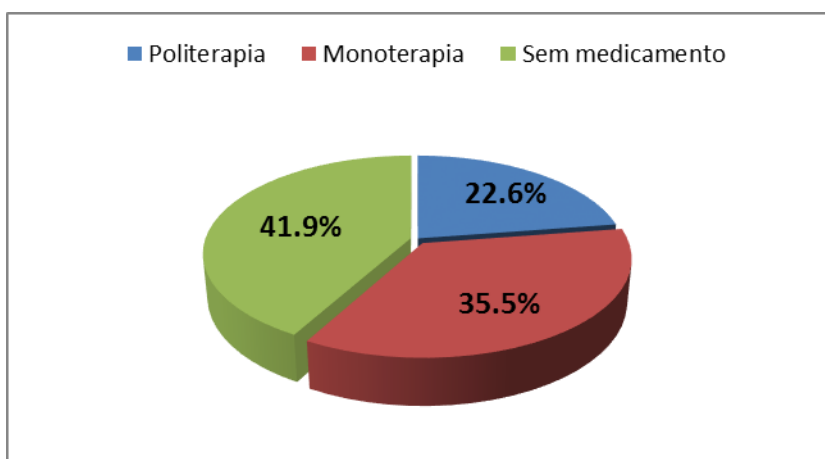


Figura 7. Características da terapia anti-hipertensiva.

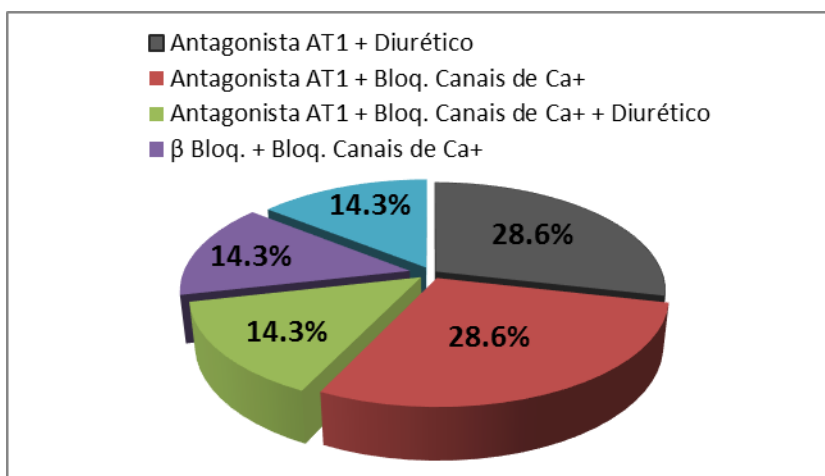


Figura 8. Politerapia anti-hipertensiva

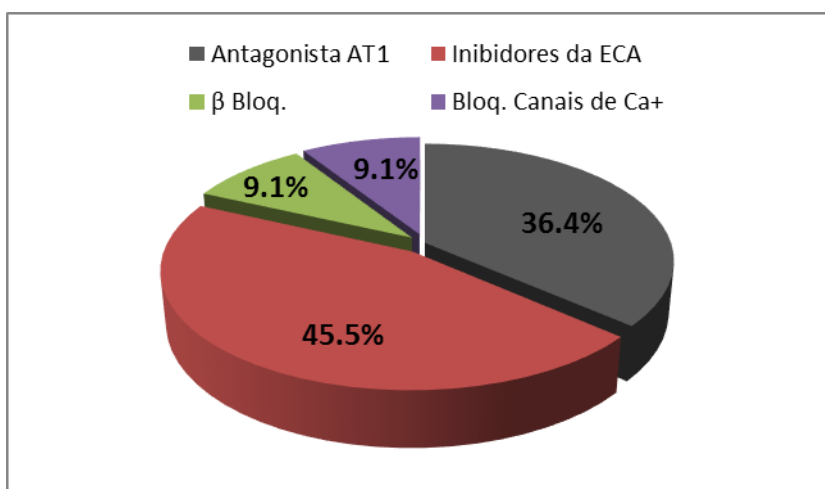


Figura 9. Monoterapia anti-hipertensiva

Cardiovascular

Em relação aos parâmetros cardiovasculares, conforme esperado, foram observadas reduções significativas da frequência cardíaca (FC) analisada durante as 24 sessões de treinamento físico realizado na intensidade relativa a 100% da MFEL, tanto para o grupo de voluntários normotensos (8,7%) quanto para os hipertensos (9,4%). Quando analisadas as respostas da FC antes e após o treinamento físico, em relação ao repouso, foram observadas reduções significativas para o grupo de voluntários NT (PINTxPF: -3,6%), sem modificações para os HT. Por outro lado, em relação à FC analisada durante uma sessão aguda de exercício físico aeróbio, foram observadas diferenças significativas para ambos NT (PINTxPF: -7,4%) e HT (PINTxPF: -9,2%), entre os períodos do estudo em resposta ao TFA (Tabela 2 e Figura 10).

Tabela 2. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a frequência cardíaca de repouso e de exercício para os voluntários normotensos e hipertensos.

	NT (n = 55)			HT (n =31)		
	PI	PINT	PF	PI	PINT	PF
FC repouso (bpm)	-	75,8±1,2	73,1±1,3*	-	76,2±1,8	74,1±2,1
FC exercício (bpm)	-	150,3±1,8	139,3±1,6*	-	146,1±2,4	132,5±2,6*

PI = Período Inicial; PINT = Período intermediário; PF = Período Final; FC repouso = frequência cardíaca analisada durante o repouso; FC exercício = frequência cardíaca analisada durante o exercício. Os dados estão expressos em média ± EPM. *= p<0,05 em relação ao PI e PINT; # = p<0,05 em relação ao mesmo período do grupo NT.

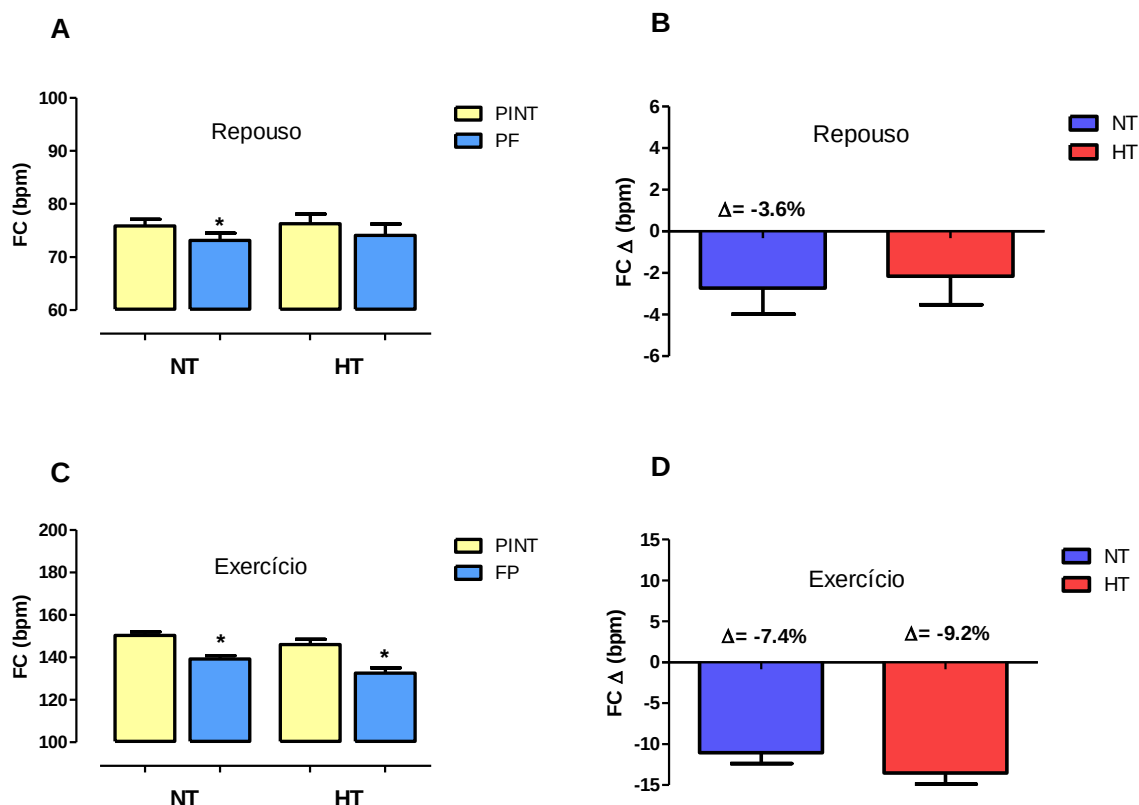


Figura 10. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a frequência cardíaca (**A.** frequência cardíaca de repouso; **B.** delta frequência cardíaca de repouso; **C.** frequência cardíaca de exercício; **D.** delta frequência cardíaca de exercício) entre os períodos intermediário (PINT) e final (PF) para os grupos de voluntários normotensos ($n=55$) e hipertensos ($n=31$). *= $p<0,05$ em relação ao PI e PINT.

Na análise da aptidão cardiorrespiratória, foram observadas alterações significativas em relação ao consumo pico de oxigênio para ambos os grupos de voluntários NT (PINT: $33,5\pm0,7$ versus PF: $34,4\pm0,6$ ml/kg/min, 2,7%) e HT (PINT: $31,2\pm0,8$ versus PF: $32,7\pm0,8$ ml/kg/min; 4,8%), entre os períodos do estudo em resposta ao TFA (Figura 11).

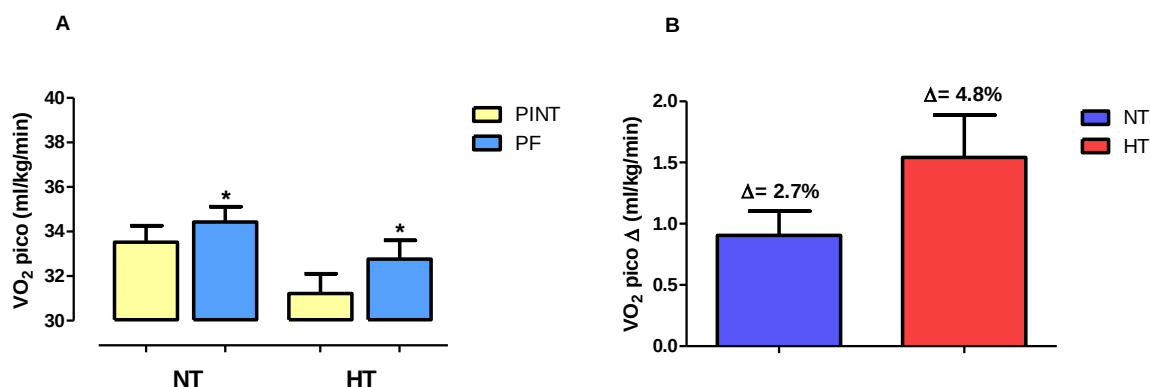


Figura 11. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a aptidão cardiorrespiratória (**A.** consumo pico de oxigênio; **B.** delta do consumo pico de oxigênio) entre os períodos intermediário (PINT) e final (PF) para os grupos de voluntários normotensos ($n=55$) e hipertensos ($n=31$). *= $p<0,05$ em relação ao PI e PINT.

Na análise da pressão arterial mensurada através do método auscultatório, conforme esperado, foram observadas diferenças significativas entre o grupo de voluntários NT e HT, tanto para a PAS (PI: 16,7%; PINT: 15,7%; PF: 13,9%) quanto para a PAD (PI: 13,5%; PINT: 14,1%; PF: 12,0%) entre os períodos do estudo. Além disso, quando avaliada a resposta da pressão arterial frente ao treinamento físico, foram verificadas diferenças significativas tanto para a PAS (PINTxPF: -2,4%) quanto para a PAD (PINTxPF: -2,2%) no grupo de voluntários NT. Da mesma forma, para o grupo de voluntários HT, foram observadas diferenças significativas tanto para a PAS (PINTxPF: -4,3%) quanto em relação à PAD (PINTxPF: -4,6%) entre os períodos do estudo. Por fim, de acordo com prévios estudos, verificou-se que a magnitude de redução da PAD foi maior para o grupo de voluntários HT quando comparado aos NT (Tabela 3 e Figura 12).

Tabela 3. Efeito de 24 sessões de TFA sobre os parâmetros cardiovasculares (pressão arterial sistólica e pressão arterial diastólica) mensuradas através do método auscultatório entre os voluntários normotensos e hipertensos.

	NT (n = 55)			HT (n =31)		
	PI	PINT	PF	PI	PINT	PF
PAS (mmHg)	108,9±1,3	108,9±1,6	106,3±1,2*	130,7±2,2#	129,2±1,8#	123,5±1,9*#
PAD (mmHg)	72,6±0,9	72,2±1,0	70,6±0,8*	83,9±1,2#	84,1±1,3#	80,2±1,2*#

PI = Período Inicial; PINT = Período intermediário; PF = Período Final; PAS = Pressão Arterial Sistólica; PAD = Pressão Arterial Diastólica; Os dados estão expressos em média ± EPM. *= p<0,05 em relação ao PI e PINT; # = p<0,05 em relação ao mesmo período do grupo NT.

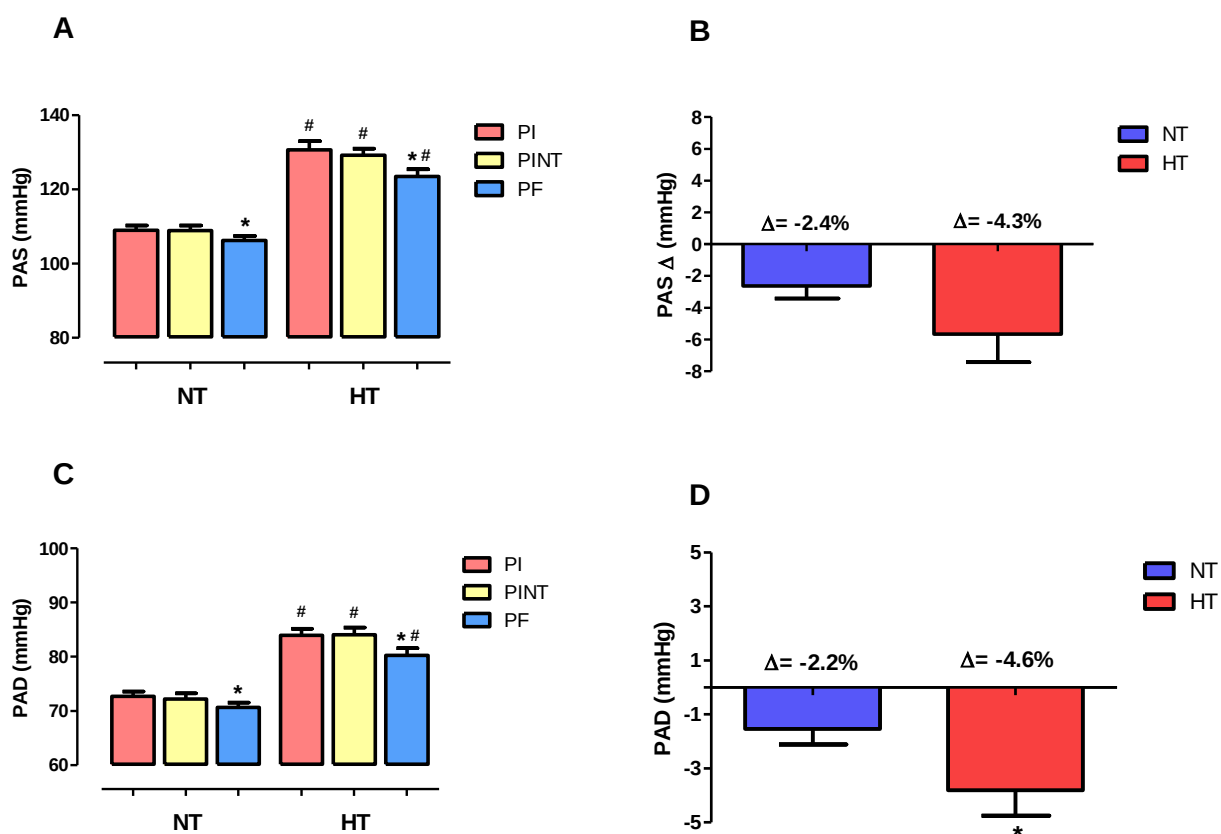


Figura 12. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a pressão arterial (**A.** pressão arterial sistólica; **B.** delta pressão arterial sistólica; **C.** pressão arterial diastólica; **D.** delta pressão arterial diastólica) mensuradas através do método auscultatório entre os períodos inicial (PI), intermediário (PINT) e final (PF) para o grupo de voluntários

normotensos ($n=55$) e hipertensos ($n=31$). $\ast = p<0,05$ em relação ao PI e PINT; $\# = p<0,05$ em relação ao mesmo período do grupo NT.

Em relação ao grupo de voluntários NT, na análise da pressão arterial mensurada pelo Monitoramento Ambulatorial da Pressão Arterial - MAPA, foram observadas diferenças significativas em resposta ao treinamento físico para a PAS durante as sono (PINTXPF: -2,2%) e 24h (PINTXPF: -1,6%) entre os períodos do estudo. Por outro lado, para a PAD, não foram observadas diferenças significativas para os momentos de vigília, sono e 24h. Para o grupo de voluntários HT, não foram verificadas diferenças significativas em resposta ao treinamento físico, tanto para a PAS quanto para a PAD em relação aos momentos de vigília, sono e 24h entre os períodos do estudo. Conforme esperado, foram observadas diferenças significativas em relação à PAS e PAD entre o grupo de voluntários NT e HT para os períodos do estudo (Tabela 4 e Figuras 13 e 14).

Tabela 4. Efeito de 24 sessões de TFA sobre os valores de pressão arterial sistólica e pressão arterial diastólica mensuradas através do monitoramento ambulatorial da pressão arterial (MAPA) em voluntários normotensos e hipertensos.

	NT ($n = 55$)			HT ($n = 31$)		
(mmHg)	PI	PINT	PF	PI	PINT	PF
PAS Vigília	-	115,7 $\pm$ 1,2	114,2 $\pm$ 1,2	-	128,8 $\pm$ 1,8 $\#$	125,6 $\pm$ 1,7 $\#$
PAD Vigília	-	75,1 $\pm$ 1,0	73,9 $\pm$ 1,0	-	84,0 $\pm$ 2,1 $\#$	82,4 $\pm$ 1,8 $\#$
PAS Sono	-	106,1 $\pm$ 1,2	103,7 $\pm$ 1,2 $\ast$	-	116,5 $\pm$ 2,0 $\#$	115,6 $\pm$ 1,8 $\#$
PAD Sono	-	66,3 $\pm$ 1,1	65,5 $\pm$ 1,0	-	74,2 $\pm$ 1,7 $\#$	74,2 $\pm$ 1,6 $\#$
PAS 24h	-	113,6 $\pm$ 1,1	111,7 $\pm$ 1,2 $\ast$	-	126,2 $\pm$ 1,8 $\#$	123,4 $\pm$ 1,6 $\#$
PAD 24h	-	73,2 $\pm$ 1,0	72,5 $\pm$ 1,0	-	82,0 $\pm$ 2,0 $\#$	80,4 $\pm$ 1,7 $\#$

PI = Período Inicial; PINT = Período intermediário; PF = Período Final; PAS = Pressão Arterial Sistólica; PAD = Pressão Arterial Diastólica; Os dados estão expressos em média $\pm$ EPM. $\ast = p<0,05$ em relação ao PI e PINT; $\# = p<0,05$ em relação ao mesmo período do grupo NT.

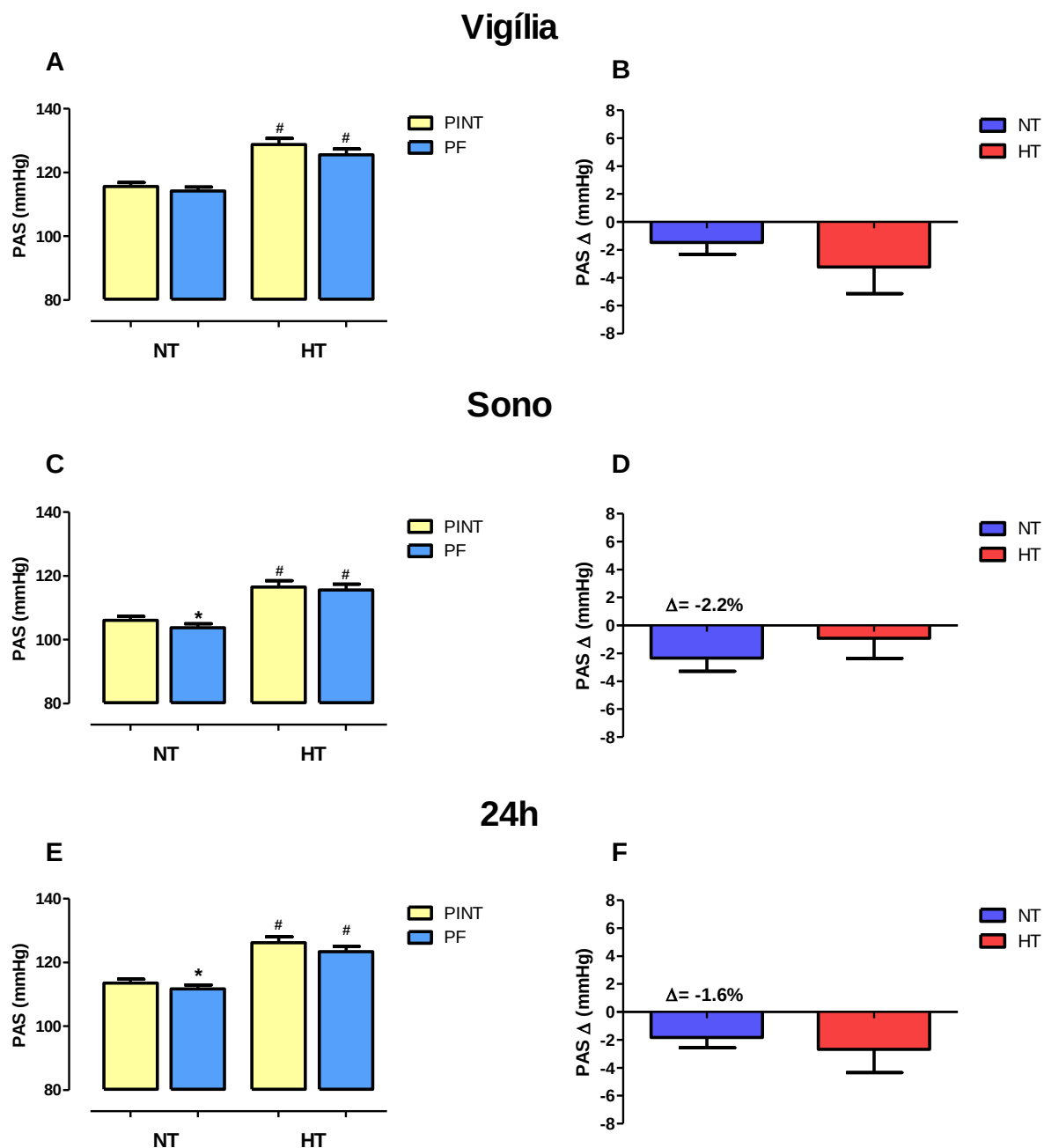


Figura 13. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a pressão arterial sistólica (**A.** Vigília; **B.** Delta Vigília; **C.** Sono; **D.** Delta Sono; **E.** 24h; **F.** Delta 24h) mensuradas através do monitoramento ambulatorial da pressão arterial (MAPA), entre os períodos intermediário (PINT) e final (PF) para o grupo de voluntários normotensos ($n=55$) e hipertensos ($n=31$). $\ast = p < 0,05$ em relação ao PI e PINT; $\# = p < 0,05$ em relação ao mesmo período do grupo NT.

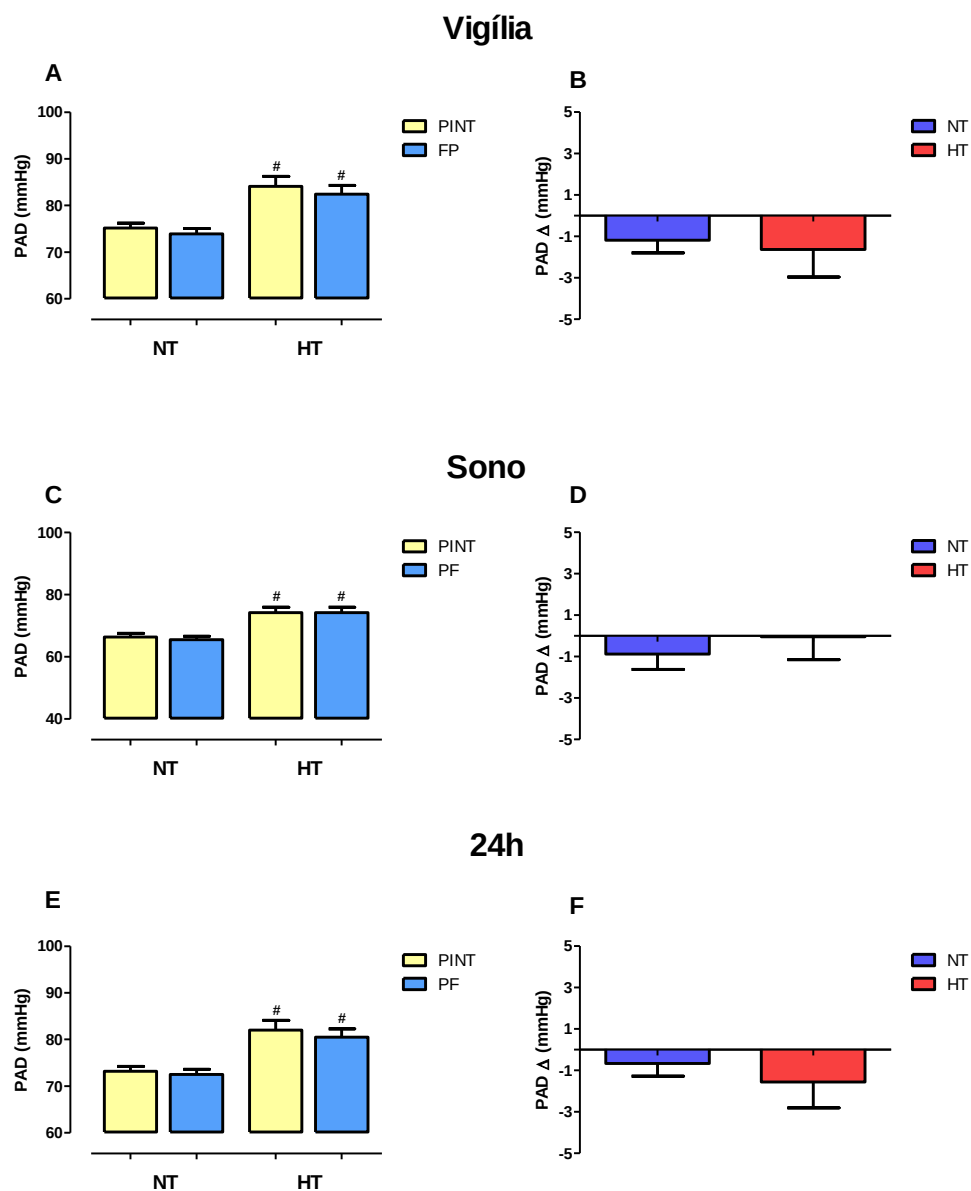


Figura 14. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a pressão arterial diastólica (**A.** Vigília; **B.** Delta Vigília; **C.** Sono; **D.** Delta Sono; **E.** 24h; **F.** Delta 24h) mensuradas através do monitoramento ambulatorial da pressão arterial (MAPA), entre os períodos intermediário (PINT) e final (PF) para o grupo de voluntários normotensos ($n=55$) e hipertensos ($n=31$). $\ast = p < 0,05$ em relação ao PI e PINT; $\# = p < 0,05$ em relação ao mesmo período do grupo NT.

Bioquímica

Não foram observadas diferenças significativas em resposta ao treinamento físico em ambos os grupos para as concentrações de colesterol total, LDL-C, HDL-C, VLDL-C, triglicerídeos e glicemia. Interessantemente, foram observadas elevação significativa nas concentrações séricas de creatinina em resposta ao treinamento físico em ambos os grupos (NT: PINTXPF: 6,0%) (HT: PINTXPF:14,5%) (Tabela 5 e Figuras 15 e 16).

Tabela 5. Efeito de 24 sessões de TFA sobre o perfil lipídico (CT, LDL-C, HDL-C, VLDL-C, TG), glicemia e creatinina entre os voluntários normotensos e hipertensos.

	NT (<i>n</i> = 55)			HT (<i>n</i> = 31)		
	PI	PINT	PF	PI	PINT	PF
CT (mg/dL)	200,2±3,7	198,2±4,0	196,9±3,6	202,3±6,1	199,2±6,4	197,5±5,8
LDL-C (mg/dL)	132,7±3,5	128,7±4,0	126,9±3,6	133,6±5,9	131,3±6,0	124,2±5,8
HDL-C (mg/dL)	45,4±0,7	45,9±0,7	46,0±0,7	46,1±1,1	44,2±0,9	47,1±1,1
VLDL-C (mg/dL)	22,0±1,3	23,5±1,2	24,2±1,5	22,5±2,0	23,6±1,6	26,2±2,4
TG (mg/dL)	110,4±6,7	117,7±6,4	119,9±7,7	112,8±10	117,9±8,4	129,4±11
Glicemia (mg/dL)	88,8±0,9	91,0±1,0	92,1±0,9	94,6±1,8#	94,6±2,6	95,9±2,0
Creatinina (mg/dL)	0,85±0,02	0,83±0,02	0,88±0,02*	0,83±0,03	0,83±0,03	0,95±0,03*

PI = Período Inicial; PINT = Período intermediário; PF = Período Final; CT = Colesterol Total; LDL-C = lipoproteína de baixa densidade; HDL-C = lipoproteína de alta densidade; VLDL = lipoproteína de densidade muito baixa; TG = triglicerídeos. Os dados estão expressos em média ± EPM; * = $p < 0,05$ em relação ao PI e PINT.

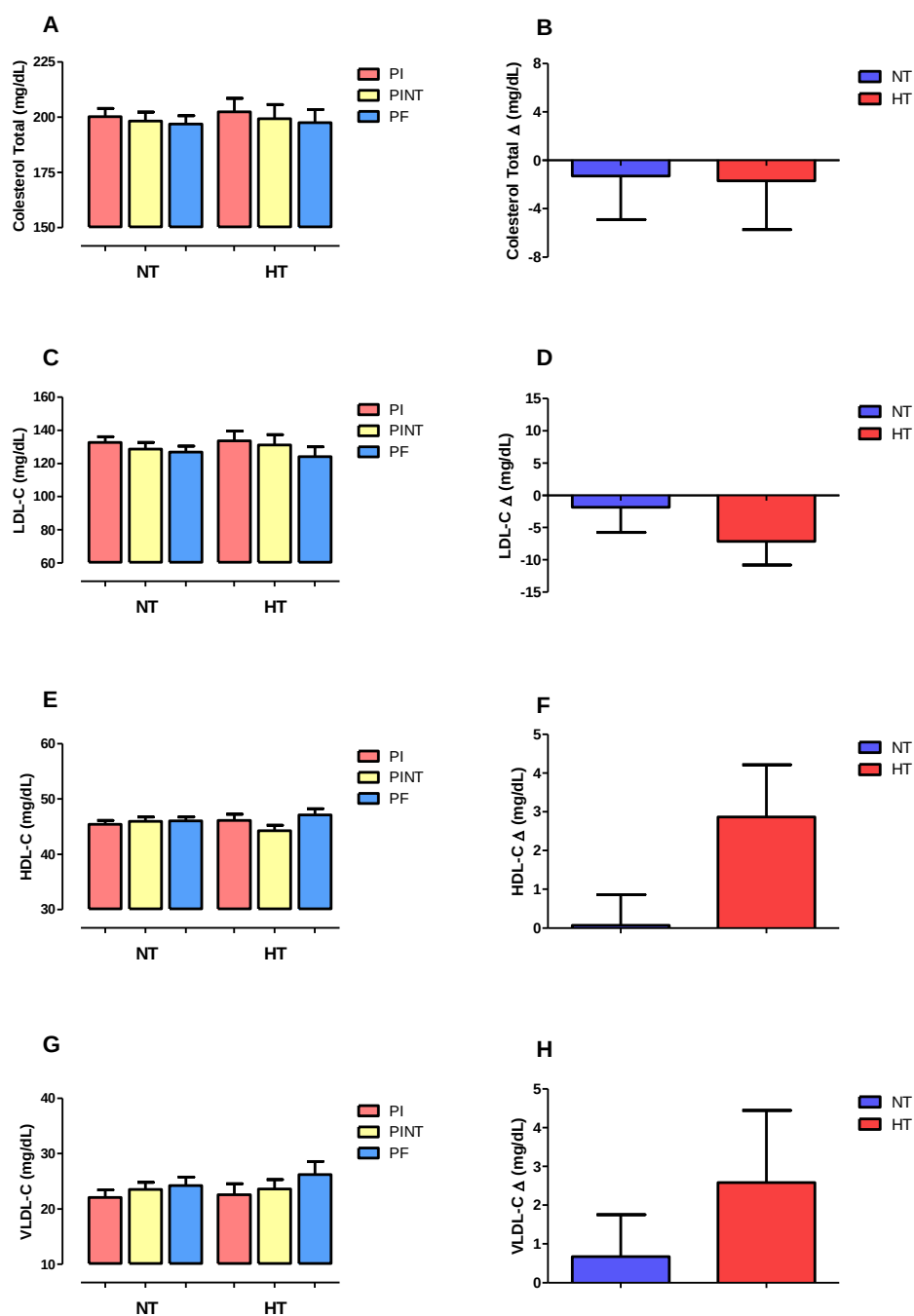


Figura 15. Efeito de 24 sessões de TFA sobre o perfil lipídico (**A.** Colesterol Total; **B.** Delta Colesterol Total; **C.** LDL-C; **D.** Delta LDL-C; **E.** HDL-C; **F.** Delta HDL-C; **G.** VLDL-C; **H.** Delta VLDL-C), entre os períodos Inicial (PI), intermediário (PINT) e final (PF) para os grupos de voluntários normotensos ($n=55$) e hipertensos ($n=31$).

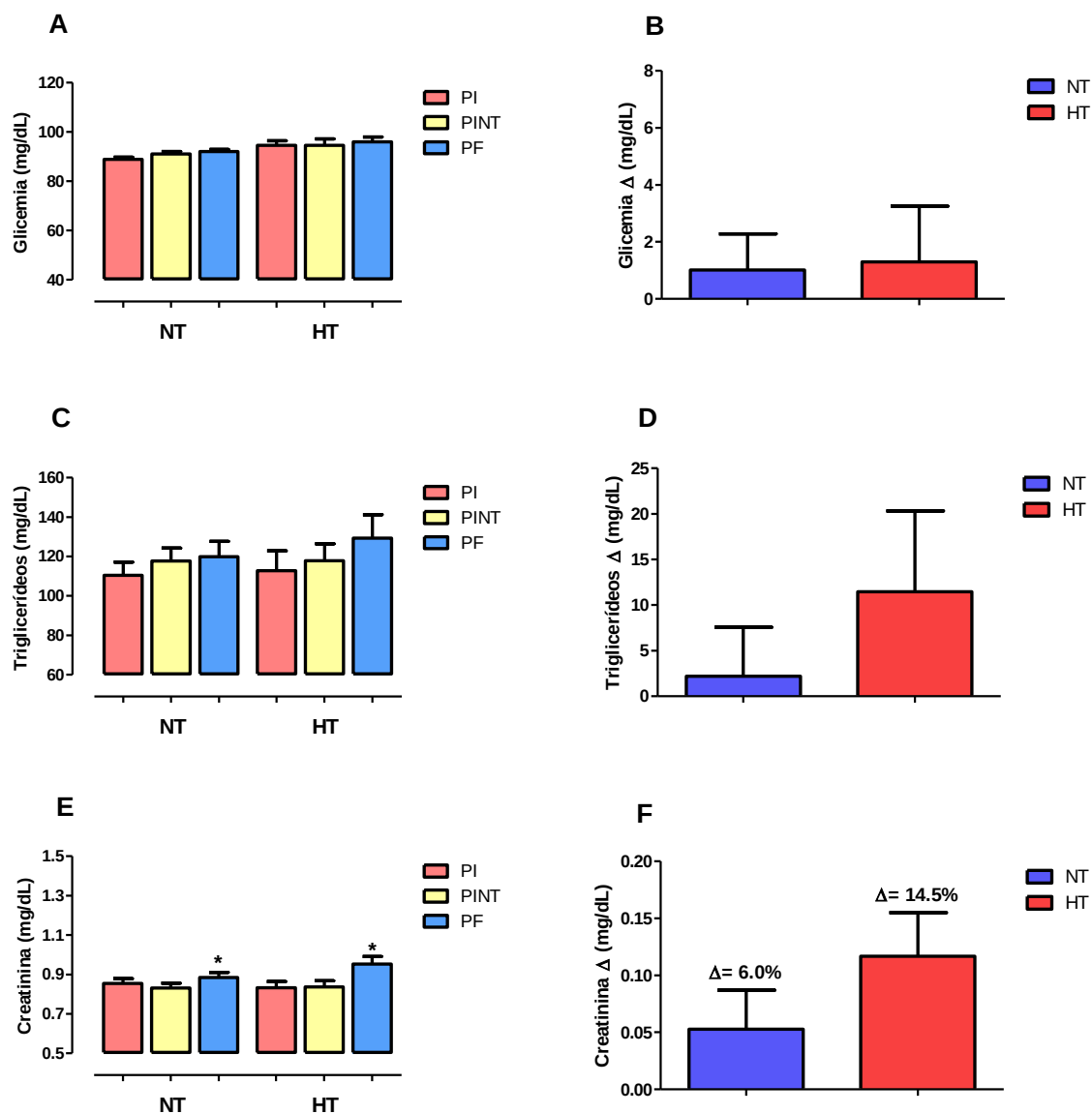


Figura 16. Efeito de 24 sessões de TFA sobre **A.** glicemia; **B.** Delta glicemia; **C.** Triglicerídeos; **D.** Delta Triglicerídeos; **E.** Creatinina; **F.** Delta creatinina, entre os períodos Inicial (PI), intermediário (PINT) e final (PF) em voluntários normotensos ($n=55$) e hipertensos ($n=31$). $*$ = $p < 0,05$ em relação ao PI e PINT.

Em relação à atividade das enzimas antioxidantes, observamos aumento significativo na atividade plasmática da SOD em resposta ao treinamento físico tanto para o grupo de voluntários NT (PINTxPF: 31,8%) quanto HT (PINTxPF: 65,1%), e essa elevação foi maior nos voluntários HT, $p < 0,05$. Além disso, observamos elevação da atividade plasmática da catalase em resposta ao treinamento físico para

o grupo de voluntários HT (PINTXPF: 24,1%), sem diferenças significativas para os NT.

Em relação às concentrações plasmáticas de NOx^- e MDA, não foram observadas diferenças significativas em resposta ao treinamento físico em ambos os grupos (Tabela 6 e Figura 17).

Tabela 6. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a atividade das enzimas antioxidantes (SOD e catalase), concentrações plasmáticas de NOx^- e MDA em voluntários normotensos e hipertensos.

	NT (n = 55)			HT (n =31)		
	PI	PINT	PF	PI	PINT	PF
NOx (μM)	23,6 $\pm$ 1,8	21,8 $\pm$ 1,7	23,1 $\pm$ 2,0	26,8 $\pm$ 2,3	22,8 $\pm$ 1,9	27,1 $\pm$ 2,9
SOD (U/ml)	17,9 $\pm$ 1,2	17,0 $\pm$ 1,3	22,4 $\pm$ 1,5*	19,0 $\pm$ 1,3	16,6 $\pm$ 1,7	27,4 $\pm$ 2,1*
Catalase (nmol/min/ml)	34,1 $\pm$ 1,7	34,3 $\pm$ 1,6	36,7 $\pm$ 2,0	37,3 $\pm$ 2,7	34,4 $\pm$ 2,3	42,7 $\pm$ 2,8*
MDA (μM)	7,9 $\pm$ 0,3	8,0 $\pm$ 0,3	7,5 $\pm$ 0,2	8,6 $\pm$ 0,4	8,3 $\pm$ 0,5	8,2 $\pm$ 0,3

PI = Período Inicial; PINT = Período intermediário; PF = Período Final; SOD = superóxido dismutase; Os dados estão expressos em média $\pm$ EPM; *= $p < 0,05$ em relação ao PI e PINT.

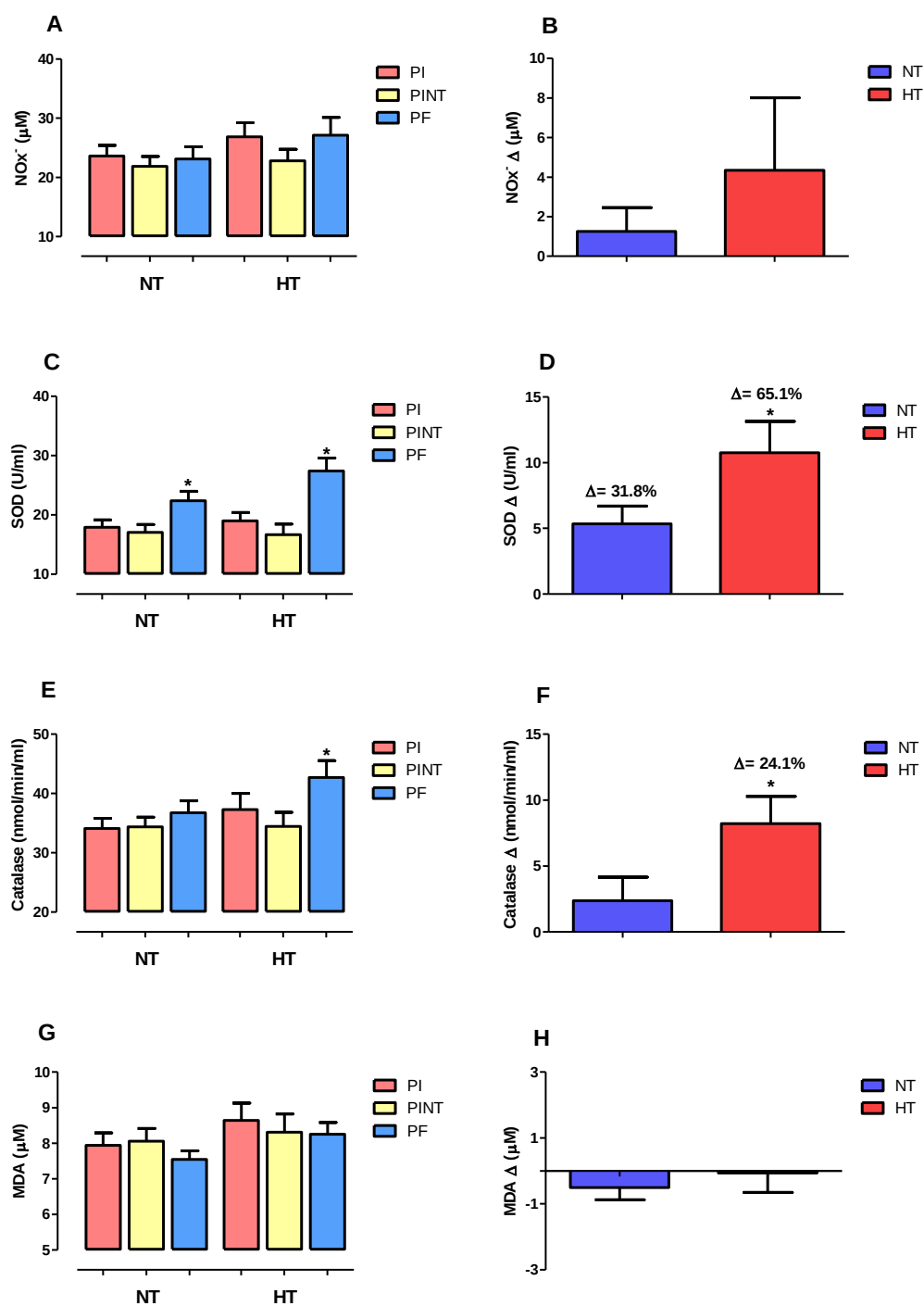


Figura 17. Efeito de 24 sessões de TFA sobre **A.** NOx⁻; **B.** Delta NOx⁻; **C.** SOD; **D.** Delta SOD; **E.** Catalase; **F.** Delta Catalase; **G.** MDA; **H.** Delta MDA, entre os períodos Inicial (PI), intermediário (PINT) e final (PF) em voluntários normotensos ($n=55$) e hipertensos ($n=31$). * = $p < 0,05$ em relação ao PI e PINT.

3.2 Sumário dos Resultados: PARTE 1

	NT PI x PINT x PF	HT PI x PINT x PF	NT x HT
<i>Idade</i>	-	-	ns
<i>Antropométricos</i>	-	-	-
IMC	ns	ns	ns
CA	↓	ns	*
<i>Cardiovascular</i>	-	-	-
<i>FC repouso</i>	↓	ns	ns
<i>FC exercício</i>	↓	↓	ns
VO ₂ max	↑	↑	ns
PAS - Auscultatório	↓	↓	*
PAD - Auscultatório	↓	↓	*
PAS – MAPA (vigília)	ns	ns	*
PAS – MAPA (sono)	↓	ns	*
PAS – MAPA (24h)	↓	ns	*
PAD –MAPA (vigília)	ns	ns	*
PAD - MAPA (sono)	ns	ns	*
PAD – MAPA (24h)	ns	ns	*
<i>Bioquímica</i>	-	-	-
CT	ns	ns	ns
HDL-C	ns	ns	ns
LDL-C	ns	ns	ns

VLDL-C	ns	ns	ns
TG	ns	ns	ns
Glicemia	ns	ns	ns
Creatinina	↑	↑	ns
NOx ⁻	ns	ns	ns
SOD	↑	↑	ns
Catalase	ns	↑	ns
MDA	ns	ns	ns

ns = Diferença estatisticamente não significativa; * = Diferença estatisticamente significativa

3.3 PARTE 2

GENÓTIPOS PARA AS TRÊS POSIÇÕES: -786T>C, 894G>T e Íntron 4b/a do gene NOS3.

A partir dos dados gerais, passamos a analisar os voluntários com relação ao genótipo para o gene NOS3, de maneira duplo-cega.

Os 86 voluntários (55 NT e 31 HT) que finalizaram o estudo tiveram suas amostras de DNA sequenciadas para a determinação dos polimorfismos para as posições -786T>C, 894G>T e Íntron 4b/a do gene NOS3. Devido à baixa frequência de alguns genótipos homozigotos e polimórficos (-786CC e Íntron 4 aa), os resultados da análise genotípica serão apresentados associando o grupo de voluntários normotensos e hipertensos, assim como os heterozigotos + homozigotos polimórficos. Os dados referentes à frequência genotípica encontram-se de acordo com o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. A Tabela 7 apresenta os dados da frequência genotípica e alélica para as três posições polimórficas (-786T>C, 894G>T e Íntron 4 b/a) analisadas do gene NOS3.

Conforme já informado, os grupos de voluntários normotensos e hipertensos foram associados para as análises genotípicas e haplotípicas. Não foram observadas diferenças na constituição (normotensos e hipertensos), assim como da terapia medicamentosa anti-hipertensiva (dados não apresentados) de cada um dos grupos genotípicos. A figura 18 apresenta esses dados.

Tabela 7. Frequência (f) alélica e genotípica para as posições -786T>C, 894G>T e Íntron 4 b/a do gene NOS3 para o total de voluntários (n=86).

Genótipos			
T-786C	T,T	T,C	C,C
f (%)	0.36 (36.1)	0.52 (52.3)	0.11 (11.6)
G894T	G,G	G,T	T,T
f (%)	0.59 (59.3)	0.25 (25.6)	0.15 (15.1)
Intron 4b/a	b,b	a,b	a,a
f (%)	0.68 (68.6)	0.26 (26.7)	0.04 (4.7)
Alelos			
T-786C	T	C	
f(%)	0.62 (62.2)	0.37 (37.8)	
G894T	G	T	
f(%)	0.72 (72.0)	0.28 (28.0)	
Intron 4b/a	b	a	
f(%)	0.82 (82.0)	0.18 (18.0)	

Frequência alélica e genotípica para as posições -786T>C (genótipos: TT, TC e CC; alelos T e C), 894G>T (genótipos: GG, GT e TT; alelos G e T) e Íntron 4b/a (genótipos: bb, ba e aa; alelos b e a) do gene da síntase do óxido nítrico endotelial (NOS3).

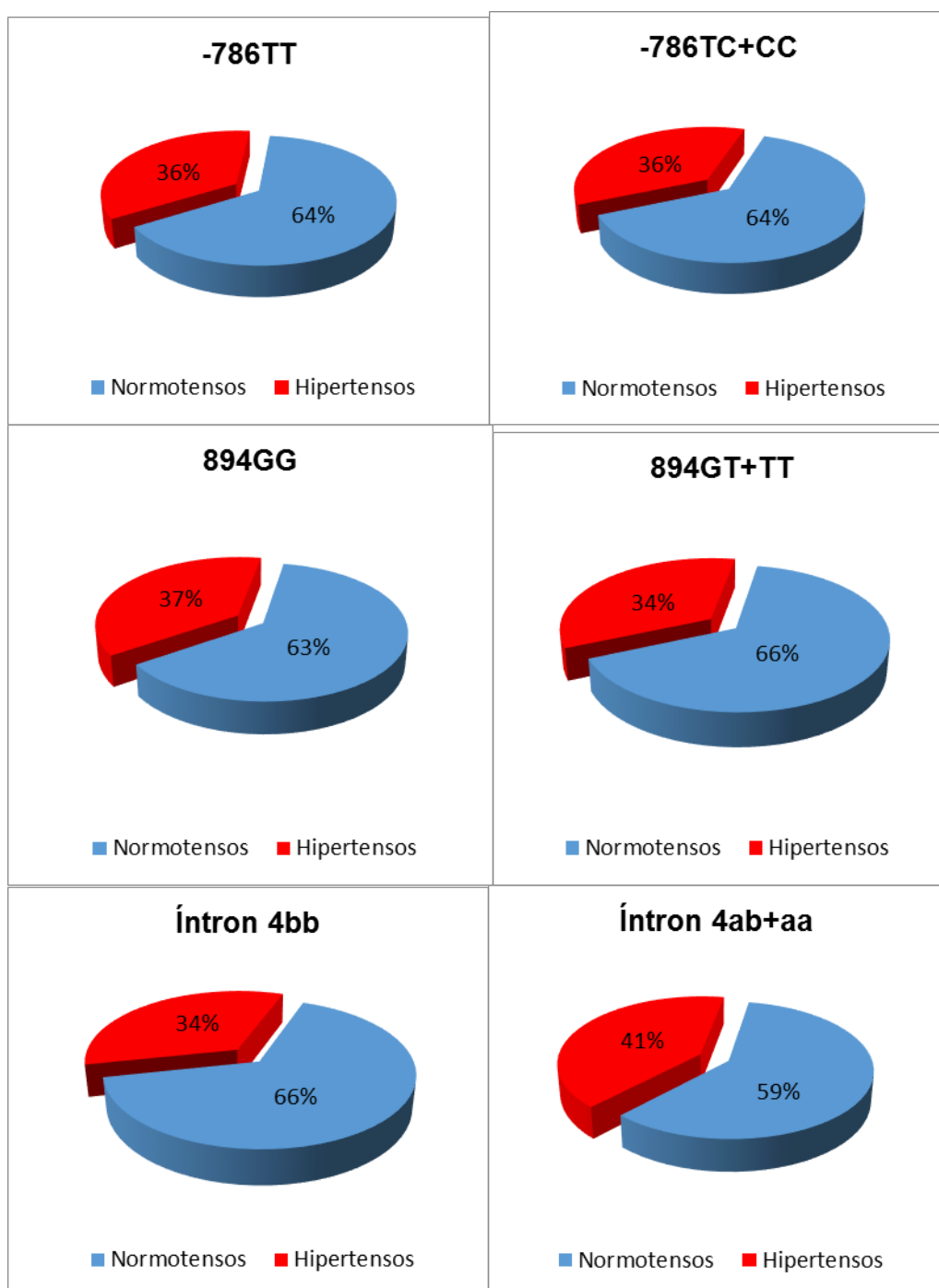


Figura 18. Constituição percentual de voluntários normotensos e hipertensos relativa ao total de voluntários para cada grupo genotípico.

Antropometria

Na análise do índice de massa corporal, não foram observadas diferenças significativas em resposta ao treinamento físico tanto para os grupos não polimórficos quanto para os polimórficos, em relação às três posições analisadas, entre os períodos do estudo. Quanto à circunferência abdominal, foi observada redução dos seus valores em resposta ao treinamento físico para os grupos não polimórficos -786TT (PINTxPF: -1,1%), 894GG (PINTxPF: -1,2%) e Íntron 4bb (PINTxPF: -1,3%). Já para os grupos polimórficos, foram observadas diferenças significativas em resposta ao treinamento físico apenas para o grupo -786TC+CC (PINTxPF: -1,2%) (Tabela 8 e Figura 19). Esses dados mostram que a redução da circunferência abdominal ocorreu independente do genótipo para a posição -786T>C, enquanto que os indivíduos polimórficos para as posições 894G>T e Íntron 4 b/a tiveram atenuada resposta de redução da CA frente ao programa de TFA.

Tabela 8. Efeito de 24 sessões de TFA sobre o índice de massa corporal e circunferência abdominal, divididos pela presença ou ausência de polimorfismos para as posições -786T>C, 894G>T e Íntron 4b/a do gene NOS3 em voluntários adultos.

Parâmetros	TT (n=31)			TC+CC (n=55)		
-786T>C	PI	PINT	PF	PI	PINT	PF
Idade (anos)	49,7±0,9	-	-	51,4±0,8	-	-
IMC (kg/m ²)	27,1±0,5	26,9±0,4	26,6±0,5	26,5±0,3	26,6±0,3	26,5±0,3
CA (cm)	86,3±1,6	85,5±1,4	84,6±1,5*	84,6±1,2	84,4±1,3	83,4±1,2*
	GG (n=51)			GT+TT (n=35)		
894G>T	PI	PINT	PF	PI	PINT	PF
Idade (anos)	50,2±0,7	-	-	51,7±1,0	-	-
IMC (kg/m ²)	27,3±0,3	27,2±0,3	27,0±0,3	25,9±0,4	26,0±0,4	25,9±0,4
CA (cm)	86,4±1,2	85,8±1,2	84,8±1,1*	83,4±1,5 [#]	83,3±1,6	82,4±1,6
	bb (n=59)			ab+aa (n=27)		
Íntron 4 b/a	PI	PINT	PF	PI	PINT	PF
Idade (anos)	51,1±0,7	-	-	50,2±1,2	-	-
IMC (kg/m ²)	26,5±0,3	26,5±0,3	26,3±0,3	27,1±0,4	27,1±0,4	27,1±0,5
CA (cm)	85,1±1,2	84,7±1,2	83,6±1,2*	85,5±1,6	84,9±1,6	84,2±1,5

PI = Período Inicial; PINT = Período intermediário; PF = Período Final; IMC = Índice de Massa Corporal; CA = Circunferência Abdominal; -786TT, 894GG e Íntron 4bb (grupos não polimórficos); -

786TC+CC; 894GT+TT e Íntron 4ab+aa (grupos polimórficos). Os dados estão expressos em média $\pm$ EPM. *= $p < 0,05$ em relação ao PI e PINT.

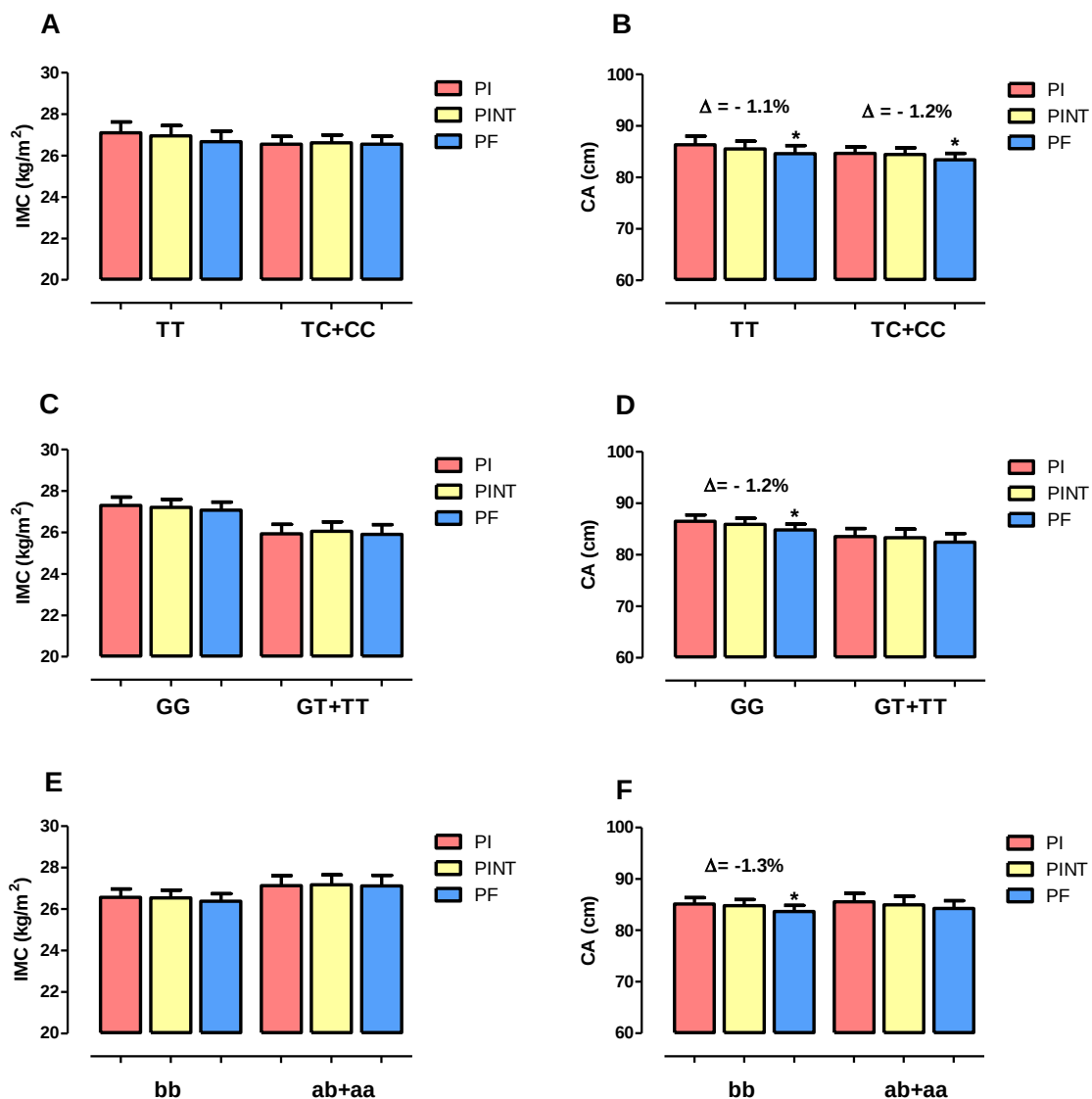


Figura 19. Efeito de 24 sessões de TFA sobre **A.** IMC -786T>C; **B.** CA -786T>C; **C.** IMC 894G>T; **D.** CA 894G>T; **E.** IMC Íntron 4b/a; **F.** CA Íntron 4b/a divididos pelas posições polimórficas -786T>C, 894G>T e Íntron 4b/a do gene NOS3 em voluntários adultos. *= $p < 0,05$ em relação ao PI e PINT.

Cardiovascular

Na análise da frequência cardíaca de repouso, observamos que para ambos os grupos polimórficos (-786TC+CC e Íntron 4ab+aa) houve redução da frequência cardíaca de repouso em resposta ao treinamento físico, (PINTxPF: 3,3%) e (PINTxPF: 6,0%), respectivamente, mostrando que indivíduos polimórficos para essas duas posições respondem melhor ao treinamento físico comparado aos seus congêneres não polimórficos (Tabela 9 e Figuras 20 e 22, painéis A e B). Por outro lado, para a posição 894 do gene NOS3, os indivíduos não polimórficos responderam melhor ao TFA quando comparados àqueles polimórficos para essa posição, apresentando os mesmos redução de FC de repouso após 24 sessões de treinamento físico, (PINTxPF: - 5,4%), (Tabela 9 e Figura, 21, painéis A e B).

No entanto, quando aplicamos um estímulo, sessão aguda de exercício físico aeróbio nos indivíduos treinados, observamos redução da FC durante o exercício em todos os grupos, ou seja, independente do genótipo analisado (-786TT: PINTxPF: - 9,0% e 786TC+CC: PINTxPF: - 7,8%), (894GG: PINTxPF: - 8,5% e -894GT+TT: PINTxPF: - 7,9%) e (Íntron 4bb: PINTxPF: - 7,7% e Íntron 4ab+aa: PINTxPF: - 9,5%). Assim, nossos resultados mostram claramente que o genótipo não interfere na resposta da frequência cardíaca em indivíduos treinados submetidos a uma sessão aguda de exercício físico aeróbio, mostrando que a função autonômica não é influenciada por variações no gene da NOS3. (Tabela 9 e Figuras 20, 21 e 22).

Tabela 9. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a frequência cardíaca, para as posições polimórficas -786T>C, 894G>T e Íntron 4b/a em voluntários adultos.

Parâmetros	TT (n=31)			TC+CC (n=55)		
-786T>C	PI	PINT	PF	PI	PINT	PF
FC repouso (bpm)	-	74,3±1,6	71,3±1,8	-	76,7±1,4	74,2±1,6*
FC exercício (bpm)	-	148,1±2,3	134,8±2,3*	-	149,2±2,0	137,5±1,9*
	GG (n=51)			GT+TT (n=35)		
894G>T	PI	PINT	PF	PI	PINT	PF
FC repouso (bpm)	-	74,7±1,3	70,7±1,4*	-	77,7±1,7	77,0±1,0 [#]
FC exercício (bpm)	-	148,4±1,9	135,9±1,8*	-	149,4±2,5	137,5±2,4*
	bb (n=59)			ab+aa (n=27)		
Íntron 4 b/a	PI	PINT	PF	PI	PINT	PF
FC repouso (bpm)	-	76,1±1,2	74,3±1,4	-	75,4±2,0	70,9±2,2*
FC exercício (bpm)	-	147,8±1,8	136,5±1,7*	-	150,8±2,8	136,6±2,7*

PI = Período Inicial; PINT = Período intermediário; PF = Período Final; FC = frequência cardíaca; - 786TT, 894GG e Íntron 4bb (grupos não polimórficos); -786TC+CC; 894GT+TT e Íntron 4ab+aa (grupos polimórficos). Os dados estão expressos em média ± EPM. *= p<0,05 em relação ao PI e PINT; # = p<0,05 em relação ao mesmo período do grupo NT.

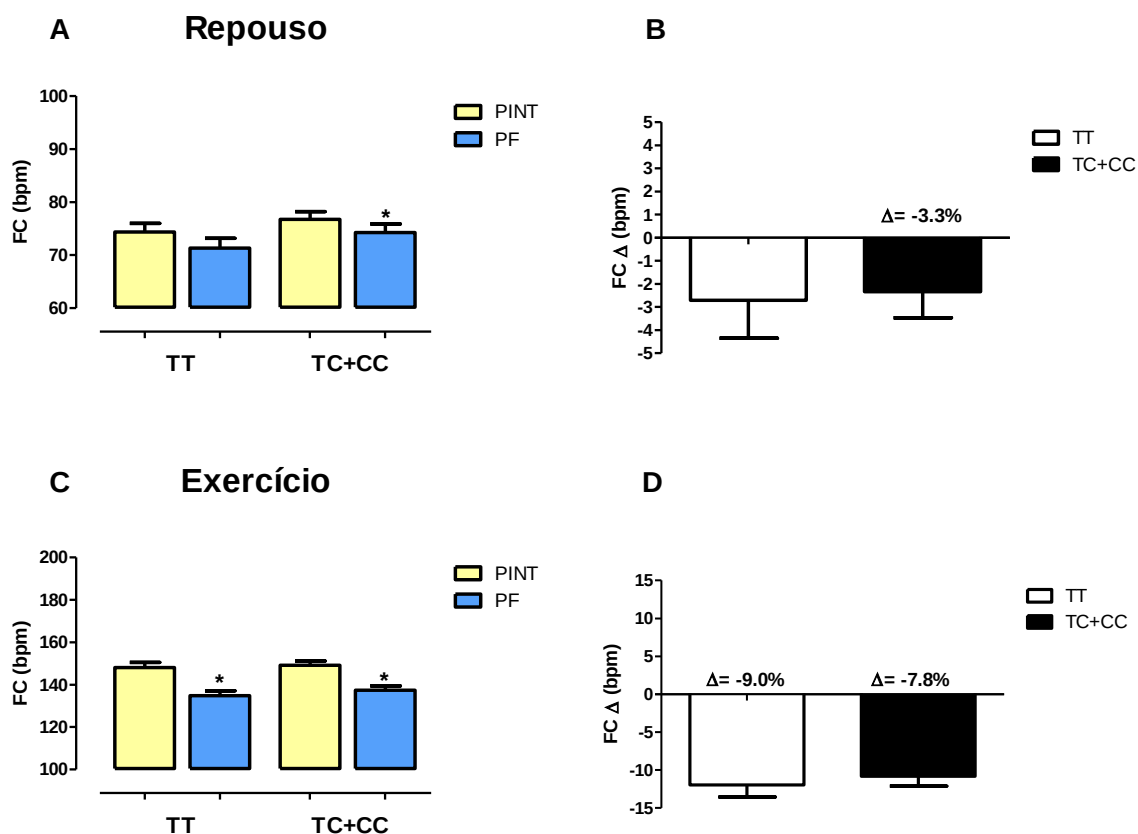


Figura 20. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a frequência cardíaca (**A.** FC de repouso; **B.** Delta FC de repouso; **C.** FC de exercício; **D.** Delta FC de exercício), para a posição -786T>C, entre os períodos inicial (PI), intermediário (PINT) e final (PF) em voluntários adultos. *= $p < 0,05$ em relação ao PI e PINT.

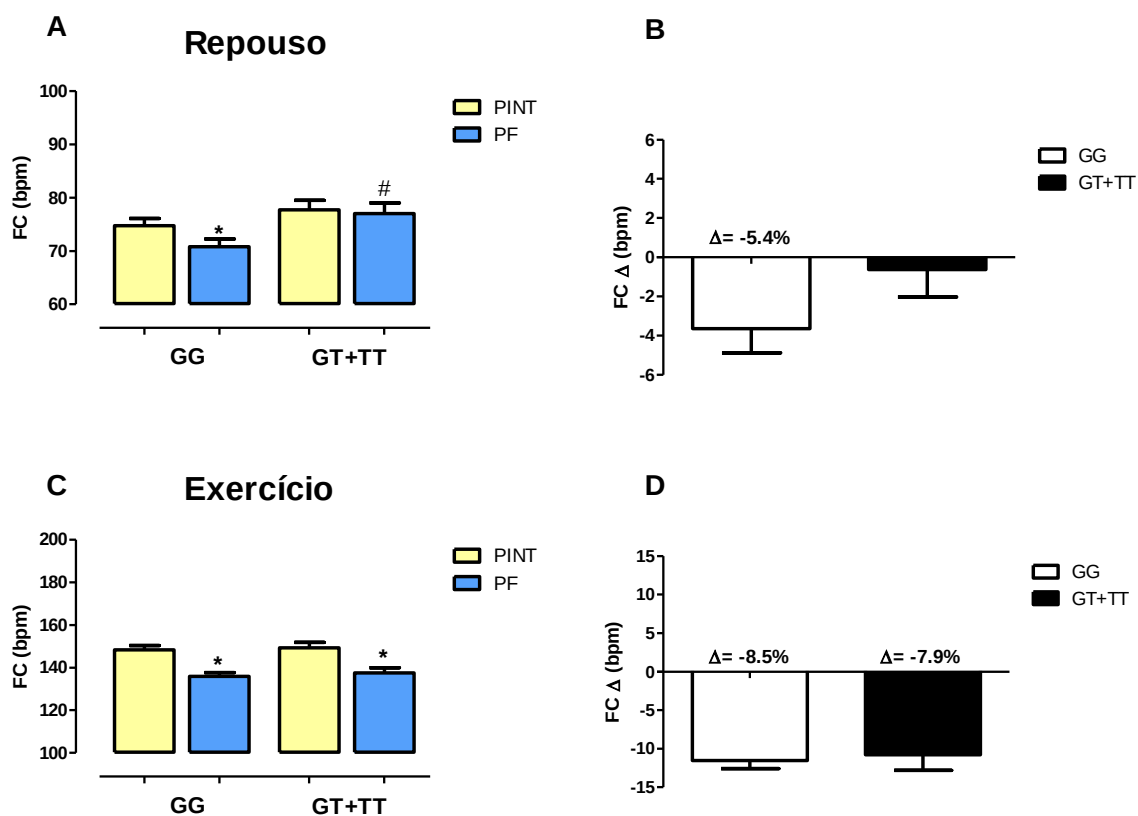


Figura 21. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a frequência cardíaca (**A.** FC de repouso; **B.** Delta FC de repouso; **C.** FC de exercício; **D.** Delta FC de exercício), para a posição 894G>T, entre os períodos inicial (PI), intermediário (PINT) e final (PF). *= $p < 0,05$ em relação ao PI e PINT; # = $p < 0,05$ em relação ao mesmo período do grupo NT.

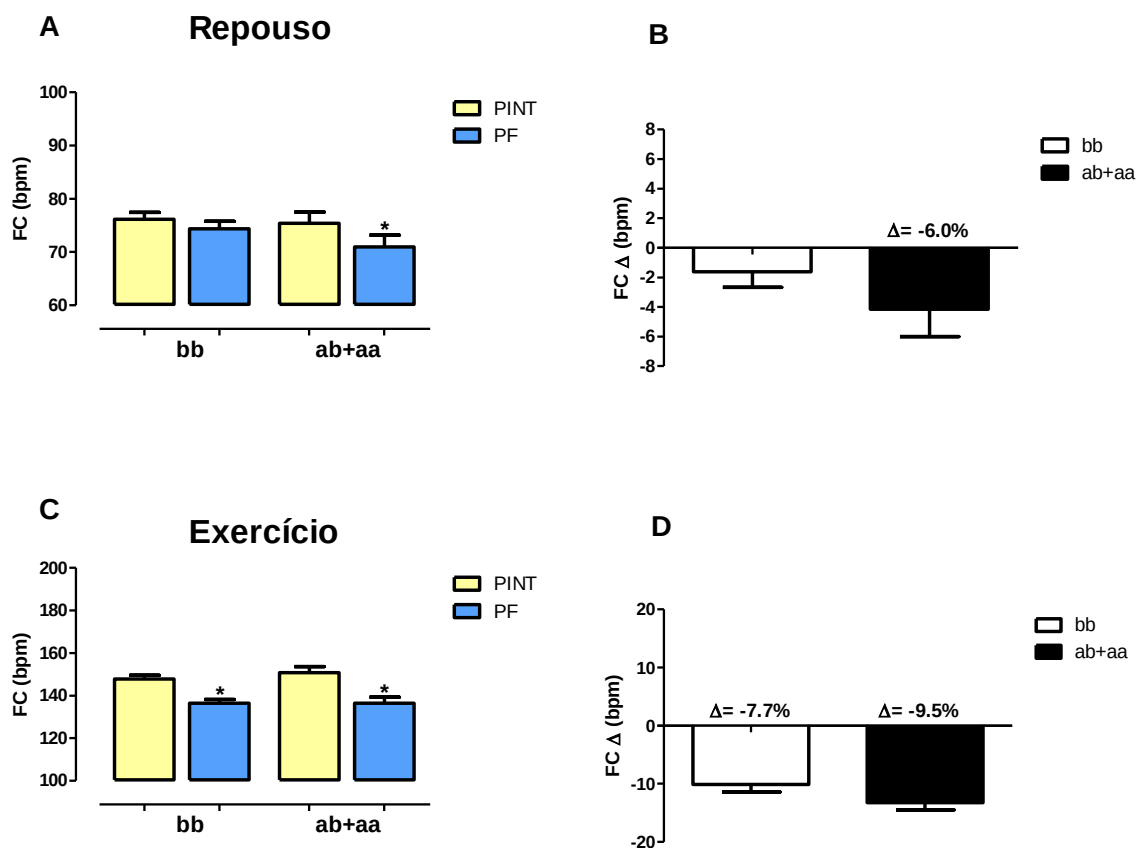


Figura 22. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a frequência cardíaca (A. FC de repouso; B. Delta FC de repouso; C. FC de exercício; D. Delta FC de exercício), entre os períodos inicial (PI), intermediário (PINT) e final (PF) para o grupo Íntron 4b/a de voluntários normotensos + hipertensos. *= $p < 0,05$ em relação ao PI e PINT.

Em relação à pressão arterial, em nosso estudo avaliamos os efeitos do treinamento físico através de 2 métodos, clássico, mensurada através do método auscultatório e pelo método ambulatorial por 24 horas através do MAPA.

Para o método tradicional, auscultatório, observamos que para o Íntron 4 do gene NOS3, os indivíduos não polimórficos apresentaram redução significativa da pressão arterial sistólica e diastólica em resposta ao treinamento físico por 24 sessões, aproximadamente 4,0 e 3,9 %, enquanto que os indivíduos com polimorfismo para essa posição, não apresentaram qualquer alteração dos valores de PA (Tabela 10 e Figuras 23 e 24).

Para as posições -786 e 894 do gene NOS3, a presença ou não do polimorfismo para essas posições não afetou os efeitos benéficos do treinamento físico, ou seja, observamos redução significativa dos valores de pressão arterial

sistólica (-786TT: -5,2% e -786TC+CC: -2,7%) e (894GG: -4,2% e 894 GT+TT: -3,0%) e da pressão arterial diastólica (-786TT: -4,3% e [-786TC+CC: -3,0%) e (894GG: -2,8% e 894 GT+TT: -4,4%), em todos os grupos analisados, independente do genótipo. (Tabela 10 e Figuras 23 e 24).

Tabela 10. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a pressão arterial (mensurada através do método auscultatório) para a presença ou ausência dos polimorfismos para as posições -786T>C, 894G>T e Íntron 4b/a do gene NOS3, entre os períodos inicial (PI), intermediário (PINT) e final (PF) em voluntários adultos.

Parâmetros	TT (n=31)			TC+CC (n=55)		
	PI	PINT	PF	PI	PINT	PF
-786T>C						
PAS ausc (mmHg)	117,5±2,5	116,0±2,6	111,2±2,0*	116,4±2,1	116,4±1,8	113,2±1,8*
PAD ausc (mmHg)	76,1±1,5	75,9±1,8	72,8±1,4*	77,1±1,2	76,8±1,2	74,8±1,1*
	GG (n=51)			GT+TT (n=35)		
894G>T						
PAS ausc (mmHg)	118,0±2,2	117,2±2,1	113,1±1,8*	115,0±2,4	114,8±2,1	111,6±1,9*
PAD ausc (mmHg)	76,2±1,1	76,6±1,3	74,1±1,1*	77,4±1,6	76,3±1,4	74,0±1,3*
	bb (n=59)			ab+aa (n=27)		
Íntron 4 b/a						
PAS ausc (mmHg)	116,8±1,8	116,6±1,7	112,1±1,5*	116,8±3,3	115,4±2,8	113,3±2,7
PAD ausc (mmHg)	76,8±1,1	76,4±1,2	73,8±1,0*	76,6±1,6	76,6±1,7	74,7±1,5

PI = Período Inicial; PINT = Período intermediário; PF = Período Final; PAS = Pressão Arterial Sistólica; PAD = Pressão Arterial Diastólica; -786TT, 894GG e Íntron 4bb (grupos não polimórficos); -786TC+CC; 894GT+TT e Íntron 4ab+aa (grupos polimórficos). Os dados estão expressos em média ± EPM. *= p<0,05 em relação ao PI e PINT.

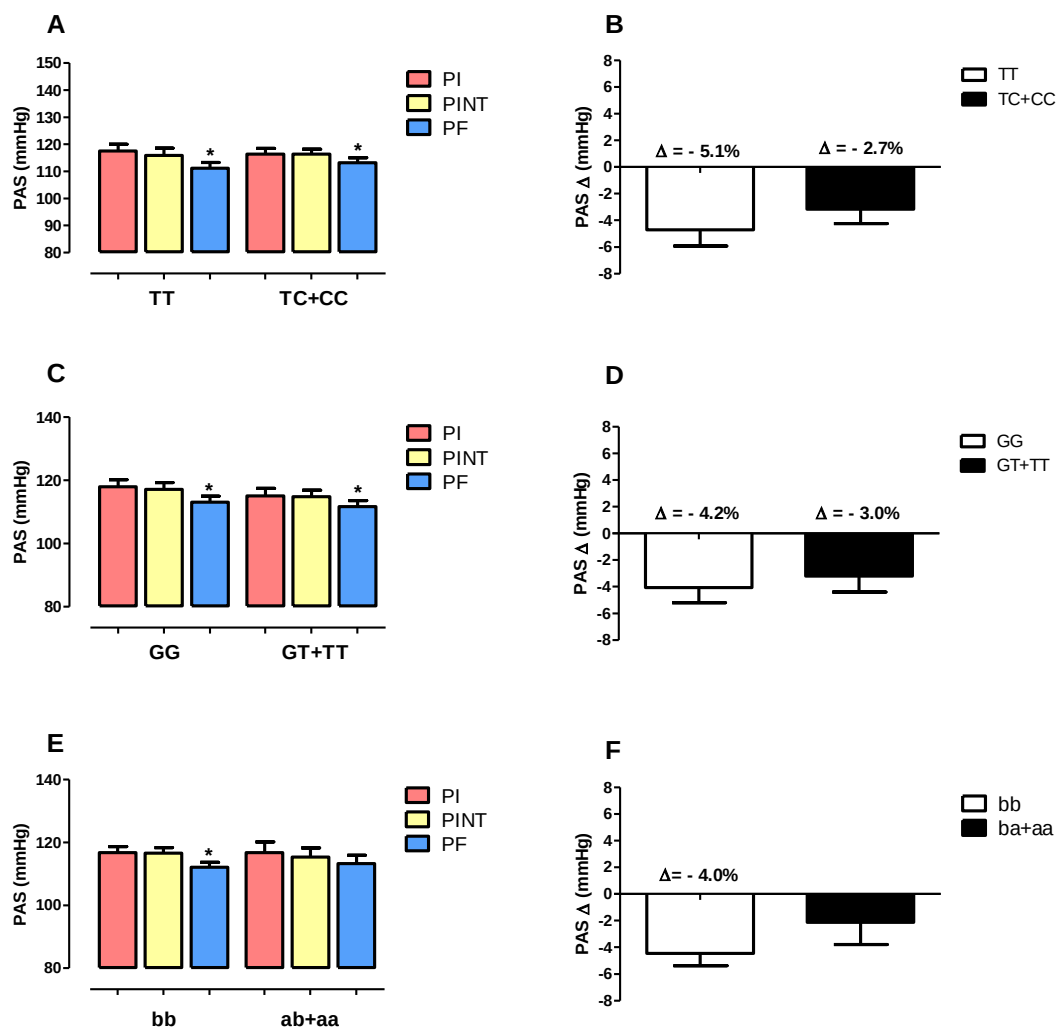


Figura 23. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a pressão arterial (**A.** PAS -786T>C; **B.** Delta PAS -786T>C; **C.** PAS 894G>T; **D.** Delta PAS 894G>T; **E.** PAS. Íntron 4b/a; **F.** Delta PAS Íntron 4b/a), mensurada através do método auscultatório, entre os períodos inicial (PI), intermediário (PINT) e final (PF) em voluntários adultos. *= p<0,05 em relação ao PI e PINT.

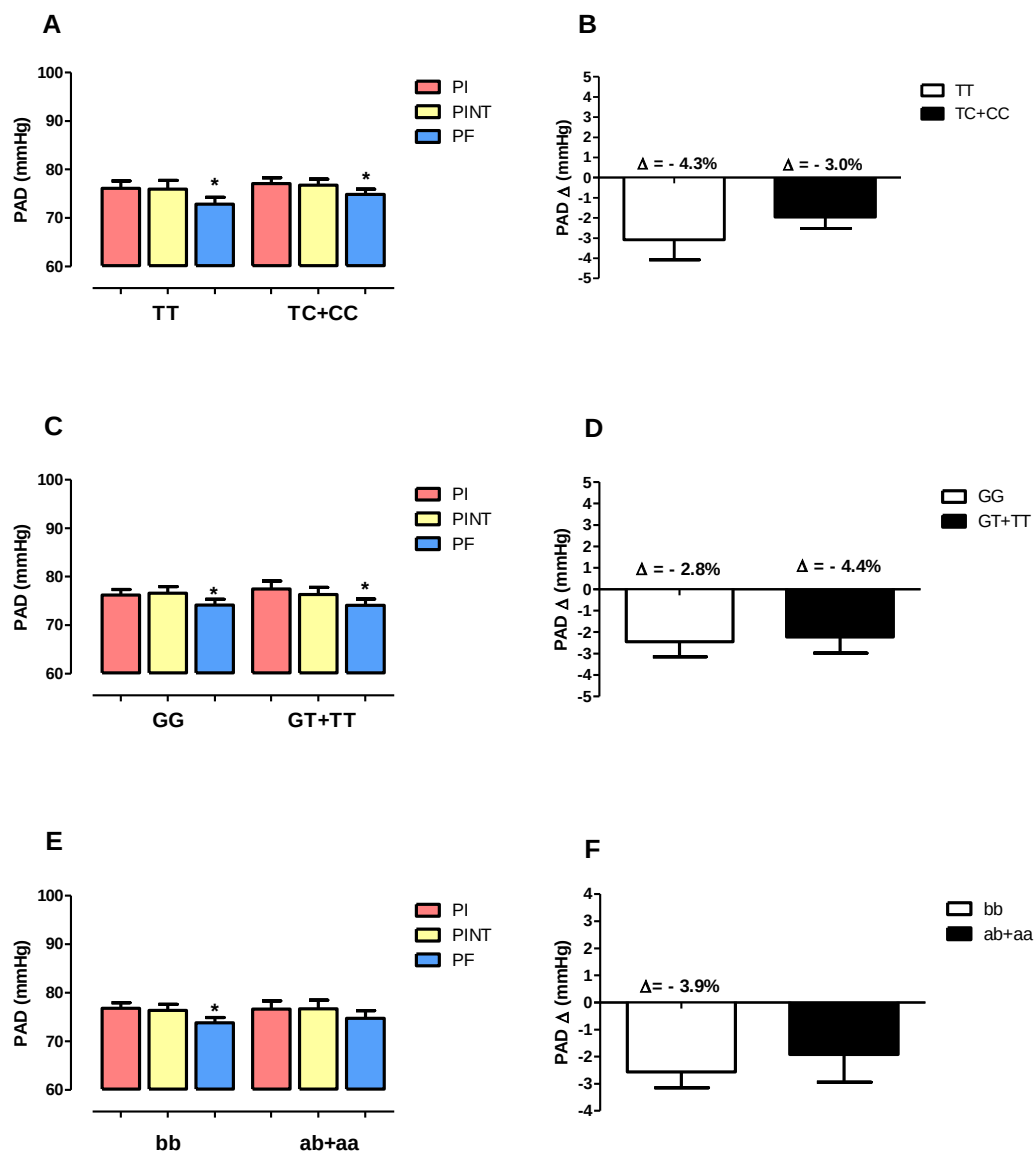


Figura 24. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a pressão arterial (**A.** PAD -786T>C; **B.** Delta PAD -786T>C; **C.** PAD 894G>T; **D.** Delta PAD 894G>T; **E.** PAD. Íntron 4b/a; **F.** Delta PAD Íntron 4b/a) mensurada através do método auscultatório, entre os períodos inicial (PI), intermediário (PINT) e final (PF) em voluntários adultos. *= p<0,05 em relação ao PI e PINT.

Medida através do MAPA de acordo com os genótipos

-786T>C

Foram observadas reduções significativas em resposta ao treinamento físico apenas para a PAD no momento de vigília (PINTxPF: -3,3%) em voluntários com polimorfismo entre os períodos do estudo (Tabela 11 e Figuras 25 e 26). O treinamento físico não alterou os valores de PAS em todos os momentos analisados tanto para indivíduos com ou sem polimorfismo do gene NOS3 para essa posição.

894G>T

Para essa posição encontramos resultados contraditórios na análise de MAPA. Os indivíduos com polimorfismo, grupo GT+TT apresentaram redução significativa da PAS e PAD durante a vigília em resposta ao treinamento físico (PINTxPF: -4,4% e (PINTxPF: -3,8%), respectivamente. Por outro lado, o grupo GG, sem polimorfismo, verificamos redução da PAS em resposta ao treinamento físico somente durante o sono (PINTxPF: -2,2%). Os dados estão sumarizados na Tabela 11 e ilustrados nas Figuras 27 e 28.

Íntron 4b/a.

Foram observadas reduções significativas para o grupo não polimórfico em resposta ao treinamento físico tanto para a PAS (PINTxPF: -3,0%) quanto para a PAD (PINTxPF: -3,2%) em relação ao momento de vigília, entre os períodos do estudo. Além disso, também foi verificada redução da PAS (PINTxPF: -2,8%) para a análise de 24h, entre os períodos do estudo (Tabela 11 e Figuras 29 e 30).

Em conjunto, esses dados mostram que a presença de polimorfismo na posição Íntron 4 para o gene da NOS3 afeta de maneira mais consistente os efeitos benéficos do exercício físico nessa população.

Tabela 11. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a pressão arterial por 24 horas (mensurada através do monitoramento ambulatorial da pressão arterial - MAPA) para as posições -786T>C, 894G>T e Íntron 4b/a do gene NOS3, entre os períodos inicial, intermediário e final em voluntários adultos.

Parâmetros	TT (n=31)			TC+CC (n=55)		
-786T>C (mmHg)	PI	PINT	PF	PI	PINT	PF
PAS MAPA Vigília	-	119,6±1,8	117,0±1,9	-	120,6±1,6	118,3±1,4
PAD MAPA Vigília	-	76,5±1,8	76,2±1,8	-	79,2±1,3	76,6±1,2*
PAS MAPA Sono	-	107,9±1,8	106,1±1,8	-	110,8±1,5	108,6±1,6
PAD MAPA Sono	-	66,9±1,7	66,9±1,7	-	70,3±1,2	69,2±1,2
PAS MAPA 24h	-	117,2±1,8	114,6±1,9	-	118,4±1,5	116,5±1,4
PAD MAPA 24h	-	74,6±1,8	74,2±1,8	-	77,2±1,3	75,5±1,1
	GG (n=51)			GT+TT (n=35)		
894G>T (mmHg)	PI	PINT	PF	PI	PINT	PF
PAS MAPA Vigília	-	120,0±1,5	119,2±1,4	-	120,7±2,0	115,4±1,9*
PAD MAPA Vigília	-	77,4±1,3	77,1±1,3	-	79,5±1,9	76,5±1,6*
PAS MAPA Sono	-	110,4±1,4	107,9±1,5*	-	108,7±1,8	107,2±2,0
PAD MAPA Sono	-	68,8±1,3	68,3±1,3	-	69,5±1,7	68,4±1,6
PAS MAPA 24h	-	118,0±1,4	116,6±1,4	-	117,8±2,0	113,9±1,8*
PAD MAPA 24h	-	75,8±1,3	75,6±1,3	-	77,0±1,8	74,1±1,5*
	bb (n=59)			ab+aa (n=27)		
Íntron 4 b/a (mmHg)	PI	PINT	PF	PI	PINT	PF
PAS MAPA Vigília	-	120,2±1,6	116,6±1,4*	-	120,3±1,6	120,2±1,9
PAD MAPA Vigília	-	78,5±1,4	76,0±1,3*	-	77,8±1,5	77,4±1,6
PAS MAPA Sono	-	108,9±1,5	106,6±1,4*	-	111,5±1,9	109,8±2,2
PAD MAPA Sono	-	69,0±1,3	68,0±1,3	-	69,2±1,6	69,0±1,7
PAS MAPA 24h	-	117,8±1,5	114,5±1,4	-	118,4±1,6	117,8±1,8
PAD MAPA 24h	-	76,4±1,4	74,7±1,2	-	76,0±1,5	75,8±1,5

PI = Período Inicial; PINT = Período intermediário; PF = Período Final; PAS = Pressão Arterial Sistólica; PAD = Pressão Arterial Diastólica; -786TT, 894GG e Íntron 4bb (grupos não polimórficos); -786TC+CC; 894GT+TT e Íntron 4ab+aa (grupos polimórficos). Os dados estão expressos em média ± EPM. *= p<0,05 em relação ao PI e PINT.

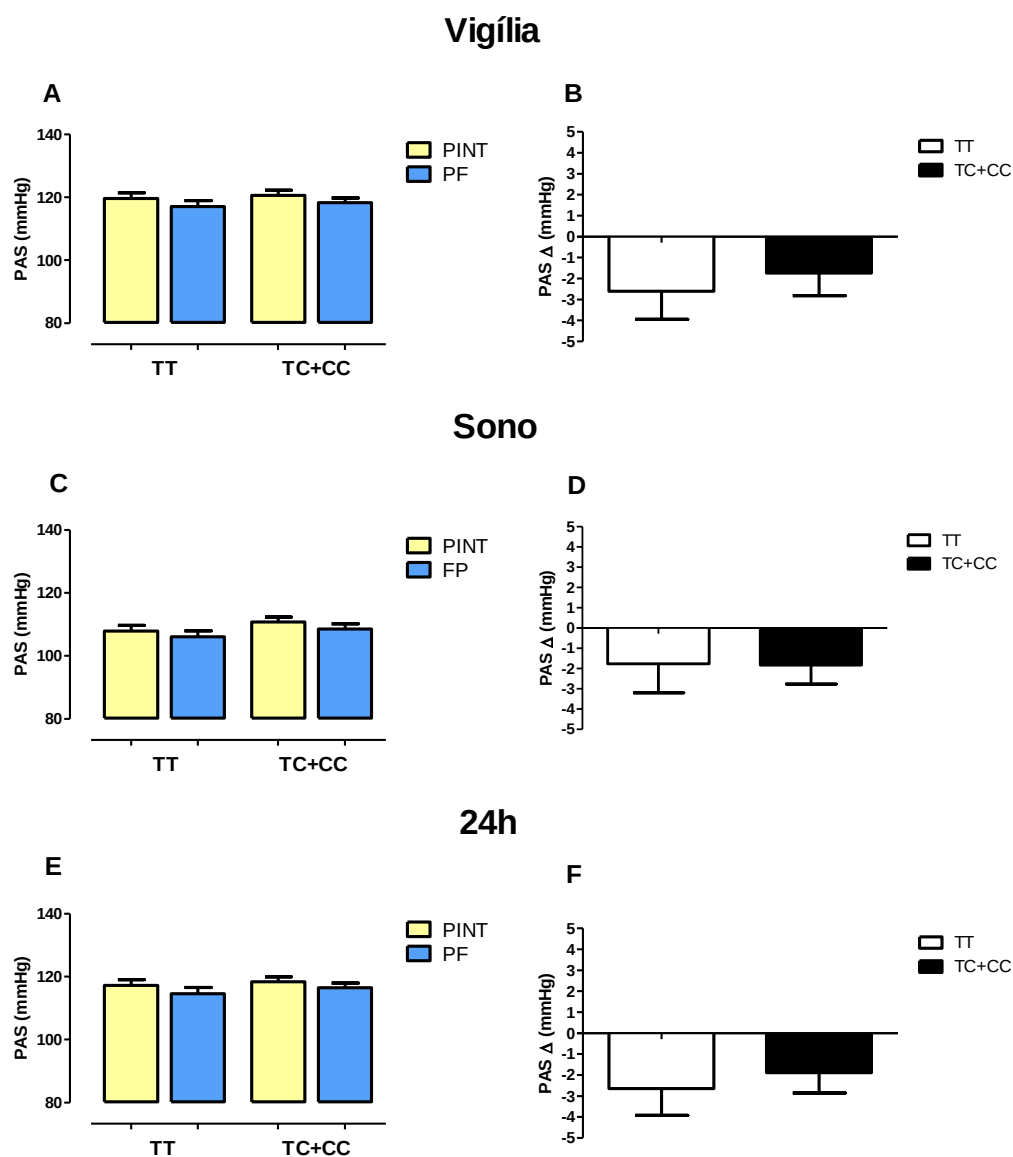


Figura 25. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a pressão arterial (**A.** PAS Vigília; **B.** Delta PAS Vigília; **C.** PAS Sono; **D.** Delta PAS Sono; **E.** PAS 24h; **F.** Delta PAS 24h), mensurada através do monitoramento ambulatorial da pressão arterial - MAPA, para a posição -786T>C, entre os períodos intermediário (PINT) e final (PF) em voluntários adultos

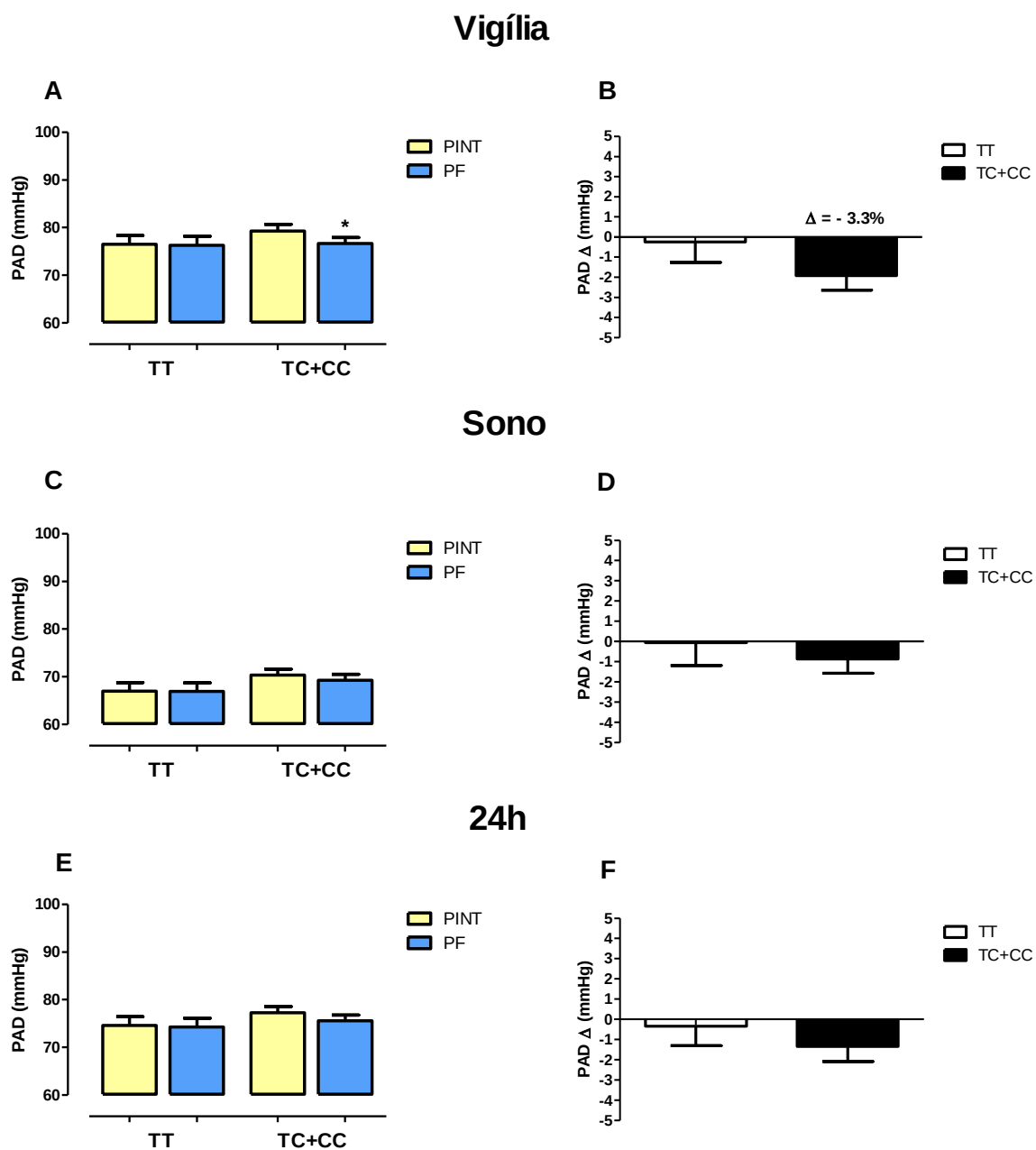


Figura 26. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a pressão arterial (**A.** PAD Vigília; **B.** Delta PAD Vigília; **C.** PAD Sono; **D.** Delta PAD Sono; **E.** PAD 24h; **F.** Delta PAD 24h), mensurada através do monitoramento ambulatorial da pressão arterial - MAPA, para a posição -786T>C, entre os períodos intermediário (PINT) e final (PF) em voluntários adultos. *= $p < 0,05$ em relação ao PINT.

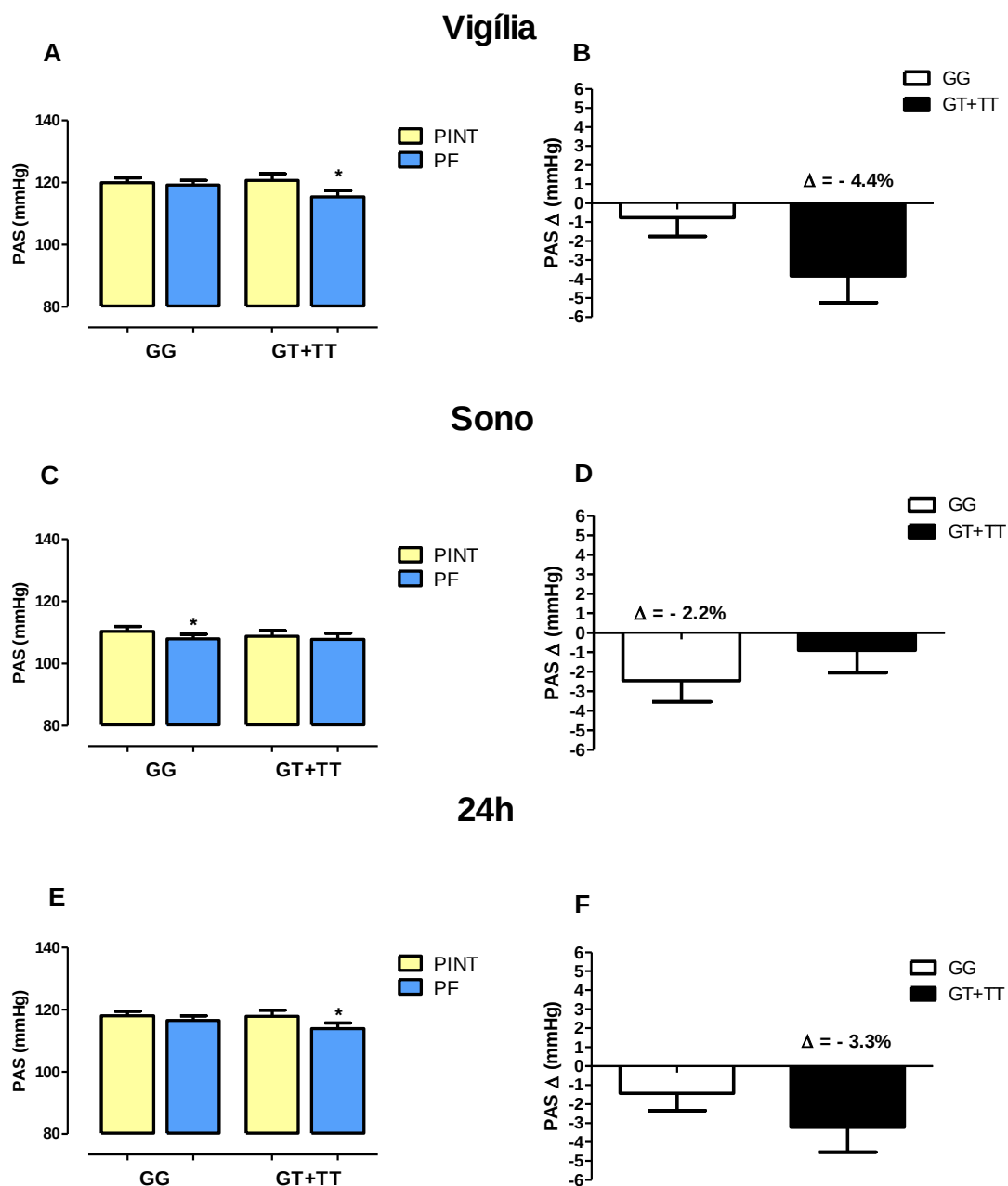


Figura 27. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a pressão arterial (**A.** PAS Vigília; **B.** Delta PAS Vigília; **C.** PAS Sono; **D.** Delta PAS Sono; **E.** PAS 24h; **F.** Delta PAS 24h), mensurada através do monitoramento ambulatorial da pressão arterial - MAPA, para a posição 894G>T, entre os períodos intermediário (PINT) e final (PF) em voluntários adultos. *= $p < 0,05$ em relação ao PINT.

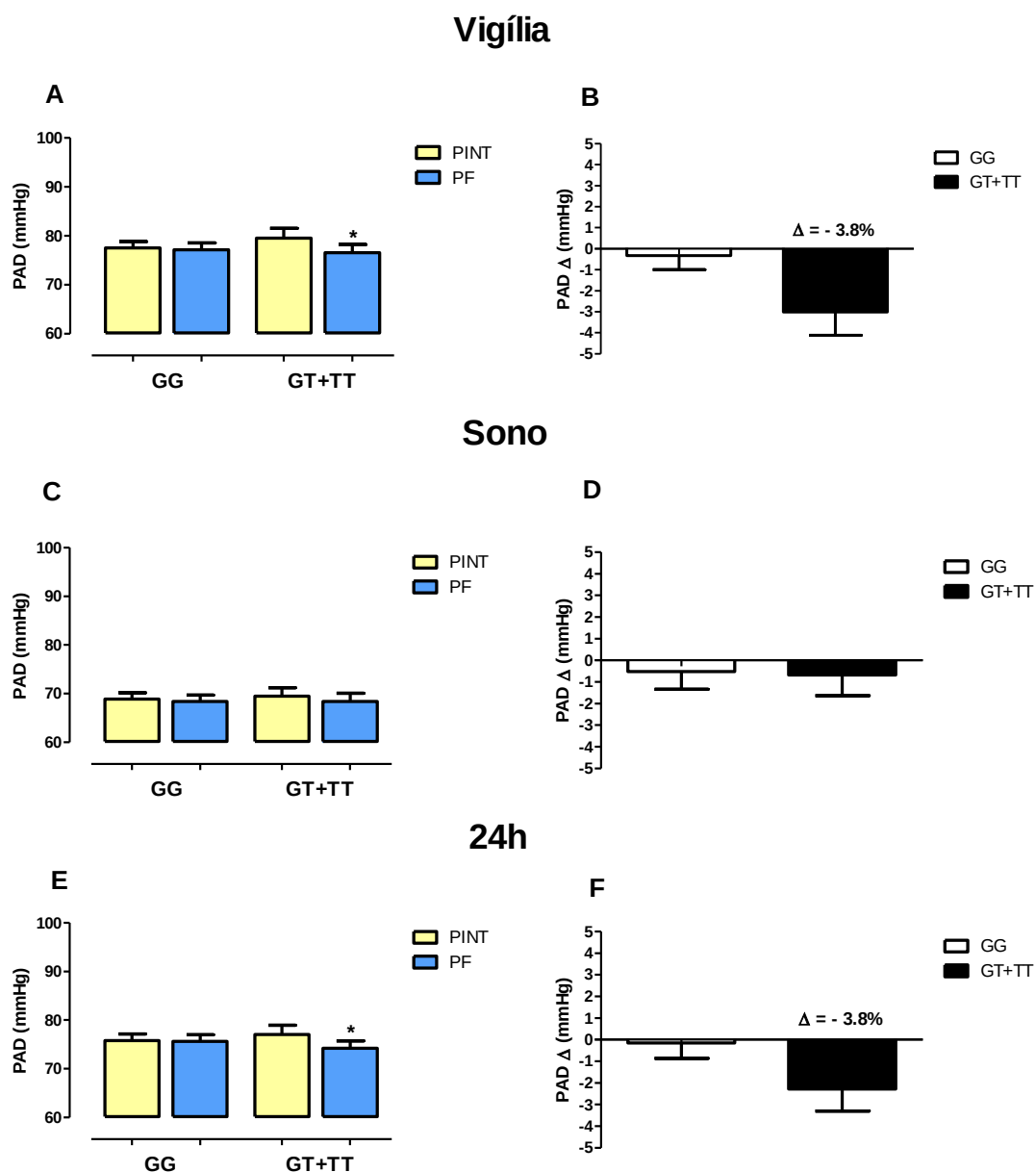


Figura 28. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a pressão arterial (**A.** PAD Vigília; **B.** Delta PAD Vigília; **C.** PAD Sono; **D.** Delta PAD Sono; **E.** PAD 24h; **F.** Delta PAD 24h), mensurada através do monitoramento ambulatorial da pressão arterial - MAPA, para a posição 894G>T, entre os períodos intermediário (PINT) e final (PF) em voluntários adultos. *= p<0,05 em relação ao PINT.

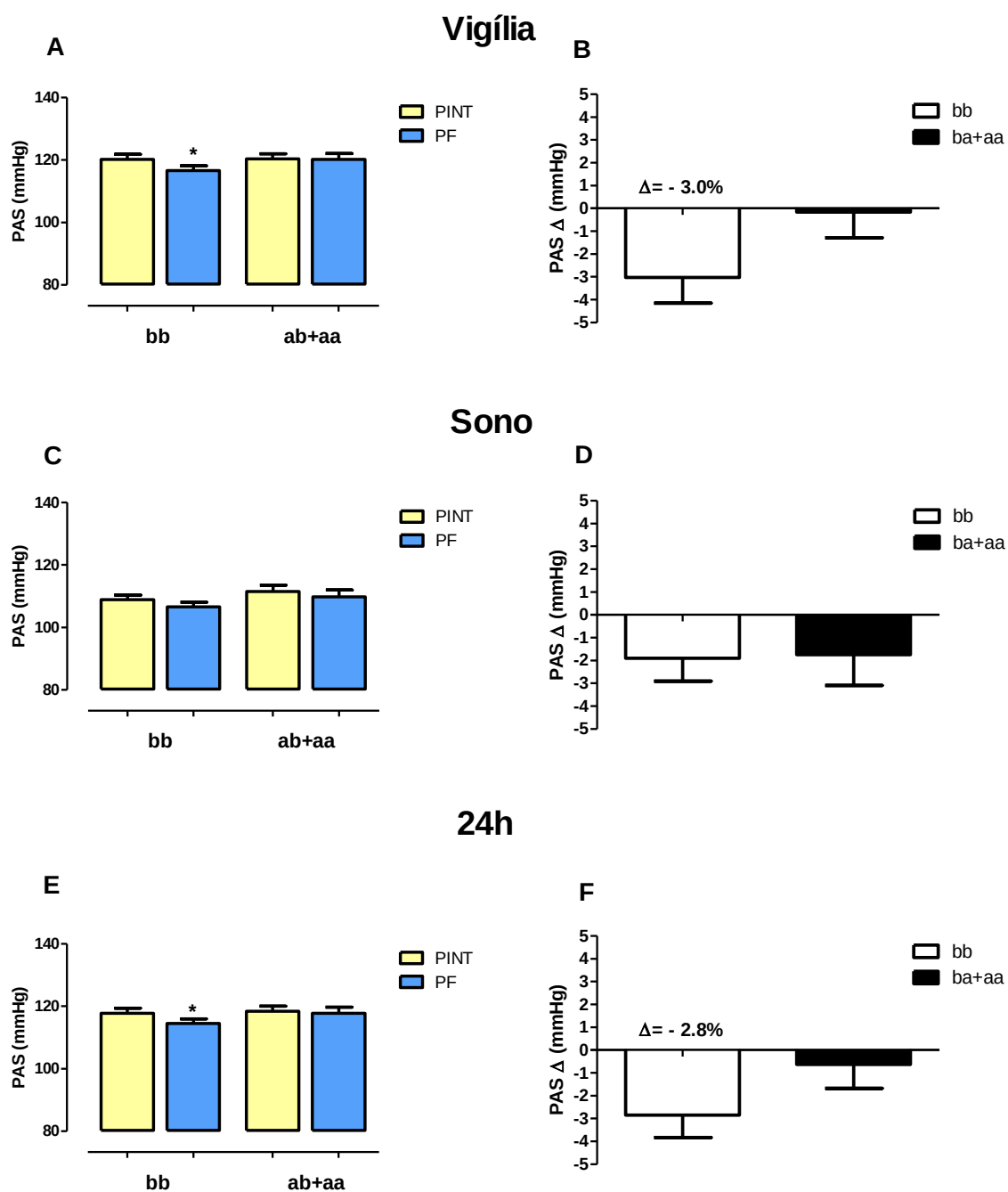


Figura 29. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a pressão arterial (**A.** PAS Vigília; **B.** Delta PAS Vigília; **C.** PAS Sono; **D.** Delta PAS Sono; **E.** PAS 24h; **F.** Delta PAS 24h), mensurada através do monitoramento ambulatorial da pressão arterial - MAPA, para a posição Íntron 4b/a, entre os períodos intermediário (PINT) e final (PF) para o grupo de voluntários normotensos + hipertensos.

* = $p < 0,05$ em relação ao PINT.

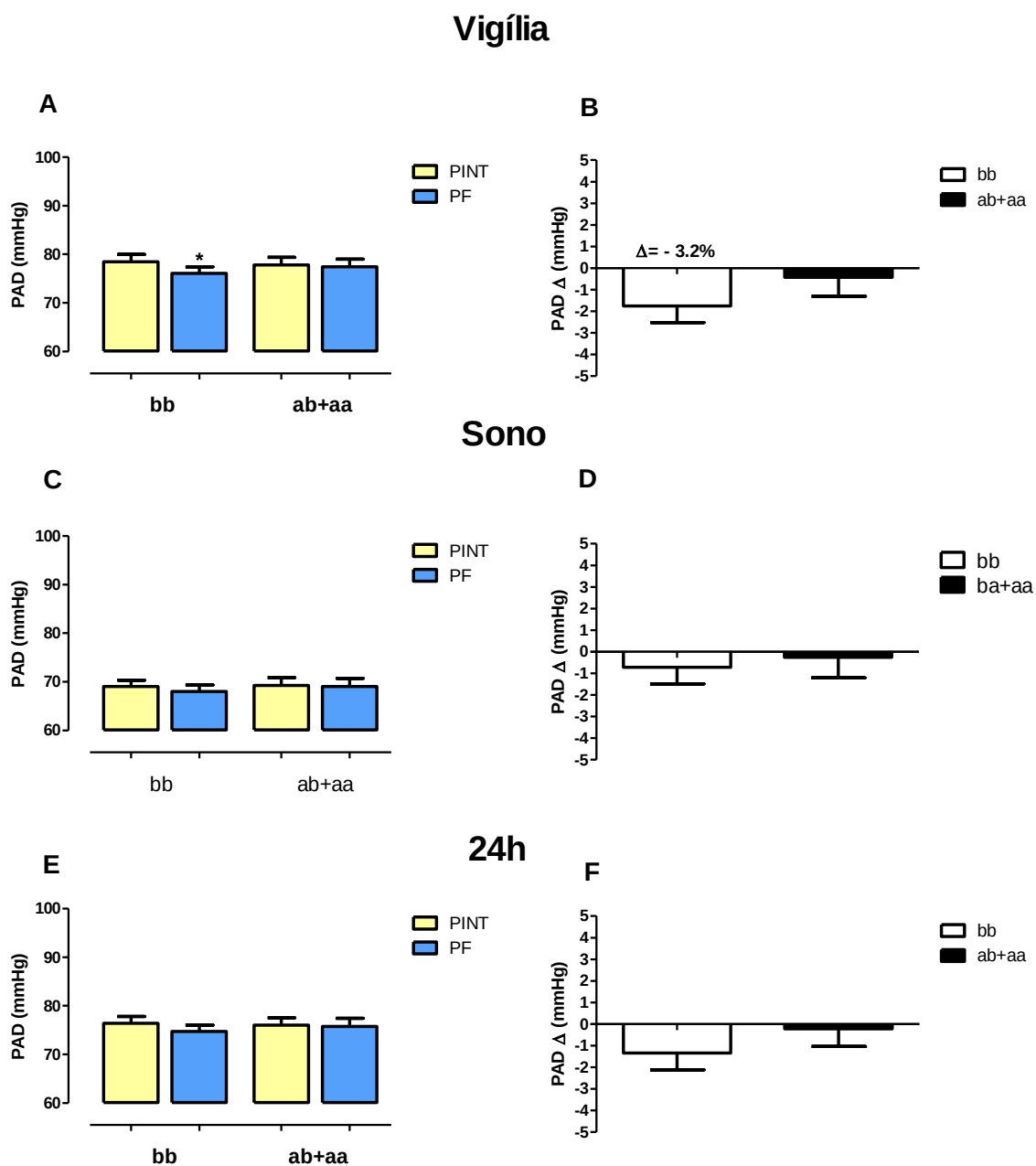


Figura 30. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a pressão arterial (**A.** PAD Vigília; **B.** Delta PAD Vigília; **C.** PAD Sono; **D.** Delta PAD Sono; **E.** PAD 24h; **F.** Delta PAD 24h), mensurada através do monitoramento ambulatorial da pressão arterial - MAPA, para a posição Íntron 4b/a, entre os períodos intermediário (PINT) e final (PF) em voluntários adultos. *= $p < 0,05$ em relação ao PINT.

Bioquímica

Quando analisamos os biomarcadores relacionados ao estado redox e produção de óxido nítrico indiretamente pela medida de NOx^- observamos que o TFA não modificou as concentrações plasmáticas de NOx^- em todos os grupos analisados. Por outro lado, observamos que a atividade plasmática da enzima SOD foi significativamente aumentada em todos os grupos estudados em resposta ao TFA, independente do genótipo analisado (-786TT: PINTxPF: 29,3% e -786TC+CC: PINTxPF: 49,4%; 894GG: PINTxPF: 33,8% e 894GT+TT: PINTxPF: 58,9%), Íntron 4bb: 40,4% e Íntron 4ab+aa: PINTxPF: 48,6%). Os dados estão sumarizados na Tabela 12 e ilustrados nas Figuras 31, 32 e 33.

Já em relação à atividade plasmática da catalase, somente os indivíduos com polimorfismo para o Íntron 4, grupo Íntron 4ab+aa, foi verificada elevação da atividade dessa enzima antioxidante, aproximadamente 27,9%.

Nenhuma alteração foi observada na concentração de MDA em resposta ao TFA por 24 sessões em todos os grupos estudados (Tabela 12 e figuras 31, 32 e 33).

Tabela 12. Efeito de 24 sessões de TFA sobre os parâmetros bioquímicos (NOx⁻; SOD, Catalase e MDA) para as posições -786T>C, 894G>T e Íntron 4b/a do gene NOS3, entre os períodos inicial (PI), intermediário (PINT) e final (PF) em voluntários adultos.

Parâmetros	TT (n=31)			TC+CC (n=55)		
	PI	PINT	PF	PI	PINT	PF
-786T>C						
NOx ⁻ (μM)	26,1±2,7	23,0±2,5	24,3±3,1	23,2±1,6	20,9±1,4	24,1±1,9
SOD (U/ml)	18,4±1,9	16,7±2,0	21,6±2,1*	16,9±1,0	16,1±1,1	23,9±1,6*
Catalase (nmol/min/ml)	33,6±2,6	32,1±2,5	38,7±2,9	37,3±2,0	36,8±1,8	41,4±2,6
MDA (μM)	8,9±0,5	8,0±0,4	7,8±0,3	7,7±0,3	8,1±0,3	7,7±0,2
	GG (n=51)			GT+TT (n=35)		
894G>T						
NOx ⁻ (μM)	25,2±1,7	21,1±1,3	23,1±1,5	21,9±1,9	21,5±1,8	22,1±2,0
SOD (U/ml)	18,4±1,3	17,2±1,4	23,0±1,5*	16,0±1,3	14,6±1,4	23,2±2,2*
Catalase (nmol/min/ml)	34,0±1,9	33,5±1,8	39,8±2,2	37,0±2,0	35,6±1,8	38,6±2,8
MDA (μM)	8,5±0,4	8,2±0,3	7,7±0,2	7,7±0,3	8,0±0,4	7,8±0,3
	bb (n=59)			ab+aa (n=27)		
Íntron 4 b/a						
NOx ⁻ (μM)	24,5±1,7	22,6±1,6	23,1±2,0	24,5±2,5	20,5±2,0	27,3±3,0
SOD (U/ml)	17,4±1,0	15,6±1,1	21,9±1,5*	17,6±1,9	17,3±2,0	25,7±2,2*
Catalase (nmol/min/ml)	37,7±2,0	36,4±1,9	40,0±2,6	32,2±2,2	32,3±2,1	41,3±2,8*
MDA (μM)	8,2±0,3	8,0±0,3	7,8±0,2	8,1±0,5	8,4±0,5	7,6±0,3

PI = Período Inicial; PINT = Período intermediário; PF = Período Final; NOx⁻ = concentração plasmática de Nitrito/Nitrato; SOD = superóxido dismutase; MDA = Malondialdeído.; -786TT, 894GG e Íntron 4bb (grupos não polimórficos); -786TC+CC; 894GT+TT e Íntron 4ab+aa (grupos polimórficos). Os dados estão expressos em média ± EPM. *= p<0,05 em relação ao PI e PINT.

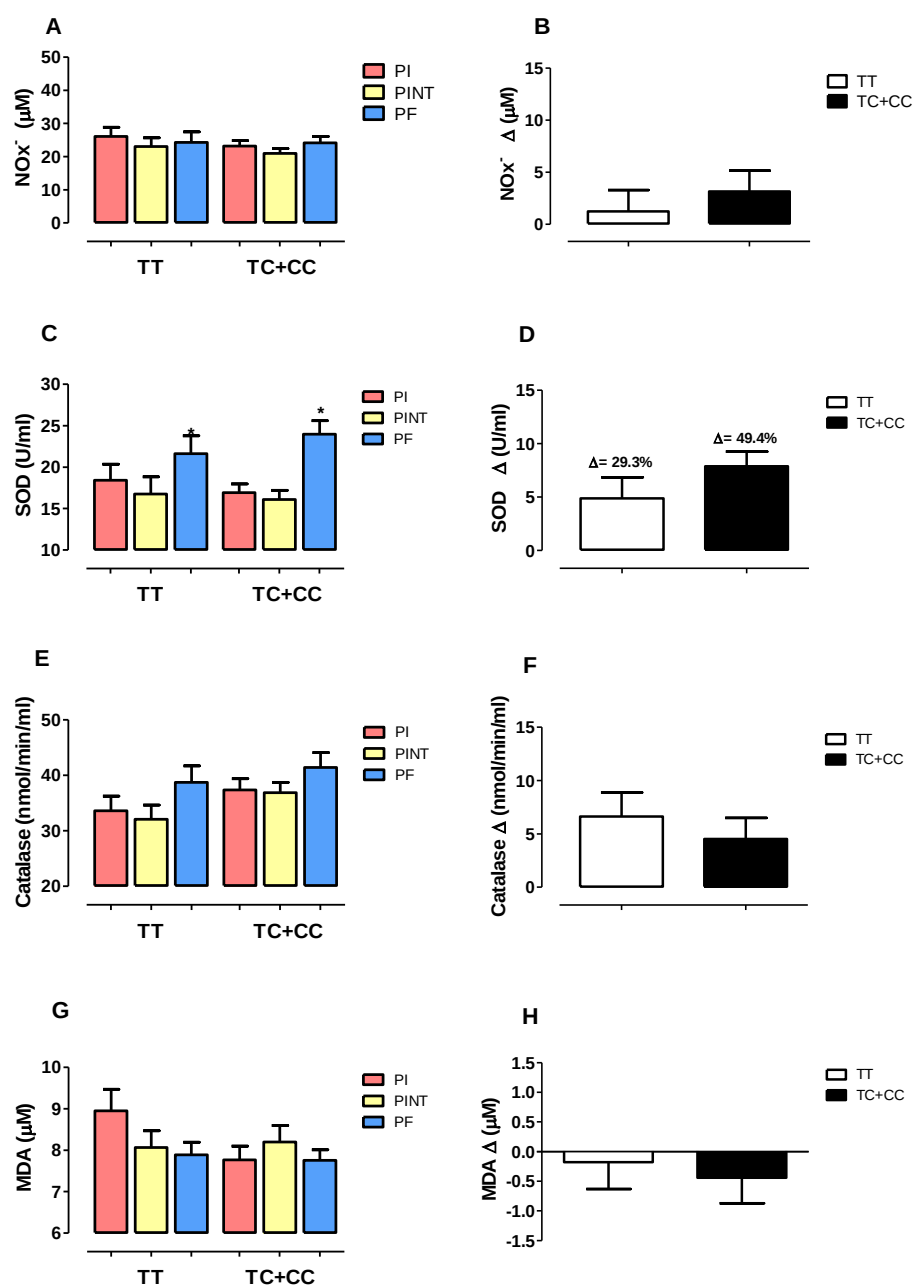


Figura 31. Efeito de 24 sessões de TFA sobre os parâmetros bioquímicos (**A.** NOx⁻; **B.** Delta NOx⁻; **C.** SOD; **D.** Delta SOD; **E.** Catalase; **F.** Delta Catalase; **G.** MDA; **H.** Delta MDA) para a posição -786T>C do gene NOS3, entre os períodos inicial (PI), intermediário (PINT) e final (PF) em voluntários adultos.

*= p<0,05 em relação ao PI e PINT.

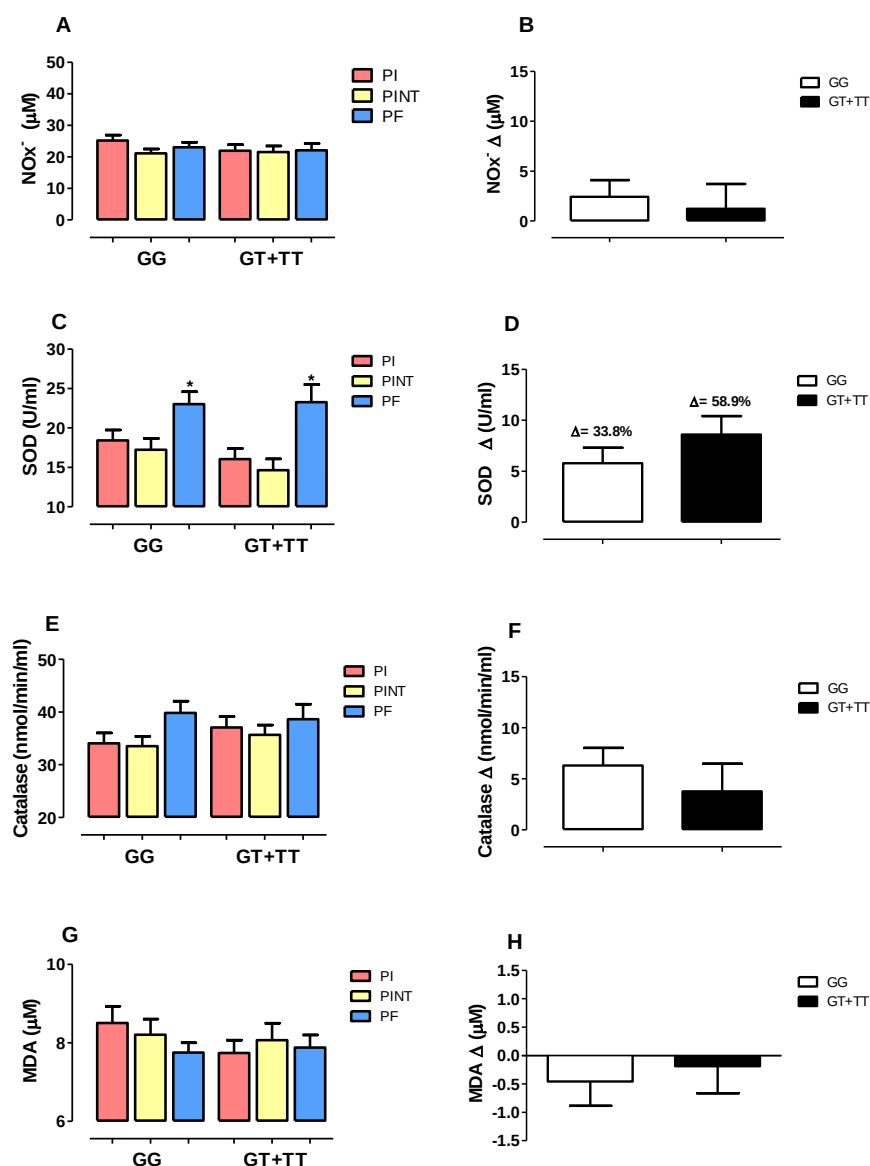


Figura 32. Efeito de 24 sessões de TFA sobre os parâmetros bioquímicos (**A.** NOx⁻; **B.** Delta NOx⁻; **C.** SOD; **D.** Delta SOD; **E.** Catalase; **F.** Delta Catalase; **G.** MDA; **H.** Delta MDA) para a posição 894G>T do gene NOS3, entre os períodos inicial (PI), intermediário (PINT) e final (PF) em voluntários adultos.

*= p<0,05 em relação ao PI e PINT.

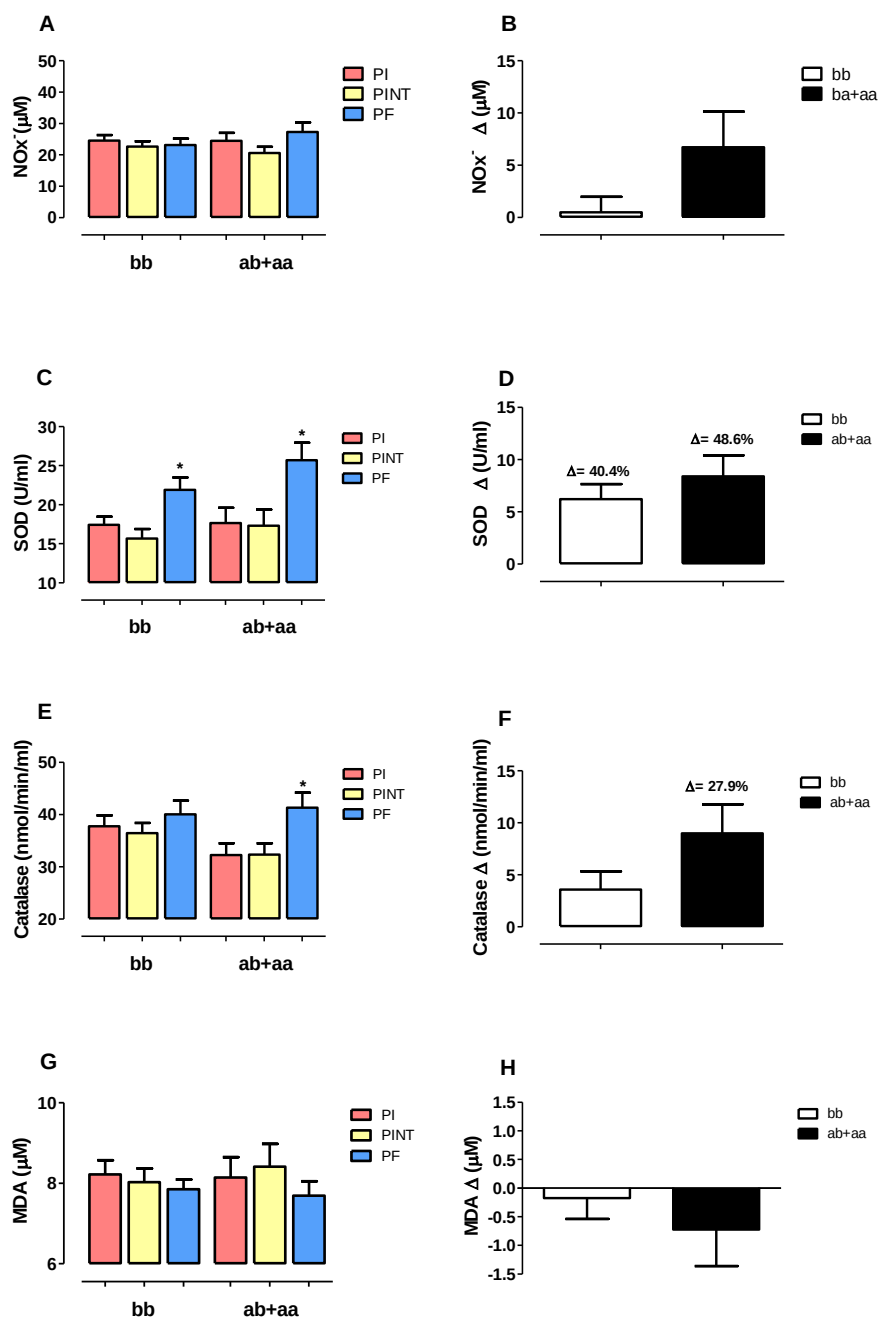


Figura 33. Efeito de 24 sessões de TFA sobre os parâmetros bioquímicos (**A.** NOx⁻; **B.** Delta NOx⁻; **C.** SOD; **D.** Delta SOD; **E.** Catalase; **F.** Delta Catalase; **G.** MDA; **H.** Delta MDA) para a posição Íntron 4b/a do gene NOS3, entre os períodos inicial (PI), intermediário (PINT) e final (PF) em voluntários adultos.

*= p<0,05 em relação ao PI e PINT.

[illegible]

3.5 PARTE 3

ANÁLISE POR HAPLÓTIPOS DOS POLIMORFISMOS PARA AS POSIÇÕES - 786T>C, 894G>T E ÍNTRON 4b/a

Em relação à análise dos haplótipos, utilizamos o software Phase 2.1, conforme descrito na seção de métodos, aceitando uma frequência > 5% para inclusão no estudo (METZGER et al., 2007). Os grupos haplotípicos estão organizados na ordem das posições -786 (T ou C); 894 (G ou T) e Íntron 4 (b ou a). A tabela 13 apresenta esses dados.

Tabela 13. Frequência (f) dos haplótipos para as posições polimórficas -786T>C, 894G>T e Íntron 4 b/a do gene NOS3 para o grupo de voluntários normotensos + hipertensos.

Haplótipos		
Grupos	f (freq.)	EP
TGb	0,437	0,017
TGa	0,100	0,017
TTb	0,083	0,008
TTa	<0,05	-
CGb	0,127	0,017
CGa	0,055	0,017
CTb	0,194	0,008
CTa	<0,05	-

f = frequência haplotípica; EP = erro padrão. Os grupos haplotípicos estão organizados na ordem dos genótipos -786 (T ou C); 894 (G ou T) e Íntron 4 (b ou a)

Antropometria

Na análise antropométrica, não foram observadas diferenças significativas para o índice de massa corporal em resposta ao treinamento físico independentemente do grupo haplotípico analisado, entre os períodos do estudo. Por outro lado, quanto à circunferência abdominal, foram verificadas redução de seus valores em resposta ao treinamento físico para os grupos TGb (PINTxPF: -1,3%), TGa (PINTxPF: -1,1%) e CTb (PINTxPF: -0,9%) entre os períodos do estudo (Tabela 14 e Figura 34).

Tabela 14. Efeito de 24 sessões de TFA sobre o índice de massa corporal e circunferência abdominal divididos pelos haplótipos para as posições polimórficas - 786T>C, 894G>T e Íntron 4 b/a do gene NOS3 em voluntários adultos.

Grupos	IMC (kg/m ²)			CA (cm)		
	PI	PINT	PF	PI	PINT	PF
TGb (n= 68)	27,0±0,3	26,9±0,3	26,6±0,3	86,6±1,1	85,8±1,0	84,7±1,0*
TGa (n= 27)	27,0±0,4	27,0±0,4	26,9±0,5	85,2±1,6	84,6±1,6	83,7±1,5*
TTb (n= 12)	25,0±0,7	24,9±0,7	24,8±0,6	80,6±2,3	80,3±2,5	79,6±2,5
CGb (n= 25)	26,8±0,6	26,7±0,5	26,8±0,6	85,6±1,7	85,5±1,8	84,4±1,6
CTb (n= 36)	26,4±0,4	26,5±0,4	26,4±0,4	84,5±1,5	84,3±1,6	83,5±1,6*

PI = Período Inicial; PINT = Período intermediário; PF = Período Final; IMC = Índice de Massa Corporal; CA = Circunferência Abdominal; Os grupos haplotípicos estão organizados na ordem do genótipos -786 (T ou C); 894 (G ou T) e Íntron 4 (b ou a); Os dados estão expressos em média ± EPM. *= p<0,05 em relação ao PI e PINT.

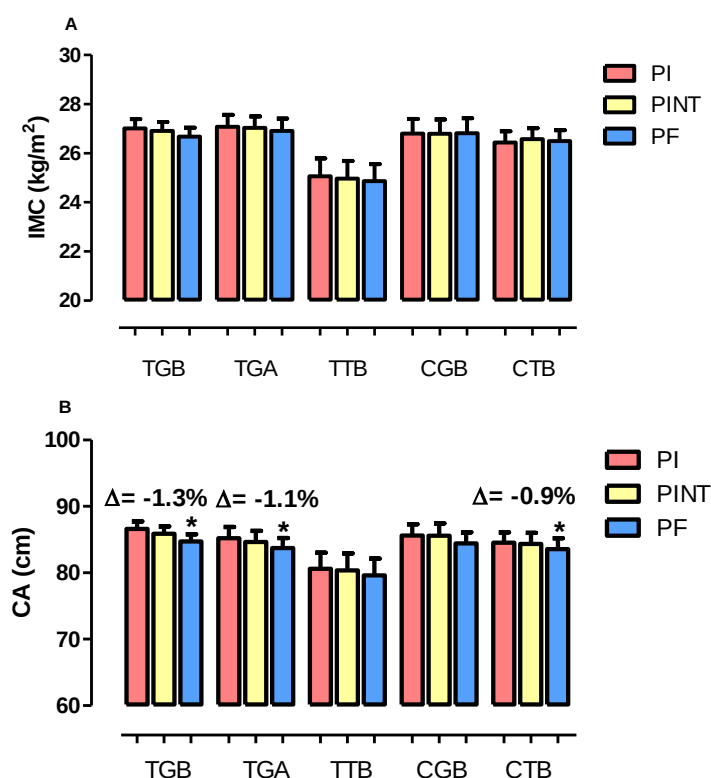


Figura 34. Efeito de 24 sessões de TFA sobre os parâmetros antropométricos (A. IMC; B. CA) dividido pelos haplótipos para as posições polimórficas -786T>C, 894G>T e Íntron 4 b/a do gene NOS3 em voluntários adultos. *= p<0,05 em relação ao PI e PINT.

Cardiovascular

Para as análises da frequência cardíaca de repouso, observamos redução significativa em resposta ao treinamento físico para os grupos haplotípicos TGb (PINTxPF: -2,9%), TGa (PINTxPF: -6,0%) e CGb (PINTxPF: -6,2%) entre os períodos do estudo. Por outro lado quando avaliamos a frequência cardíaca de exercício durante uma sessão aguda de exercício físico aeróbio após o treinamento, observamos que a redução da FC ocorreu independente do haplótipo, ou seja, todos os grupos analisados apresentaram redução desse parâmetro, TGb (PINTxPF: -7,8%), TGa (PINTxPF:-9,0%), TTb (PINTxPF: -9,7%), CGb (PINTxPF:-8,2%) e CTb (PINTxPF:-6,8%). Os dados estão sumarizados nas Tabelas 15 e 16 e ilustrados na Figura 35, (painéis A e B).

Tabela 15. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a frequência cardíaca de repouso dividido pelos haplótipos para as posições polimórficas -786T>C, 894G>T e Íntron 4 b/a do gene NOS3 em voluntários adultos.

Grupos	FC repouso (bpm)		
	PI	PINT	PF
TGb (n= 68)	-	74,7±1,0	72,5±1,1*
TGa (n= 27)	-	74,7±1,9	70,2±2,0*
TTb (n= 12)	-	77,4±3,6	73,6±3,7
CGb (n= 25)	-	75,5±2,0	70,9±2,1*
CTb (n= 36)	-	78,4±1,6	78,6±1,7

PI = Período Inicial; PINT = Período intermediário; PF = Período Final; FC = Frequência Cardíaca; Os grupos haplotípicos estão organizados na ordem do genótipos -786 (T ou C); 894 (G ou T) e Íntron 4 (b ou a); Os dados estão expressos em média ± EPM. *= p<0,05 em relação ao PI e PINT.

Tabela 16. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a frequência cardíaca de exercício divididos pelos haplótipos para as posições polimórficas -786T>C, 894G>T e Íntron 4 b/a do gene NOS3 em voluntários adultos.

Grupos	FC exercício (bpm)		
	PI	PINT	PF
TGb (n= 68)	-	147,1±1,6	135,7±1,5*
TGa (n= 27)	-	150,4±2,7	136,7±2,6*
TTb (n= 12)	-	148,9±2,0	134,4±2,8*
CGb (n= 25)	-	148,3±2,8	136,2±3,0*
CTB (n= 36)	-	149,8±2,8	139,6±2,7*

PI = Período Inicial; PINT = Período intermediário; PF = Período Final; FC = Frequência Cardíaca; Os grupos haplotípicos estão organizados na ordem do genótipos -786 (T ou C); 894 (G ou T) e Íntron 4 (b ou a); Os dados estão expressos em média ± EPM. *= p<0,05 em relação ao PI e PINT.

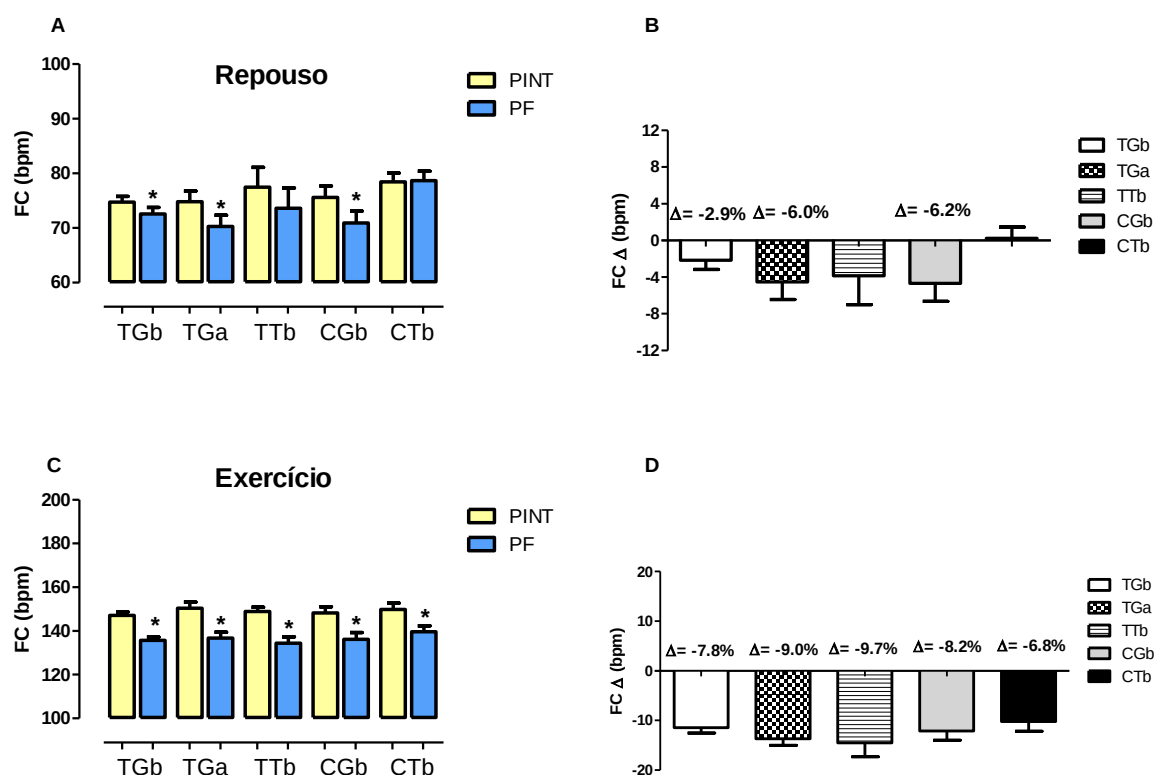


Figura 35. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a frequência cardíaca de repouso e exercício dividida pelos haplótipos para as posições polimórficas -786T>C, 894G>T e Íntron 4 b/a do gene NOS3 em voluntários adultos. *= $p < 0,05$ em relação ao PINT.

Na análise da pressão arterial (mensurada através do método auscultatório), foram verificadas reduções significativas em resposta ao treinamento físico tanto para a PAS quanto PAD para os grupos de haplótipos TGb [PAS (PINTxPF:-4,1%); PAD (PINTxPF:-3,8%)], TTb [PAS (PINTxPF:-1,2%); PAD (PINTxPF:-4,7%)] e CTb [PAS (PINTxPF:-2,7%); PAD (PINTxPF:-2,7%)] entre os períodos do estudo (Tabela 17 e Figura 36).

Tabela 17. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a pressão arterial (mensurada através do método auscultatório) dividido pelos haplótipos para as posições polimórficas -786T>C, 894G>T e Íntron 4 b/a do gene NOS3 em voluntários adultos.

Grupos	PAS ausc (mmHg)			PAD ausc (mmHg)		
	PI	PINT	PF	PI	PINT	PF
TGb (n= 68)	117,9±1,6	116,6±1,7	111,8±1,3*	76,3±0,9	76,0±1,1	73,1±0,9*
TGa (n= 27)	115,5±3,4	114,1±3,0	112,6±2,8	75,8±1,7	75,7±1,9	74,3±1,6
TTb (n= 12)	116,4±5,2	117,7±4,2	113,0±4,2*	79,0±3,6	78,2±3,1	74,5±2,7*
CGb (n= 25)	117,9±3,5	119,6±3,0	116,6±3,0	76,6±1,7	77,4±1,9	76,0±1,8
CTb (n= 36)	115,6±2,3	114,7±2,0	111,6±1,8*	77,9±1,5	76,7±1,3	74,6±1,2*

PI = Período Inicial; PINT = Período intermediário; PF = Período Final; PAS = Pressão Arterial Sistólica; PAD – Pressão Arterial Diastólica. Os grupos haplotípicos estão organizados na ordem do genótipos -786 (T ou C); 894 (G ou T) e Íntron 4 (b ou a); Os dados estão expressos em média ± EPM. *= p<0,05 em relação ao PI e PINT.

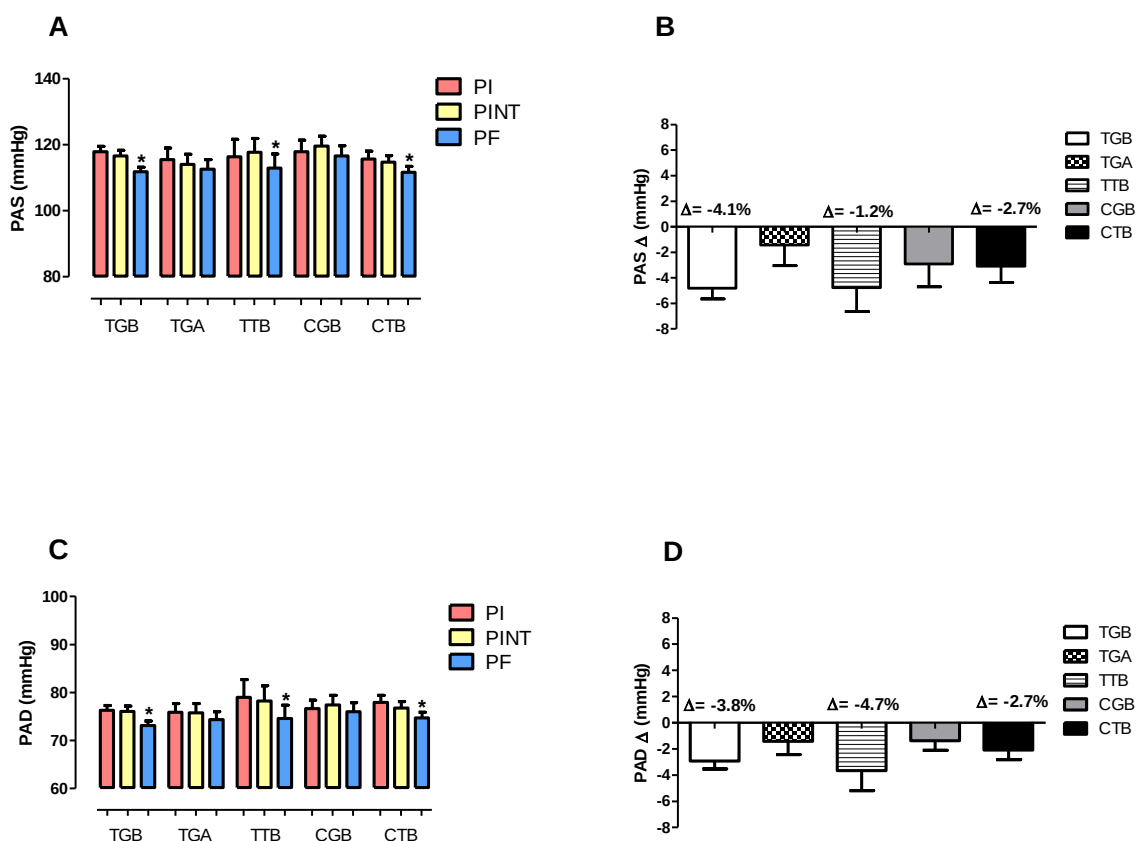


Figura 36. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a pressão arterial (**A.** PAS; **B.** Delta PAS; **C.** PAD; **D.** Delta PAD), mensurada através do método auscultatório, dividido pelos haplótipos para as posições polimórficas -786T>C, 894G>T e Íntron 4 b/a do gene NOS3 em voluntários adultos. *= p<0,05 em relação ao PI e PINT.

Em relação à pressão arterial sistólica (mensurada através do monitoramento ambulatorial da pressão arterial - MAPA) foram observadas reduções em seus valores em resposta ao treinamento físico tanto no momento de vigília quanto na análise de 24h para os grupos haplotípicos TGb [Vigília (PINTxPF:-1,7%); 24h (PINTxPF:-2,0%)], TTb [Vigília (PINTxPF:-6,2%); 24h (PINTxPF:-5,4%)] e CTb [Vigília (PINTxPF:-3,8%); 24h (PINTxPF:-3,1%)] entre os períodos do estudo. De maneira similar, em relação à pressão arterial diastólica, observamos redução significativa em resposta ao treinamento físico tanto no momento de vigília quanto na análise de 24h para os grupos de haplótipos TTb [Vigília (PINTxPF:-7,5%); 24h (PINTxPF:-6,1%)] e CTb [Vigília (PINTxPF:-4,2%); 24h (PINTxPF:-3,5%)] entre os períodos do estudo, sem alterações significativas para o grupo TGb. Além disso, observou-se maior magnitude de redução da PAD em resposta ao treinamento físico na comparação entre os grupos TTb e TGb quando comparado aos demais grupos de haplótipos (Tabelas 18 e 19 e Figuras 37 e 38).

Tabela 18. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a pressão arterial sistólica, mensurada através do monitoramento ambulatorial da pressão arterial - MAPA, divididos pelos haplótipos para as posições polimórficas -786T>C, 894G>T e Íntron 4 b/a do gene NOS3 em voluntários adultos.

Grupos	PAS Vigília (mmHg)		PAS Sono (mmHg)		PAS 24h (mmHg)	
	PINT	PF	PINT	PF	PINT	PF
TGb (n= 68)	120,3±1,3	118,2±1,3*	108,9±1,2	107,3±1,2	117,9±1,3	115,7±1,2*
TGa (n= 27)	119,2±1,7	118,8±2,0	110,9±2,0	108,9±2,3	117,4±1,6	116,5±2,0
TTb (n= 12)	121,2±4,3	113,7±3,6*	108,0±4,0	104,3±3,5	118,4±4,1	112,0±3,7*
CGb (n= 25)	119,8±2,5	121,5±2,1	112,0±2,5	109,6±2,4	118,2±2,5	118,6±2,2
CTb (n= 36)	120,9±2,0	116,3±1,8*	109,5±1,8	108,5±1,9	118,1±1,9	114,5±1,7*

PINT = Período intermediário; PF = Período Final; PAS = Pressão Arterial Sistólica. Os grupos haplotípicos estão organizados na ordem dos genótipos -786 (T ou C); 894 (G ou T) e Íntron 4 (b ou a); Os dados estão expressos em média ± EPM. * = p<0,05 em relação ao PI e PINT.

Tabela 19. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a pressão arterial diastólica, mensurada através do monitoramento ambulatorial da pressão arterial - MAPA, divididos pelos haplótipos para as posições polimórficas -786T>C, 894G>T e Íntron 4 b/a do gene NOS3 em voluntários adultos.

Grupos	PAD Vigília (mmHg)		PAD Sono (mmHg)		PAD 24h (mmHg)	
	PINT	PF	PINT	PF	PINT	PF
TGb (n= 68)	77,1±1,2	76,8±1,2	68,1±1,1	68,1±1,2	75,3±1,2	75,1±1,2
TGa (n= 27)	77,3±1,5	77,0±1,6	68,9±1,6	68,3±1,8	75,5±1,5	75,4±1,6
TTb (n= 12)	79,8±3,8	73,8±3,2*	68,0±3,7	65,9±2,9	76,9±3,8	72,2±2,9*
CGb (n= 25)	79,2±1,9	78,6±1,9	70,5±1,8	69,6±1,8	77,5±1,8	77,5±1,8
CTb (n= 36)	80,4±1,9	77,0±1,5*	70,9±1,6	69,9±1,5	78,0±1,8	75,3±1,5*

PINT = Período intermediário; PF = Período Final; PAS = Pressão Arterial Sistólica. Os grupos haplotípicos estão organizados na ordem dos genótipos -786 (T ou C); 894 (G ou T) e Íntron 4 (b ou a); Os dados estão expressos em média ± EPM. *= p<0,05 em relação ao PI e PINT.

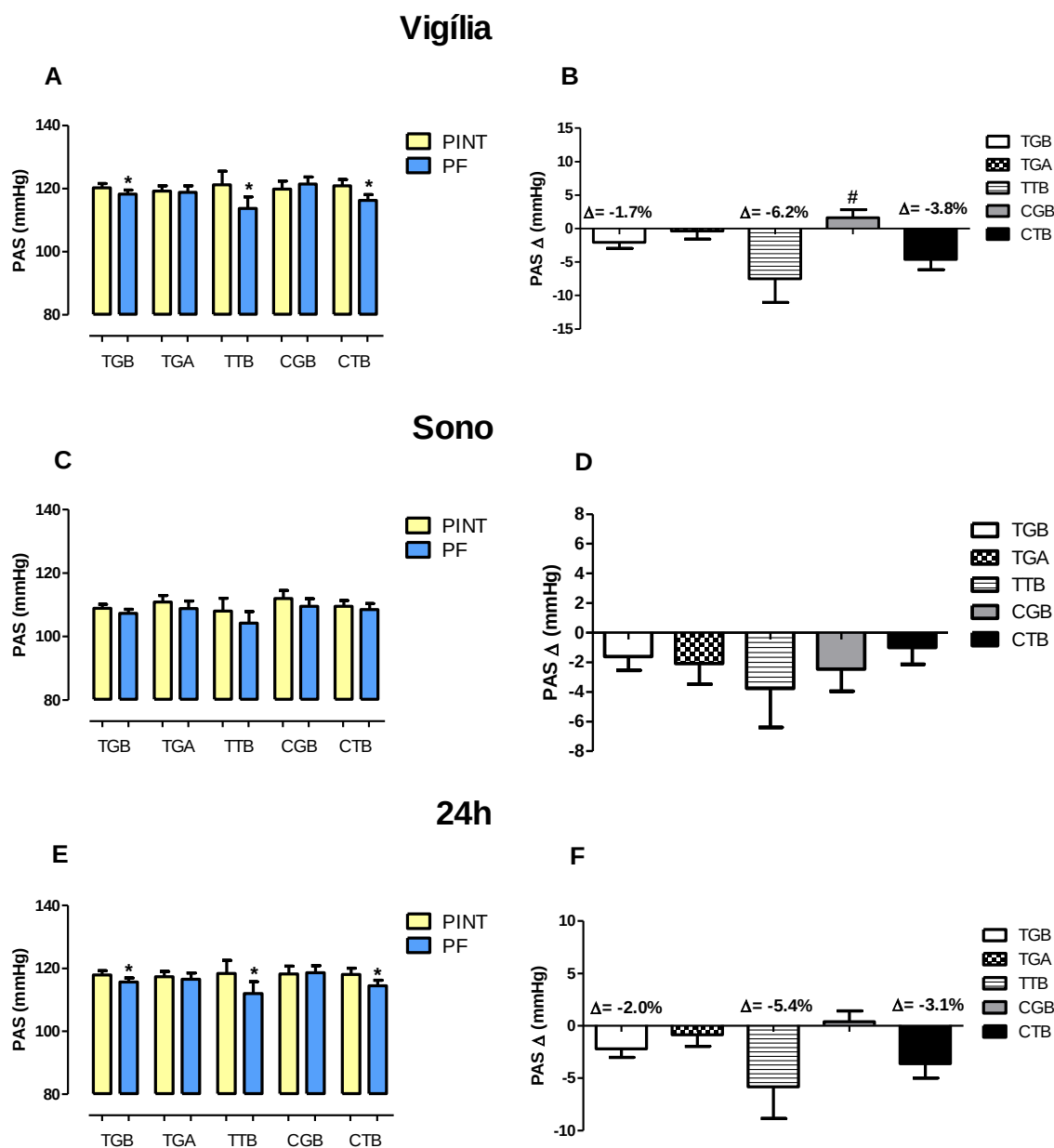


Figura 37. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a pressão arterial sistólica (**A.** PAS Vigília; **B.** Delta PAS Vigília; **C.** PAS Sono; **D.** Delta PAS Sono; **E.** PAS 24h; **F.** Delta PAS Sono) mensurada através do monitoramento ambulatorial da pressão arterial - MAPA, dividido pelos haplótipos para as posições polimórficas -786T>C, 894G>T e Íntron 4 b/a do gene NOS3 em voluntários adultos. *= $p < 0,05$ em relação ao PINT; # = $p < 0,05$ em relação aos grupos TTB e CTB.

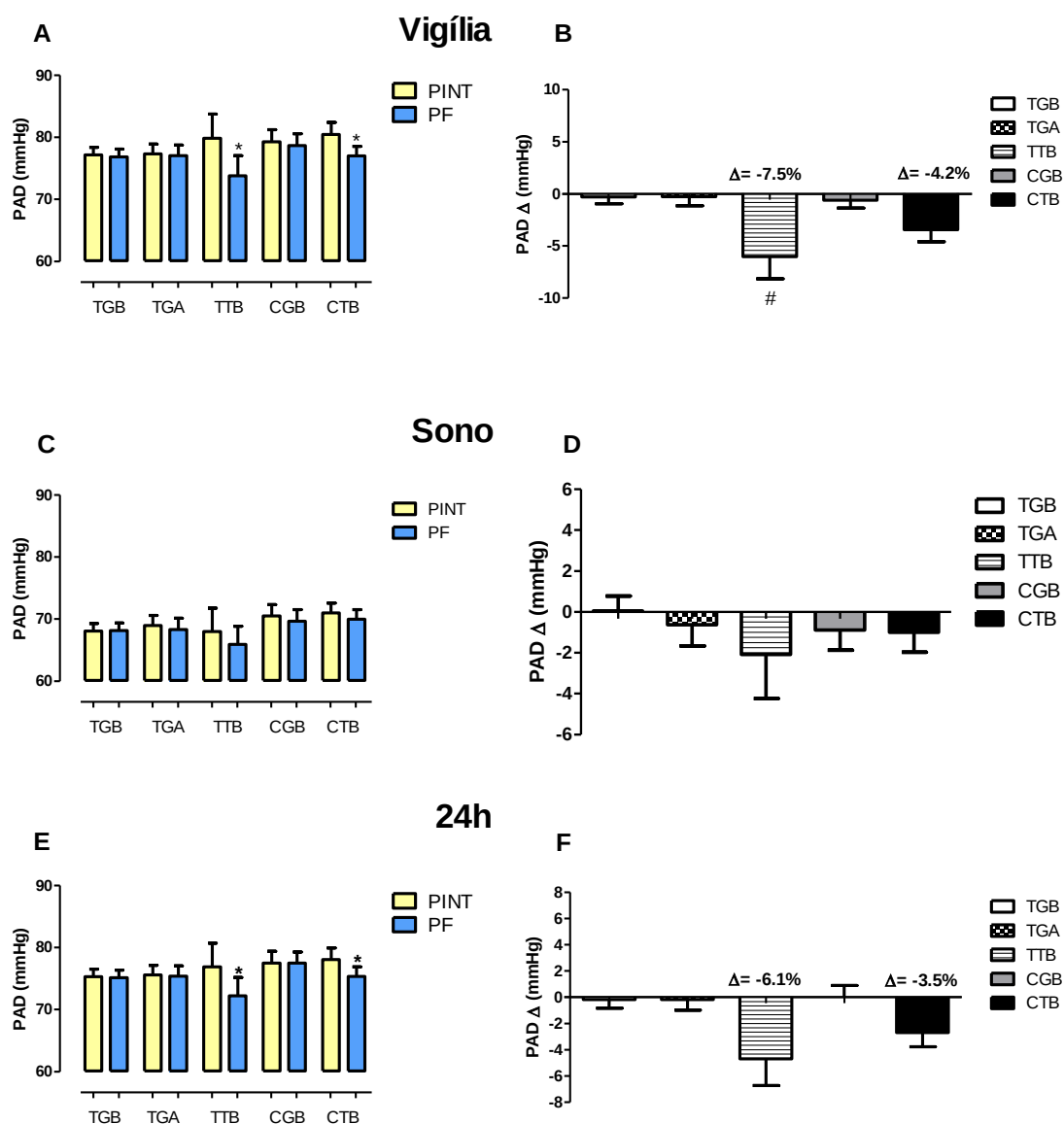


Figura 38. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a pressão arterial diastólica (**A.** PAD Vigília; **B.** Delta PAD Vigília; **C.** PAD Sono; **D.** Delta PAD Sono; **E.** PAD 24h; **F.** Delta PAD Sono) mensurada através do monitoramento ambulatorial da pressão arterial - MAPA, dividido pelos haplótipos para as posições polimórficas -786T>C, 894G>T e Íntron 4 b/a do gene NOS3 em voluntários adultos. *= $p < 0,05$ em relação ao PINT; # = $p < 0,05$ em relação ao grupo TGB.

Bioquímica

Consistentemente com as análises anteriores, os biomarcadores da produção de óxido nítrico e peroxidação lipídica, NOx^- e MDA, respectivamente, não apresentaram qualquer alteração em resposta ao treinamento físico, quando a análise foi feita por haplótipos. Por outro lado, alguns grupos de haplótipos mostraram elevação na atividade da enzima SOD e catalase. Podemos observar que os grupos TGb (PINTxPF: 33,7%), TGA (PINTxPF: 43,9%), CGb (PINTxPF:39,1%) e CTb (PINTxPF:60,9%) apresentaram elevação da atividade da SOD em resposta ao TFA. Já para a atividade da catalase, foram observadas elevação significativa em resposta ao TFA para os grupos TGb (PINTxPF:15,1%) e TGA (PINTxPF:30,3%) entre os períodos do estudo, sem alterações para os grupos CGb e CTb. Os dados estão sumarizados nas Tabelas 20 e 21 e ilustrados nas Figuras 39 e 40.

Tabela 20. Efeito de 24 sessões de TFA sobre os parâmetros bioquímicos (SOD e Catalase), divididos pelos haplótipos para as posições polimórficas -786T>C, 894G>T e Íntron 4 b/a do gene NOS3 em voluntários adultos.

Grupos	SOD (U/ml)			Catalase (nmol/min/ml)		
	PI	PINT	PF	PI	PINT	PF
TGb (n= 68)	18,5±1,0	16,3±1,2	21,8±1,3*	36,3±1,8	35,1±1,6	40,4±2,1*
TGa (n= 27)	18,1±1,9	18,0±2,0	25,9±2,1*	32,2±1,9	31,7±1,9	41,3±2,8*
TTb (n= 12)	13,9±2,7	12,8±2,7	19,6±4,2	29,1±3,0	26,4±2,9	28,8±2,6
CGb (n= 25)	17,6±1,7	17,4±1,8	24,2±2,1*	35,4±2,6	34,5±2,2	38,6±2,9
CTb (n= 36)	17,0±1,3	15,1±1,4	24,3±2,1*	41,5±2,9	41,3±2,8	44,9±4,4

PI = Período Inicial; PINT = Período intermediário; PF = Período Final; SOD = Superóxido Dismutase. Os grupos haplotípicos estão organizados na ordem dos genótipos -786 (T ou C); 894 (G ou T) e Íntron 4 (b ou a); Os dados estão expressos em média ± EPM. *= p<0,05 em relação ao PI e PINT.

Tabela 21. Efeito de 24 sessões de TFA sobre os parâmetros bioquímicos (NOx e MDA), divididos pelos haplótipos para as posições polimórficas -786T>C, 894G>T e Íntron 4 b/a do gene NOS3 em voluntários adultos.

Grupos	NOx (μM)			MDA (μM)		
	PI	PINT	PF	PI	PINT	PF
TGb (n= 68)	26,8±1,7	23,6±1,7	24,0±2,0	8,7±0,3	8,1±0,3	7,7±0,2
TGa (n= 27)	23,3±2,5	19,3±1,9	27,1±3,0	8,0±0,5	8,2±0,5	7,8±0,3
TTb (n= 12)	17,0±2,4	18,5±2,3	22,5±4,0	7,8±0,5	7,9±0,6	8,3±0,6
CGb (n= 25)	23,3±2,5	18,8±1,7	22,5±2,5	7,7±0,6	7,8±0,6	7,4±0,3
CTb (n= 36)	22,5±1,9	22,2±1,9	24,2±2,6	7,7±0,3	8,0±0,4	7,8±0,3

PI = Período Inicial; PINT = Período intermediário; PF = Período Final; NOx = Nitrito/Nitrato; MDA = Malondialdeído. Os grupos haplotípicos estão organizados na ordem dos genótipos -786 (T ou C); 894 (G ou T) e Íntron 4 (b ou a); Os dados estão expressos em média ± EPM. *= p<0,05 em relação ao PI e PINT.

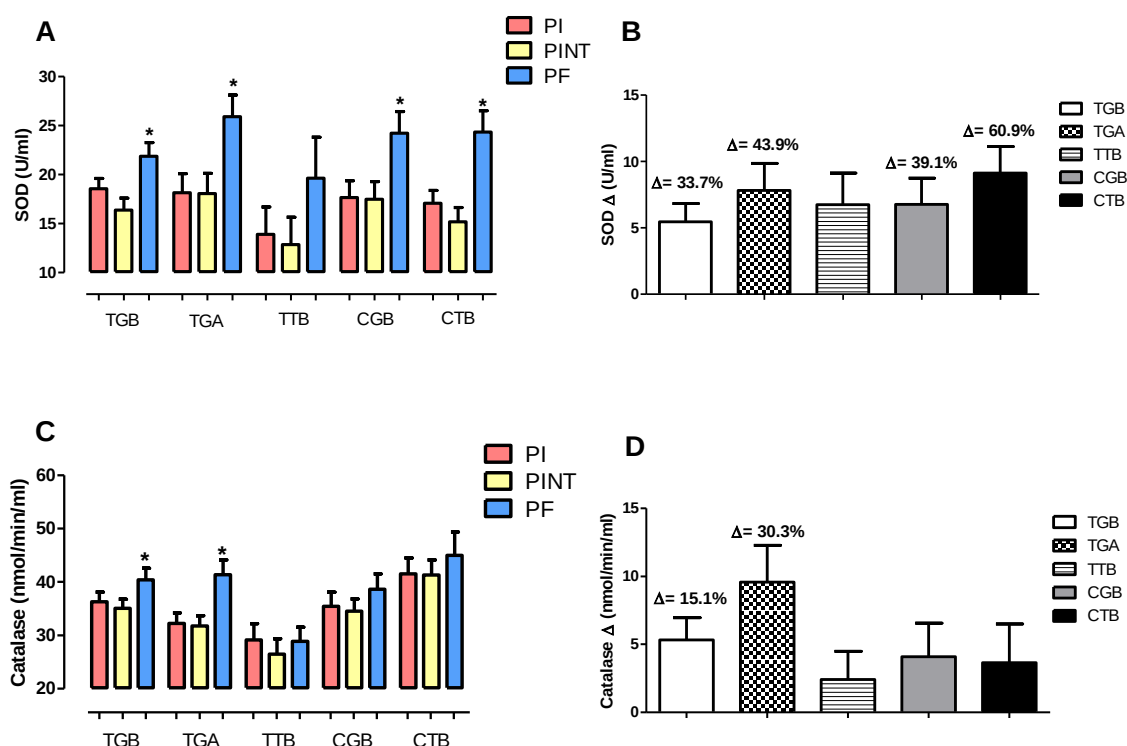


Figura 39. Efeito de 24 sessões de TFA sobre a atividade das enzimas antioxidantes (**A.**SOD; **B.** Delta SOD; **C.** Catalase; **D.** Delta Catalase), dividido pelos haplótipos para as posições polimórficas -786T>C, 894G>T e Íntron 4 b/a do gene NOS3 em voluntários adultos. *= p<0,05 em relação ao PI e PINT.

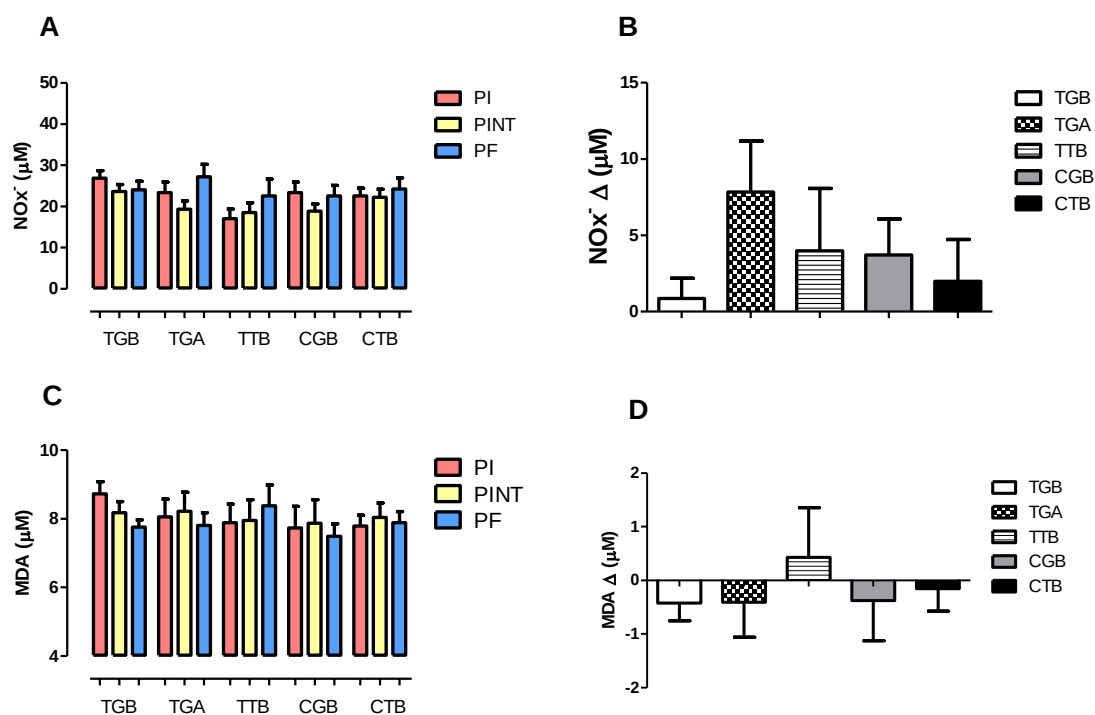


Figura 40. Efeito de 24 sessões de TFA sobre os parâmetros bioquímicos (**A.** NOx-; **B.** Delta NOx-; **C.** MDA; **D.** Delta MDA), dividido pelos haplótipos para as posições polimórficas -786T>C, 894G>T e Íntron 4 b/a do gene NOS3 em voluntários adultos. *= p<0,05 em relação ao PI e PINT.

3.6 Sumário dos Resultados: PARTE 3

	Haplótipos PI x PINT x PF				
	TGb	TGa	TTb	CGb	CTb
Antropometria	-	-	-	-	-
IMC	ns	ns	ns	ns	ns
CA	↓	↓	ns	ns	↓
Cardiovascular	-	-	-	-	-
FC repouso	↓	↓	ns	↓	ns
FC exercício	↓	↓	↓	↓	↓
PAS - Auscultatório	↓	ns	↓	ns	↓
PAD - Auscultatório	↓	ns	↓	ns	↓
PAS – MAPA (vigília)	↓	ns	↓	ns	↓
PAS – MAPA (sono)	ns	ns	ns	ns	ns
PAS – MAPA (24h)	↓	ns	↓	ns	↓
PAD –MAPA (vigília)	ns	ns	↓	ns	↓
PAD - MAPA (sono)	ns	ns	ns	ns	ns
PAD – MAPA (24h)	ns	ns	↓	ns	↓
Bioquímica	-	-	-	-	-
NOx ⁻	ns	ns	ns	ns	ns
SOD	↑	↑	ns	↑	↑
Catalase	↑	↑	ns	ns	ns
MDA	ns	ns	ns	ns	ns

4. DISCUSSÃO

4.1 PARTE 1

Sabe-se que o TFA é efetivo em promover redução da pressão arterial de repouso tanto para indivíduos normotensos quanto hipertensos (CORNELISSEN; FAGARD, 2005; FAGARD; CORNELISSEN, 2007; FAGARD, 2006; KELLEY; KELLEY; TRAN, 2001). Prévio estudo demonstrou em sua meta análise que essas reduções são mais pronunciadas para os indivíduos hipertensos em comparação aos normotensos, tanto para a pressão arterial sistólica ($HT\Delta = -6,9$ mmHg; $NT\Delta = -1,9$ mmHg) quanto para a pressão arterial diastólica ($HT\Delta = -4,9$ mmHg; $NT\Delta = -1,6$ mmHg). Segundo esses autores, essa alteração está associada a redução da resistência vascular periférica (aproximadamente 7,1%), em consequência da redução da atividade do sistema nervoso simpático e do sistema renina angiotensina, verificados por menores concentrações plasmáticas de norepinefrina e diminuição da atividade da renina (CORNELISSEN; FAGARD, 2005). Nossos resultados mostram claramente que o TFA por 24 sessões promoveu redução da pressão arterial sistólica e diastólica de repouso tanto para os voluntários normotensos ($PAS\Delta = -2,6$ mmHg; $PAD\Delta = -1,5$ mmHg) quanto para os hipertensos ($PAS\Delta = -5,6$ mmHg; $PAD\Delta = -3,8$ mmHg) respectivamente, com a maior magnitude de redução para a PAD no grupo de voluntários hipertensos. Por outro lado, quando avaliamos o comportamento da pressão arterial por 24h após o TFA, observamos redução da pressão arterial para o grupo de voluntários normotensos sem alterações para os hipertensos.

A pressão arterial ambulatorial (24h) exibe uma variação temporal em consequência de alterações nos fatores comportamentais (atividades do dia a dia, dieta, estresse mental e postura), ambientais (clima, poluição, etc) e endógeno (modificações dos fatores neurais, endócrinos e metabólicos decorrente do ciclo circadiano) (HERMIDA et al., 2013). Apesar do consenso estabelecido sobre os efeitos benéficos do TFA sobre a pressão arterial de repouso, em relação a reposta ambulatorial os resultados são conflitantes, sendo que alguns estudos observaram redução (BLUMENTHAL et al., 2000; MIYAI et al., 2002; GUIMARÃES et al., 2010) outros não verificam nenhuma alteração (CORNELISSEN et al., 2009; CARDOSO et

al., 2011; WAIB; GONÇALVES; BARRILE, 2011). Com o propósito de esclarecer essas discrepâncias, recente meta análise (CORNELISSEN; BUYS; SMART, 2013) demonstrou que o TFA promove redução tanto da pressão arterial sistólica quanto diastólica quando analisadas no período de vigília, sendo a magnitude de redução similar entre normotensos e hipertensos. Entretanto, para o período de sono, esses autores não observaram nenhuma alteração. Em nosso estudo, apesar das diferenças encontradas para a idade e circunferência abdominal (redução observada apenas para os normotensos), esses fatores possivelmente não justificam as discrepâncias encontradas para os nossos resultados, uma vez que prévios estudos verificaram que a idade, gênero, peso corporal, circunferência abdominal, assim como o protocolo de treinamento, não determinam a resposta da pressão arterial ambulatorial frente ao treinamento físico (CORNELISSEN; BUYS; SMART, 2013; CORNELISSEN; FAGARD, 2005).

Nossos resultados demonstram que tanto a frequência cardíaca de repouso e durante o período de sono (anexo B) não modificaram após o TFA para os indivíduos hipertensos. Essas condições poderiam representar a atenuação da redução da pressão arterial ambulatorial para esse grupo. Sabe-se que o TFA é capaz de promover bradicardia de repouso devido as modulações do sistema nervoso autônomo (aumento e redução da atividade parassimpática e simpática respectivamente), resultado do aumento da sensibilidade barorreflexa, das alterações do balanço simpato-vagal e mesmo da modulação intrínseca (redução da ativação do marca-passo sinoatrial) (CARTER; BANISTER; BLABER, 2003; HAUTALA; KIVINIEMI; TULPPO, 2009; LATERZA et al., 2007; SANDERCOCK; BROMLEY; BRODIE, 2005). Entretanto, quando analisados durante 24h através da medida ambulatorial, a compreensão desses dados apresenta-se mais complexa.

Outro fator que poderia estar influenciando a atenuada resposta autonômica do grupo de hipertensos em relação ao TFA pode ser atribuído a medicação anti-hipertensiva, sendo que 58,1% dos voluntários faziam uso de algum tipo de terapia. Além do clássico efeito exercido pelos antagonistas β adrenérgicos na modulação autonômica (FELDMAN et al., 2010), grande parte da terapia anti-hipertensiva utilizada estava relacionada ao antagonismo do sistema renina angiotensina. Classicamente, os estudos têm demonstrado que a angiotensina II pode exercer seus efeitos regulatórios sobre o sistema cardiovascular não apenas na região

periférica, mas também no sistema nervoso central modulando a atividade nervosa simpática, frequência cardíaca, resistência vascular periférica e consequentemente a pressão arterial. Por outro lado, o uso de antagonistas para esse sistema promove efeitos opostos (MOSQUEDA-GARCIA et al., 1990; SASAKI; DAMPNEY, 1990). Esses efeitos regulatórios podem ser em parte justificados pela inibição da resposta regulatória barorreflexa modulada pelas ações da angiotensina II sobre a atividade simpática no núcleo do trato solitário (BOSCAN; ALLEN; PATON, 2001) e na região rostral ventrolateral medial (SAIGUSA et al., 1996).

Além dos controle neural sobre o sistema cardiovascular, diferentes substâncias produzidas, principalmente pelo endotélio, participam dessa regulação tanto em repouso quanto durante o exercício. Em nosso trabalho, nós verificamos alguns biomarcadores do estado redox e cardiovascular para compreender os mecanismos pelos quais o exercício promove mudanças na regulação do sistema cardiovascular. Nosso estudo não conseguiu demonstrar alterações significativas das concentrações de NOx⁻ e do MDA em resposta ao TFA, os quais refletem a produção endógena de óxido nítrico e peroxidação lipídica respectivamente, para os voluntários hipertensos. Estudos em nosso laboratório têm mostrado que o exercício físico promove maior resposta relaxante em diferentes artérias, em modelos animais, que foi positivamente associado com a elevação da concentração de NOx⁻ plasmático (CLAUDINO et al., 2010; de MORAES et al., 2008; DELBIN et al., 2012). No entanto, poucos estudos em seres humanos foram conduzidos buscando analisar essa relação, sendo que alguns demonstraram aumento (MAEDA et al., 2001; ZAROS et al., 2009) outros nenhuma modificação (BRINKLEY et al., 2009; ESPOSTI et al., 2011; HANSEN et al., 2011) das concentrações de NOx⁻ e MDA em resposta ao TFA. Assim, mais estudos precisam ser realizados em seres humanos para se avaliar os mecanismos pelos quais o exercício físico promove redução da pressão arterial.

Com relação as enzimas anti-oxidantes, SOD e catalase, nossos resultados demonstram claramente que o TFA por 24 sessões promoveu aumento da atividade dessas enzimas em voluntários hipertensos. Evidências mostram que apesar do exercício físico promover aumento do stress oxidativo, os efeitos prolongados do treinamento físico tem sido associado com maior atividade anti-oxidante, principalmente em modelos animais (RADAK; CHUNG; GOTO, 2008; RADAK et al.,

2013). Por outro lado, estudos avaliando pacientes hipertensos mostram maior produção de EROs nesses pacientes e demonstram uma associação positiva entre stress oxidativo e disfunção endotelial (CAI; HARRISON, 2000). Nossos achados mostram que o treinamento físico por 24 sessões promoveu aumento das enzimas antioxidantes que foi positivamente associado com redução da pressão arterial diastólica de repouso em pacientes hipertensos, cuja magnitude de redução foi significativamente maior quando comparado aos voluntários normotensos.

Assim, em conjunto nossos resultados mostram que o exercício físico por 24 sessões promoveu efeitos benéficos em ambos os grupos, normotensos e hipertensos e que a maior magnitude de redução da PAD em hipertensos poderia ser devido a maior atividade das enzimas antioxidantes, melhorando o estado redox desses voluntários, uma vez que um dos determinantes para a gênese da hipertensão arterial seria a excessiva produção de EROs. No entanto, deve-se enfatizar que a concentração de MDA não foi alterada entre os grupos, o que nos levaria a hipotetizar que esse biomarcador não reflete o estado redox, ou melhor possui limitações e deve ser analisado com cautela para ser considerado um bom biomarcador. Além disso, os mecanismos relacionados as diferentes repostas para a pressão arterial ambulatorial ainda necessitam ser elucidados.

4.2 PARTE 2

Nas últimas décadas, diversos trabalhos têm buscado compreender, desde as culturas de células até os estudos epidemiológicos, a real influência dos polimorfismos do gene NOS3 sobre a função cardiovascular e mesmo sua associação com as doenças cardiovasculares (CASAS et al., 2006; ZINTZARAS; KITSIOS; STEFANIDIS, 2006). Entretanto, apesar dos esforços, até o presente momento esses dados ainda apresentam-se conflitantes. Trabalho prévio mostrou direta relação entre a presença de polimorfismo para o gene da NOS3 e maior histórico de infarto do miocárdio (WANG et al., 1996), enquanto que outros trabalhos falharam em detectar uma associação entre os polimorfismos do gene NOS3 e a presença de doenças cardiovasculares (CASAS et al., 2006; PEREIRA et al., 2007).

Sabe-se que o TFA promove efeitos benéficos sobre as doenças cardiovasculares tanto em modelos animais como em seres humanos (JOYNER; GREEN, 2009; MORA et al., 2007; THIJSEN; CABLE; GREEN, 2012). Particularmente, são pouco os estudos relacionando a presença de polimorfismo do gene da NOS3 e as respostas cardiovasculares frente ao treinamento físico. De acordo com o nosso conhecimento, existem apenas nove trabalhos nessa temática, sendo que três deste foram feitos em nosso laboratório. Portanto, nosso estudo buscou avaliar se os polimorfismos para as três posições mais estudadas do gene NOS3 poderiam influenciar os clássicos efeitos benéficos do TFA sobre o sistema cardiovascular em adultos de meia idade.

O principal achado de nosso estudo foi que o polimorfismo localizado no íntron 4, caracterizado pelos 27pb repetidos em tandem, influencia a resposta da pressão arterial frente ao TFA enquanto que os polimorfismos localizados nas posições -786T>C e 894G>T não demonstraram nenhuma relação. Entretanto, os biomarcadores utilizados para esse estudo não refletiram essas alterações e assim, os possíveis mecanismos relacionados a essa resposta ainda permanecem a ser explorados.

Com relação às posições -786T>C e 894G>T para o gene da NOS3 e treinamento físico, nosso estudo verificou que o mesmo foi efetivo em promover a redução da pressão arterial auscultatória de repouso independente do genótipo analisado. Em relação a análise ambulatorial da pressão arterial, nossos dados

mostram que os voluntários que apresentavam polimorfismo para a posição 894G>T são mais responsivos ao treinamento físico quando comparados aos não polimórficos. Por outro lado, a medida ambulatorial de 24 horas não detectou qualquer alteração em voluntários com ou sem polimorfismo para a posição -786T>C. De fato, dois estudos mostram que o treinamento físico por seis meses promove redução da pressão arterial em voluntários idosos com polimorfismo para as posições -786T>C e 894G>T, e que esse efeito benéfico foi associado com maior concentração plasmática de NOx⁻ e menor nível de MDA (ZAGO et al., 2010a). De maneira similar, esses mesmos autores ao avaliarem mulheres, verificaram que o TFA por seis meses promove maiores efeitos benéficos nas voluntárias que apresentavam o alelo c para a posição -786 (ZAGO et al., 2010b). Assim, diferentemente da resposta observada em camundongos, onde é necessário os dois alelos do gene NOS3 para uma efetiva resposta ao treinamento físico (DE WAARD et al., 2010; KODJA et al., 2001), em seres humanos essa associação apresenta-se muito mais complexa, mostrando inclusive que em alguns casos a resposta benéfica do treinamento físico é maior em indivíduos com polimorfismo ou que essa resposta ocorre independente de genótipo (NEGRÃO et al., 2010).

Por outro lado, trabalho pioneiro na área mostrou que o treinamento físico por 20 semanas não promove redução de pressão arterial durante o repouso em jovens, por outro lado, quando avaliados durante uma sessão de exercício aeróbico em intensidades submáximas, os jovens que apresentavam o alelo polimórfico para a posição 894G>T tinham menor redução de pressão arterial sistólica e diastólica em comparação àqueles que não apresentavam esse alelo (RANKINEN et al., 2000). Além disso, outro trabalho avaliando pacientes com doença arterial coronariana mostrou que os indivíduos polimórficos para as posições -786T>C ou 894G>T apresentavam atenuada resposta relaxante dependente do endotélio quando comparada aos seus congêneres não polimórficos. Entretanto, quando submetidos ao TFA por 4 semanas, esses autores verificaram que a atenuação dessa resposta era verificada apenas para os pacientes polimórficos para a posição -786T>C, não sendo observada nenhuma alteração para a posição 894G>T (ERBS, 2003).

Em nosso laboratório, estudo prévio mostrou que o TFA por seis meses em mulheres após a menopausa promoveu maior redução nos valores de pressão arterial sistólica e diastólica concomitante com maior concentração de NOx⁻ em

voluntárias sem o polimorfismo para a posição -786T>C, mostrando que a presença desse polimorfismo atenua os efeitos benéficos do treinamento físico nas respostas pressóricas (SPONTON et al., 2010). Entretanto, para a posição 894G>T verificamos que essas respostas foram genótipo independentes (REZENDE et al., 2011). Além disso, outro recente estudo do nosso grupo falhou em verificar a influência da associação entre esses polimorfismos sobre as respostas da pressão arterial em mulheres após a menopausa submetidas ao treinamento físico (ESPOSTI et al., 2011).

Assim, em conjunto os achados do nosso estudo mostram que a redução dos valores de pressão arterial em resposta ao TFA não estão associadas à presença do polimorfismo do gene NOS3 para as posições -786T>C e 894G>T. Por outro lado, a avaliação da pressão arterial ambulatorial mostra que a redução da pressão arterial em resposta ao treinamento físico ocorre em voluntários com polimorfismo para a posição 894G>T.

Com relação a posição íntron 4b/a do gene da NOS3, nosso trabalho demonstra claramente que a presença de polimorfismo (genótipo ab+aa) afeta os efeitos benéficos do treinamento físico avaliados tanto para a pressão auscultatória quanto durante 24 horas. De acordo com o nosso conhecimento, somente um trabalho existe avaliando a influência do polimorfismo para a posição íntron 4b/a sobre os parâmetros cardiovasculares, onde verificou-se que o treinamento físico por dois meses promoveu redução da pressão arterial independente desse genótipo em mulheres após a menopausa (ESPOSTI et al., 2011). Entretanto, essas respostas ainda permanecem inconclusivas.

Um possível mecanismo pelo qual a presença do polimorfismo do íntron 4 afetaria a resposta pressórica seria que o genótipo íntron 4ab+aa atuaria como um microRNA (27nt), “reduzindo” a transcrição do gene da NOS3 afetando a síntese da enzima eNOS, o que levaria a menor vasodilatação em resposta ao treinamento físico. De fato, estudo prévio demonstrou em células endoteliais aórticas de humanos, que a repetição de 27 pb do íntron 4 é capaz de reduzir a expressão gênica da enzima eNOS (ZHANG et al., 2005). Além disso, posteriormente esses autores demonstraram que esse microRNA suprime a expressão gênica da eNOS por alterar a acetilação das histonas e a metilação do DNA em regiões próximas à região promotora (ZHANG et al., 2008). No entanto, é preciso salientar que essas

análises mecanicistas não foram realizadas no presente estudo e que nossos biomarcadores falharam em mostrar qualquer alteração na produção de óxido nítrico medido indiretamente pela concentração de NOx^- .

4.3 PARTE 3

Recentemente, estudos têm demonstrado que a análise dos haplótipos pode ser considerada como um método mais aprimorado para os estudos que visam associar determinadas alterações polimórficas com as doenças cardiovasculares (SANDRIM et al., 2006, 2007). No entanto, são poucos os estudos que analisaram a associação entre os haplótipos para o gene NOS3 em humanos e doenças cardiovasculares existindo nesse momento apenas cinco trabalhos publicados dentro dessa temática. Além disso, não existe um consenso em relação a tríade de haplotipos relacionados às posições -786, 894 e íntron 4 do gene da NOS3 e os efeitos benéficos ou deletérios para as doenças cardiovasculares. De fato, Sandrim et al., 2006 verificaram que o haplótipo “C Glu b” da associação -786, 894 e íntron 4 exibiria um efeito protetor para o desenvolvimento da hipertensão arterial em pacientes com diabetes do tipo 2. Além disso, outros trabalhos do mesmo grupo demonstraram que além do efeito protetor apresentado por esse grupo haplotípico, o mesmo estava relacionado a maior concentração de NOx⁻ nos pacientes analisados (METZGER; SERTÓRIO; TANUS-SANTOS, 2007; SANDRIM et al., 2007).

De acordo com o nosso conhecimento, até o presente momento nenhum trabalho buscou avaliar a influência dos haplótipos relacionados aos polimorfismos do gene NOS3 sobre o sistema cardiovascular em indivíduos submetidos ao TFA. Nossos dados mostraram que três grupos haplotípicos (TGb; TTb e CTb) apresentaram melhores respostas ao treinamento físico tanto para a pressão arterial de repouso quanto para a pressão arterial ambulatorial, enquanto que os grupos TGa e CGb apresentam atenuada resposta de redução para ambas as análises realizadas. Assim, parece-nos que as tríades contendo TGb, TTb e CTb são mais responsivas aos efeitos benéficos do TFA na população estudada. Entretanto, os resultados dos nossos biomarcadores não são conclusivos para essas diferenças. Dessa forma, outros estudos são necessários para avaliar as possíveis interferências desses haplótipos sobre as respostas cardiovasculares em adultos de meia idade.

5. CONCLUSÃO

O polimorfismo localizado no íntron 4, assim como os haplótipos TGa e CGb inibem a reposta de redução da pressão arterial frente ao TFA em adultos de meia idade, apesar dos mecanismos ainda não serem conhecidos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMO, L.; NAVEIRAS, O.; WENZEL, P.L.; MCKINNEY-FREEMAN, S.; MACK, P.J.; GRACIA-SANCHO, J.; SUCHY-DICEY, A.; YOSHIMOTO, M.; LENSCH, M.W.; YODER, M.C.; GARCÍA-CARDEÑA, G.; DALEY, G.Q. Biomechanical forces promote embryonic haematopoiesis. *Nature*, v. 459, n. 7250, p. 1131–5, 25 jun. 2009.
- ANDRIKOPOULOS, G. K. et al. Association of the 894G>T polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with risk of acute myocardial infarction. *BMC medical genetics*, v. 9, p. 43, jan. 2008.
- 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. e28–34, jun. 2009.
- BALASUBRAMANIAN, S.P.; COX, A.; BROWN, N.J.; REED, M.W. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. *European journal of surgical oncology: the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, v. 30, n. 6, p. 593–601, ago. 2004.
- BENEKE, R. Methodological aspects of maximal lactate steady state-implications for performance testing. *European journal of applied physiology*, v. 89, n. 1, p. 95–9, mar. 2003.
- BENEKE, R.; HÜTLER, M.; LEITHÄUSER, R. M. Maximal lactate-steady-state independent of performance. *Medicine and science in sports and exercise*, v. 32, n. 6, p. 1135–9, jun. 2000.
- BLUMENTHAL J.A.; SHERWOOD, A.; GULLETTE, E.C.; BABYAK, M., WAUGH, R.; GEORGIADES, A.; CRAIGHEAD, L.W.; TWEEDY, D. FEINGLOS, M.; APPELBAUM, M.; HAYANO, J.; HINDERLITER, A. Exercise and weight loss reduce blood pressure in men and women with mild hypertension: effects on cardiovascular, metabolic, and hemodynamic functioning. *Archives of Internal Medicine*. v.10, n.160(13), p.1947 - 58, 2000.
- BORG G. Borg's Perceived Exertion and Pain Scales. Champaign (IL): Human Kinetics; 1998.

- BOSCAN, P.; ALLEN, A M.; PATON, J. F. Baroreflex inhibition of cardiac sympathetic outflow is attenuated by angiotensin II in the nucleus of the solitary tract. *Neuroscience*, v. 103, n. 1, p. 153–60, jan. 2001.
- BRINKLEY, T.E.; FENTY-STEWART, N.M.; PARK, J.Y.; BROWN, M.D.; HAGBERG, J.M. Plasma nitrate/nitrite levels are unchanged after long-term aerobic exercise training in older adults. *Nitric oxide: biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*, v. 21, n. 3-4, p. 234–8, 2009.
- CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. *Circulation Research*, v. 87, n. 10, p. 840–844, 10 nov. 2000.
- CARDOSO, C.G. JR.; ROSAS, F.C.; ONEDA, B.; LABES, E.; TINUCCI, T.; ABRAHÃO, S.B.; DA FONSECA, A.M.; MION, D. JR.; FORJAZ, C.L. Aerobic training abolishes ambulatory blood pressure increase induced by estrogen therapy: a double blind randomized clinical trial. *Maturitas*, v. 69, n. 2, p. 189–94, jun. 2011.
- CARTER, J. B.; BANISTER, E. W.; BLABER, A. P. Effect of endurance exercise on autonomic control of heart rate. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, v. 33, n. 1, p. 33–46, jan. 2003.
- 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. *American journal of epidemiology*, v. 164, n. 10, p. 921–35, 15 nov. 2006.
- CHEN, A.F.; CHEN, D.D.; DAIBER, A.; FARACI, F.M.; LI, H.; REMBOLD, C.M.; LAHER, I. Free radical biology of the cardiovascular system. *Clinical science (London, England: 1979)*, v. 123, n. 2, p. 73–91, jul. 2012.
- CHOBANIAN AV, BAKRIS GL, BLACK HR, CUSHMAN WC, GREEN LA, IZZO JL JR, JONES DW, MATERSON BJ, OPARIL S, WRIGHT JT JR, ROCCELLA EJ; Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*. 2003 Dec;42(6):1206-52.
- CLAUDINO, M.A.; FRANCO-PENTEADO, C.F.; PRIVIERO, F.B.; CAMARGO, E.A.; TEIXEIRA, S.A.; MUSCARÁ, M.N.; DE NUCCI, G.; ZANESCO, A.; ANTUNES, E.

Upregulation of gp91phox subunit of NAD(P)H oxidase contributes to erectile dysfunction caused by long-term nitric oxide inhibition in rats: reversion by regular physical training. *Urology*, v. 75, n. 4, p. 961–7, abr. 2010.

COFFMAN, T. M. Under pressure: the search for the essential mechanisms of hypertension. *Nature medicine*, v. 17, n. 11, p. 1402–9, jan. 2011.

CORNELISSEN, V.A.; ARNOUT, J.; HOLVOET, P.; FAGARD, R.H. Influence of exercise at lower and higher intensity on blood pressure and cardiovascular risk factors at older age. *Journal of hypertension*, v. 27, n. 4, p. 753–62, abr. 2009.

CORNELISSEN, V. A; BUYS, R.; SMART, N. A. Endurance exercise beneficially affects ambulatory blood pressure: a systematic review and meta-analysis. *Journal of hypertension*, v. 31, n. 4, p. 639–48, abr. 2013.

CORNELISSEN, V. A; FAGARD, R. H. Effects of endurance training on blood pressure, blood pressure-regulating mechanisms, and cardiovascular risk factors. *Hypertension*, v. 46, n. 4, p. 667–75, out. 2005.

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 physiology*, v. 8, p. 12, jan. 2008.

DENNINGER, J.W.; MARLETTA M. A, Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta*. May 5;1411(2-3):334-50, 1999.

DE WAARD, M.C.; VAN HAPEREN, R.; SOULLIÉ, T.; TEMPEL, D.; DE CROM, R.; DUNCKER, D.J. Beneficial effects of exercise training after myocardial infarction require full eNOS expression. *Journal of molecular and cellular cardiology*, v. 48, n. 6, p. 1041–9, jun. 2010.

DELBIN, M.A.; DAVEL, A.P.; COUTO, G.K.; DE ARAÚJO, G.G.; ROSSONI, L.V.; ANTUNES, E.; ZANESCO. A. Interaction between advanced glycation end products formation and vascular responses in femoral and coronary arteries from exercised diabetic rats. *PloS one*, v. 7, n. 12, p. e53318, jan. 2012.

DENGEL, D.R.; BROWN, M.D.; FERRELL, R.E.; REYNOLDS, T.H.; SUPIANO, M.A. A preliminary study on T-786C endothelial nitric oxide synthase gene and renal hemodynamic and blood pressure responses to dietary sodium. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, v. 56, n. 4, p. 393–401, jan. 2007.

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* 53, 299-302, 2006.

ERBS, S. Promoter but Not Exon 7 Polymorphism of Endothelial Nitric Oxide Synthase Affects Training-Induced Correction of Endothelial Dysfunction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 23, n. 10, p. 1814–1819, 28 ago. 2003.

ESPOSTI, R.D.; SPONTON, C.H.; MALAGRINO, P.A.; CARVALHO, F.C.; PERES, E.; PUGA, G.M.; NOVAIS, I.P.; ALBUQUERQUE, D.M.; RODOVALHO, C.; BACCI, M.; ZANESCO, A. Influence of eNOS gene polymorphism on cardiometabolic parameters in response to physical training in postmenopausal women. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 44, n. 9, p. 855–863, set. 2011.

FAGARD, R. H. Exercise is good for your blood pressure: effects of endurance training and resistance training. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, v. 33, n. 9, p. 853–6, set. 2006.

FAGARD, R. H.; CORNELISSEN, V. A. Effect of exercise on blood pressure control in hypertensive patients. *European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation: official journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology*, v. 14, n. 1, p. 12–7, fev. 2007.

FAIRCHILD, T.A.; FULTON, D.; FONTANA, J.T.; GRATTON, J.P.; MCCABE, T.J.; SESSA, W.C.; Acidic hydrolysis as a mechanism for the cleavage of the Glu(298)-->Asp variant of human endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. v. 13, n. 276(28), p. 2674-2679, jul. 2001.

FELDMAN, D.; ELTON, T.S.; MENACHEMI, D.M.; WEXLER, R.K. Heart rate control with adrenergic blockade: Clinical outcomes in cardiovascular medicine. *Vasc Health Risk Manag*. v.6 p. 387–397, 2010.

FÉLÉTOU, M.; KÖHLER, R.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived vasoactive factors and hypertension: possible roles in pathogenesis and as treatment targets *Current Hypertension Reports*, v. 12, n. 4, p. 267–75, ago. 2010.

GARDEMANN, A. et al. The T allele of the missense Glu(298)Asp endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with coronary heart disease in

younger individuals with high atherosclerotic risk profile. *Atherosclerosis*, v. 160, n. 1, p. 167–75, jan. 2002.

GUIMARÃES, G.V.; CIOLAC, E.G.; CARVALHO, V.O.; D'AVILA, V.M.; BORTOLOTTI, L.A.; BOCCHI, E.A. Effects of continuous vs. interval exercise training on blood pressure and arterial stiffness in treated hypertension. *Hypertension Research*. v.33(6), p. 627-32, 2010.

GUO, Y.; TOMLINSON, B.; CHU, T.; FANG, Y.J.; GUI, H.; TANG, C.S.; YIP, B.H.; CHERNY, S.S.; HUR, Y.M.; SHAM, P.C.; LAM, T.H.; THOMAS, N.G. A genome-wide linkage and association scan reveals novel loci for hypertension and blood pressure traits. *PloS One*, v. 7, n. 2, p. e31489, jan. 2012.

HANSEN, A.H.; NYBERG, M.; BANGSBO, J.; SALTIN, B.; HELLSTEN, Y. Exercise training alters the balance between vasoactive compounds in skeletal muscle of individuals with essential hypertension. *Hypertension*, v. 58, n. 5, p. 943–9, nov. 2011.

HASKELL, W.L.; LEE, I.M.; PATE, R.R.; POWELL, K.E.; BLAIR, S.N.; FRANKLIN, B.A.; MACERA, C.A.; HEATH, G.W.; THOMPSON, P.D.; BAUMAN, A. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Circulation*, v. 116, n. 9, p. 1081–93, 28 ago. 2007.

HAUTALA, A. J.; KIVINIEMI, A. M.; TULPPO, M. P. Individual responses to aerobic exercise: the role of the autonomic nervous system. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, v. 33, n. 2, p. 107–15, fev. 2009.

HERMIDA, R.C.; SMOLENSKY, M.H.; AYALA, D.E.; PORTALUPPI, F.; CRESPO, J.J.; FABBIAN, F.; HAUS, E.; MANFREDINI, R.; MOJÓN, A.; MOYÁ, A.; PIÑEIRO, L.; RÍOS, M.T.; OTERO, A.; BALAN, H.; FERNÁNDEZ, J.R. Ambulatory Blood Pressure Monitoring Recommendations for the Diagnosis of Adult Hypertension, Assessment of Cardiovascular and Other Hypertension-Associated Risk, and Attainment of Therapeutic Goals. *Clin Investig Arterioscler* v. 30 p. 355–410, 2013.

HEYWARD, V.H. & STOLARCZYK, L.M. Avaliação da composição corporal aplicada. São Paulo: Manole, 2000. 242 p. HIBI, K.; ISHIGAMI, T.; TAMURA, K. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension*. v.32, p.521–6, 1998.

- HIGASHI, Y.; YOSHIKUMI, M. Exercise and endothelial function: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. *Pharmacology & therapeutics*, v. 102, n. 1, p. 87–96, abr. 2004.
- HINGORANI, A.D.; LIANG, C.F.; FATIBENE, J.; LYON, A.; MONTEITH, S.; PARSONS, A.; HAYDOCK, S.; HOPPER, R.V.; STEPHENS, N.G.; O'SHAUGHNESSY, K.M.; BROWN, M.J. A Common Variant of the Endothelial Nitric Oxide Synthase (Glu298->Asp) Is a Major Risk Factor for Coronary Artery Disease in the UK. *Circulation*, v. 100, n. 14, p. 1515–1520, 5 out. 1999.
- HINGORANI, A.D. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis: John French Lecture 2000. *Atherosclerosis*. Feb 15,154(3),521-527, 2001
- HYNDMAN, M. E. The T-786->C Mutation in Endothelial Nitric Oxide Synthase Is Associated With Hypertension. *Hypertension*, v. 39, n. 4, p. 919–922, 1 abr. 2002.
- 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 U S A*, v. 84, n. 24, p. 9265-9, dec. 1987.
- JEEROOBURKHAN, N.; JONES, L.C.; BUJAC, S.; COOPER, J.A.; MILLER, G.J.; VALLANCE, P.; HUMPHRIES, S.E.; HINGORANI, A.D. Genetic and Environmental Determinants of Plasma Nitrogen Oxides and Risk of Ischemic Heart Disease. *Hypertension*, v. 38, n. 5, p. 1054–1061, 1 nov. 2001.
- JENKINS DC, CHARLES IG, THOMSEN LL, MOSS DW, HOLMES LS, BAYLIS SA, RHODES P, WESTMORE K, EMSON PC, MONCADA S. Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 May 9;92(10):4392-6.
- JOYNER, M. J.; GREEN, D. J. Exercise protects the cardiovascular system: effects beyond traditional risk factors. *The Journal of physiology*, v. 587, n. Pt 23, p. 5551–8, 1 dez. 2009.
- KEARNEY, P.M.; WHELTON, M.; REYNOLDS, K.; MUNTNER, P.; WHELTON, P.K.; HE, J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*, v. 365, n. 9455, p. 217–23, 2005.
- KELLEY, G. A; KELLEY, K. A; TRAN, Z. V. Aerobic exercise and resting blood pressure: a meta-analytic review of randomized, controlled trials. *Preventive cardiology*, v. 4, n. 2, p. 73–80, jan. 2001.

- KENNEY, M. J.; SEALS, D. R. Brief Review Postexercise Hypotension. *Hypertension*, v.22, n.5, p.635-664, 1993.
- KIM, I.J.; BAE, J.; LIM, S.W.; CHA, D.H.; CHO, H.J.; KIM, S.; YANG, D.H.; HWANG, S.G.; OH, D.; KIM, N.K. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (-786T>C, 4a4b, 894G>T) in Korean patients with coronary artery disease. *Thrombosis research*, v. 119, n. 5, p. 579–85, jan. 2007.
- KIMURA, T. NOS3 Genotype-Dependent Correlation Between Blood Pressure and Physical Activity. *Hypertension*, v. 41, n. 2, p. 355–360, 20 jan. 2003.
- KINGWELL, B. A. Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and. *FASEB J*, v. 14, p. 1685–1696, 2000.
- KLINE G.M.; PORCARI J.P.; HINTERMEISTER R.; FREEDSON P.S.; WARD A.; MCCARRON R.F.; ROSS J.; RIPPE J.M. Estimation of VO₂max from a one-mile track walk, gender, age, and body weight. *Medicine Science Sports Exercise*. v. 19(3), p. 253-9, 1987.
- KOJDA, G.; CHENG, Y.C.; BURCHFIELD, J.; HARRISON, D.G. Dysfunctional Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Expression in Response to Exercise in Mice Lacking One eNOS Gene. *Circulation*, v. 103, n. 23, p. 2839–2844, 12 jun. 2001.
- KOJDA, G.; HAMBRECHT, R. Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? *Cardiovascular research*, v. 67, n. 2, p. 187–97, 1 ago. 2005.
- 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, n. 6, p. 1298–306, jun. 2007.
- LAWES, C. M. M.; VANDER HOORN, S.; RODGERS, A. Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. *Lancet*, v. 371, n. 9623, p. 1513–8, 3 maio. 2008.
- MAEDA, S.; MIYAUCHI, T.; KAKIYAMA, T.; SUGAWARA, J.; IEMITSU, M.; IRUKAYAMA-TOMOBE, Y.; MURAKAMI, H.; KUMAGAI, Y.; KUNO, S.; MATSUDA, M. Effects of exercise training of 8 weeks and detraining on plasma levels of endothelium-derived factors, endothelin-1 and nitric oxide, in healthy young humans. *Life sciences*, v. 69, n. 9, p. 1005–16, 20 jul. 2001.

- MANCIA et al. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* v.34, n.28, p. 2159-219, 2013.
- 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 chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *Journal of Biological Chemical.* v.268, p.17478-17488, 1993
- MCARDLE, W.D.; KATCH, F.I.; KATCH, V.L. *Exercise Physiology: Nutrition, Energy, and Human Performance.* Seventh Edition 2010, Lippincott Williams & Wilkins, Inc, Philadelphia, USA.
- MESSERLI, F. H.; WILLIAMS, B.; RITZ, E. Essential hypertension. *Lancet*, v. 370, n. 9587, p. 591–603, 18 ago. 2007.
- METZGER, I. F.; SERTÓRIO, J. T. C.; TANUS-SANTOS, J. E. Modulation of nitric oxide formation by endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes. *Free radical biology & medicine*, v. 43, n. 6, p. 987–92, 15 set. 2007.
- MICHEL, T.; VANHOUTTE, P. M. Cellular signaling and NO production. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, v. 459, n. 6, p. 807–16, maio. 2010.
- 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, n. 1, p. 3–8, 1 jul. 1998.
- MIYAMOTO, Y.; SAITO, Y.; NAKAYAMA, M.; SHIMASAKI, Y.; YOSHIMURA, T.; YOSHIMURA, M.; HARADA, M.; KAJIYAMA, N.; KISHIMOTO, I.; KUWAHARA, K.; HINO, J.; OGAWA, E.; HAMANAKA, I.; KAMITANI, S.; TAKAHASHI, N.; KAWAKAMI, R.; KANGAWA, K.; YASUE, H.; NAKAO, K. Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T-->C mutation associated with coronary spastic angina. *Human molecular genetics*, v. 9, n. 18, p. 2629–37, 1 nov. 2000.

- MOMBOULI, J.; VANHOUTTE, P. M. Endothelial Dysfunction : a Novel Therapeutic Target Endothelial Dysfunction : From Physiology to Therapy. v. 74, p. 61–74, 1999.
- MONCADA, S. Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 811, p. 60–7; discussion 67–9, 15 abr. 1997.
- MORA, S.; COOK, N.; BURING, J.E.; RIDKER, P.M.; LEE, I.M. Physical activity and reduced risk of cardiovascular events: potential mediating mechanisms. *Circulation*, v. 116, n. 19, p. 2110–8, 6 nov. 2007.
- MOSQUEDA-GARCIA, R.; TSENG, C.J.; APPALSAMY, M.; ROBERTSON, D. Cardiovascular effects of microinjection of angiotensin II in the brainstem of renal hypertensive rats. *Journal of Pharmacology Experimental Therapy*. v.255(1), p.374-81, 1990.
- 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, n. 22, p. 2864–2870, 8 jun. 1999.
- NEGRAO, M.V.; ALVES, C.R.; ALVES, G.B.; PEREIRA, A.C.; DIAS, R.G.; LATERZA, M.C.; MOTA, G.F.; OLIVEIRA, E.M.; BASSANEZE, V.; KRIEGER, J.E.; NEGRAO, C.E.; RONDON, M.U. Exercise training improves muscle vasodilatation in individuals with T786C polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene. *Physiological genomics*, v. 42A, n. 1, p. 71–7, set. 2010.
- NOBRE, F. et al. VI Diretrizes brasileiras de hipertensão. *Revista Brasileira de Hipertensão*, v. 17, n. 1, p. 1-64, 2010.
- PACHER P, BECKMAN JS, LIAUDET L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease _*Physiol Rev*. 2007 Jan;87(1):315-424.
- PARAVICINI, T. M.; TOUYZ, R. M. Redox signaling in hypertension. *Cardiovascular research*, v. 71, n. 2, p. 247–58, 15 jul. 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, fev. 2008.

PATTYN, N.; CORNELISSEN, V.A.; ESHGHI, S.R.; VANHEES, L. The effect of exercise on the cardiovascular risk factors constituting the metabolic syndrome: a meta-analysis of controlled trials. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, v. 43, n. 2, p. 121–33, fev. 2013.

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. *Journal of hypertension*, v. 25, n. 9, p. 1763–74, set. 2007.

PERSU, A.; STOENIU, M.S.; MESSIAEN, T.; DAVILA, S.; ROBINO, C.; EL-KHATTABI, O.; MOURAD, M.; HORIE, S.; FERON, O.; BALLIGAND, J.L.; WATTIEZ, R.; PIRSON, Y.; CHAUVEAU, D.; LENS, X.M.; DEVUYST, O. Modifier effect of ENOS in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Human molecular genetics*, v. 11, n. 3, p. 229–41, 1 fev. 2002.

PESCATELLO, L.S.; FRANKLIN, B.A.; FAGARD, R.; FARQUHAR, W.B.; KELLEY, G.A.; RAY, C.A. Exercise and Hypertension. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, v. 36, n. 3, p. 533–553, mar. 2004.

PICON RV, FUCHS FD, MOREIRA LB, RIEGEL G, FUCHS SC. Trends in prevalence of hypertension in Brazil: a systematic review with meta-analysis. *PLoS One*. 2012;7(10):e48255.

POBER, D.M.; FREEDSON, P.S.; KLINE, G.M.; MCINNIS, K.J.; RIPPE, J.M. Development and validation of a one-mile treadmill walk test to predict peak oxygen uptake in healthy adults ages 40 to 79 years. *Canadian journal of applied physiology = Revue canadienne de physiologie appliquée*, v. 27, n. 6, p. 575–89, dez. 2002.

RADAK, Z.; KOLTAI, E.; TAYLOR, A.W.; HIGUCHI, M.; KUMAGAI, S.; OHNO, H.; GOTO, S.; BOLDOGH, I. Redox-regulating sirtuins in aging, caloric restriction, and exercise. *Free radical biology & medicine*, v. 58, p. 87–97, maio. 2013.

RADAK, Z.; CHUNG, H. Y.; GOTO, S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free radical biology & medicine*, v. 44, n. 2, p. 153–9, 15 jan. 2008.

RANKINEN, T.; RICE, T.; PÉRUSSE, L.; CHAGNON, 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, n. 5, p. 885–889, 1 nov. 2000.
- REZENDE, T.M.; SPONTON, C.H.; MALAGRINO, P.A.; BEZERRA, M.A.; PENTEADO, C.F.; ZANESCO, A. Effect of exercise training on the cardiovascular and biochemical parameters in women with eNOS gene polymorphism. *Archives of physiology and biochemistry*, v. 117, n. 5, p. 265–9, dez. 2011.
- ROBERTS, C. K.; SINDHU, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life sciences*, v. 84, n. 21-22, p. 705–12, 22 maio. 2009.
- SAIGUSA, T.; IRIKI, M.; ARITA, J. Brain angiotensin II tonically modulates sympathetic baroreflex in rabbit ventrolateral medulla. *American Journal of Physiology*. n.271(3 Pt 2), p.H1015-21, 1996.
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. *Biotechnology (Reading, Mass.)*, v. 24, p. 476–80, jan. 1992.
- SANDERCOCK, G. R. H.; BROMLEY, P. D.; BRODIE, D. A. The reliability of short-term measurements of heart rate variability. *International journal of cardiology*, v. 103, n. 3, p. 238–47, 1 set. 2005.
- SANDRIM, V.C.; DE SYLLOS, R.W.; LISBOA, H.R.; TRES, G.S.; TANUS-SANTOS, J.E. Endothelial nitric oxide synthase haplotypes affect the susceptibility to hypertension in patients with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis*, v. 189, n. 1, p. 241–6, nov. 2006.
- 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 : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*, v. 16, n. 3, p. 348–55, maio. 2007.
- SASAKI, S.; DAMPNEY, R. A. Tonic cardiovascular effects of angiotensin II in the ventrolateral medulla. *Hypertension*, v. 15, n. 3, p. 274–283, 1 mar. 1990.
- SCALVINI S, VOLTERRANI M, ZANELLI E, PAGANI M, MAZZUERO G, COATS AJ, GIORDANO A. Is heart rate variability a reliable method to assess autonomic

modulation in left ventricular dysfunction and heart failure? Assessment of autonomic modulation with heart rate variability. *Int J Cardiol.* 1998 Nov 30;67(1):9-17.

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. *Circulation Research*, v. 74, n. 2, p. 349–353, 1 fev. 1994.

SHIMASAKI, Y.; YASUE, H.; YOSHIMURA, M.; NAKAYAMA, M.; KUGIYAMA, K.; OGAWA, H.; HARADA, E.; MASUDA, T.; KOYAMA, W.; SAITO, Y.; MIYAMOTO, Y.; OGAWA, Y.; NAKAO, K. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 31, n. 7, p. 1506–10, jun. 1998.

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. *European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation : official journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology*, v. 17, n. 6, p. 676–81, dez. 2010.

SPOTO, B.; BENEDETTO, F.A.; TESTA, A.; TRIPEPI, G.; MALLAMACI, F.; MAAS, R.; BOEGER, R.H.; ZOCCALI, C. An additive effect of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms contributes to the severity of atherosclerosis in patients on dialysis. *American journal of hypertension*, v. 20, n. 7, p. 758–63, jul. 2007.

WANG M, JIANG X, WU W, ZHANG D. Endothelial NO synthase gene polymorphisms and risk of ischemic stroke in Asian population: a meta-analysis. *PLoS One*.2013;8(3):e60472.

TESAURO, M.; THOMPSON, W.C.; ROGLIANI, P.; QI, L.; CHAUDHARY, P.P.; MOSS, J. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, n. 6, p. 2832–5, 14 mar. 2000.

- THIJSSSEN, D. H. J.; CABLE, N. T.; GREEN, D. J. Impact of exercise training on arterial wall thickness in humans. *Clinical science (London, England : 1979)*, v. 122, n. 7, p. 311–22, abr. 2012.
- TSUKADA, T.; YOKOYAMA, K.; ARAI, T.; TAKEMOTO, F.; HARA, S.; YAMADA, A.; KAWAGUCHI, Y.; HOSOYA, T.; IGARI, J. Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 245, n. 1, p. 190–3, 7 abr. 1998.
- TZIMA, E.; IRANI-TEHRANI, M.; KIOSSES, W.B.; DEJANA, E.; SCHULTZ, D.A.; ENGELHARDT, B.; CAO, G.; DELISSER, H.; SCHWARTZ, M.A. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature*, v. 437, n. 7057, p. 426–31, 15 set. 2005.
- VANHOUTTE, P. M. Endothelial control of vasomotor function: from health to coronary disease. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*, v. 67, n. 7, p. 572–5, jul. 2003.
- WAIB, P. H.; GONÇALVES, M. I.; BARRILE, S. R. Improvements in insulin sensitivity and muscle blood flow in aerobic-trained overweight-obese hypertensive patients are not associated with ambulatory blood pressure. *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn.)*, v. 13, n. 2, p. 89–96, fev. 2011.
- WANG, X.L.; SIM, A.S.; BADENHOP, R.F.; McCREDIE, R.M.; WILCKEN, D.E. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nature Medicine*. v.2: p.41-45, 1996
- WANG, X.L.; WANG J. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Sequence Variations and Vascular Disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 70, 241-251, 2000.
- WANG, X.; PRINS, B.P.; SÖBER, S.; LAAN, M.; SNIEDER, H. Beyond genome-wide association studies: new strategies for identifying genetic determinants of hypertension. *Current hypertension reports*, v. 13, n. 6, p. 442–51, dez. 2011.
- WIDRICK, J.; WARD, A.; EBBELING, C.; CLEMENTE, E.; RIPPE, J.M. Treadmill validation of an over-ground walking test to predict peak oxygen consumption. *Eur Journal of Applied Physiology Occupational Physiology*. v.64(4), p.304-8, 1992.
- YOON, Y.; SONG, J.; HONG, S.H.; KIM, J.Q.; Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease. *Clin Chem*. Oct 46(10),1626-1630, 2000.

ZAGO AS, KOKUBUN E, FENTY-STEWART N, PARK JY, ATTIPOE S, HAGBERG J, BROWN M. Original Article Effect of Physical Activity and T-786C Polymorphism in Blood Pressure and Blood Flow in the Elderly. *Arq Bras Cardiol*. V. 95, n.4, p. 510–517, 2010.

ZAGO, A.S.; PARK, J.Y.; FENTY-STEWART, N.; KOKUBUN, E.; BROWN, M.D. Effects of aerobic exercise on the blood pressure, oxidative stress and eNOS gene polymorphism in pre-hypertensive older people. *European journal of applied physiology*, v. 110, n. 4, p. 825–32, nov. 2010.

ZANCHI, A.; MOCZULSKI, D.K.; HANNA, L.S.; WANTMAN, M.; WARRAM, J.H.; KROLEWSKI, A.S. Risk of advanced diabetic nephropathy in type 1 diabetes is associated with endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Kidney international*, v. 57, n. 2, p. 405–13, fev. 2000.

ZANESCO, A.; ANTUNES, E. Effects of exercise training on the cardiovascular system: pharmacological approaches. *Pharmacology & therapeutics*, v. 114, n. 3, p. 307–17, jun. 2007.

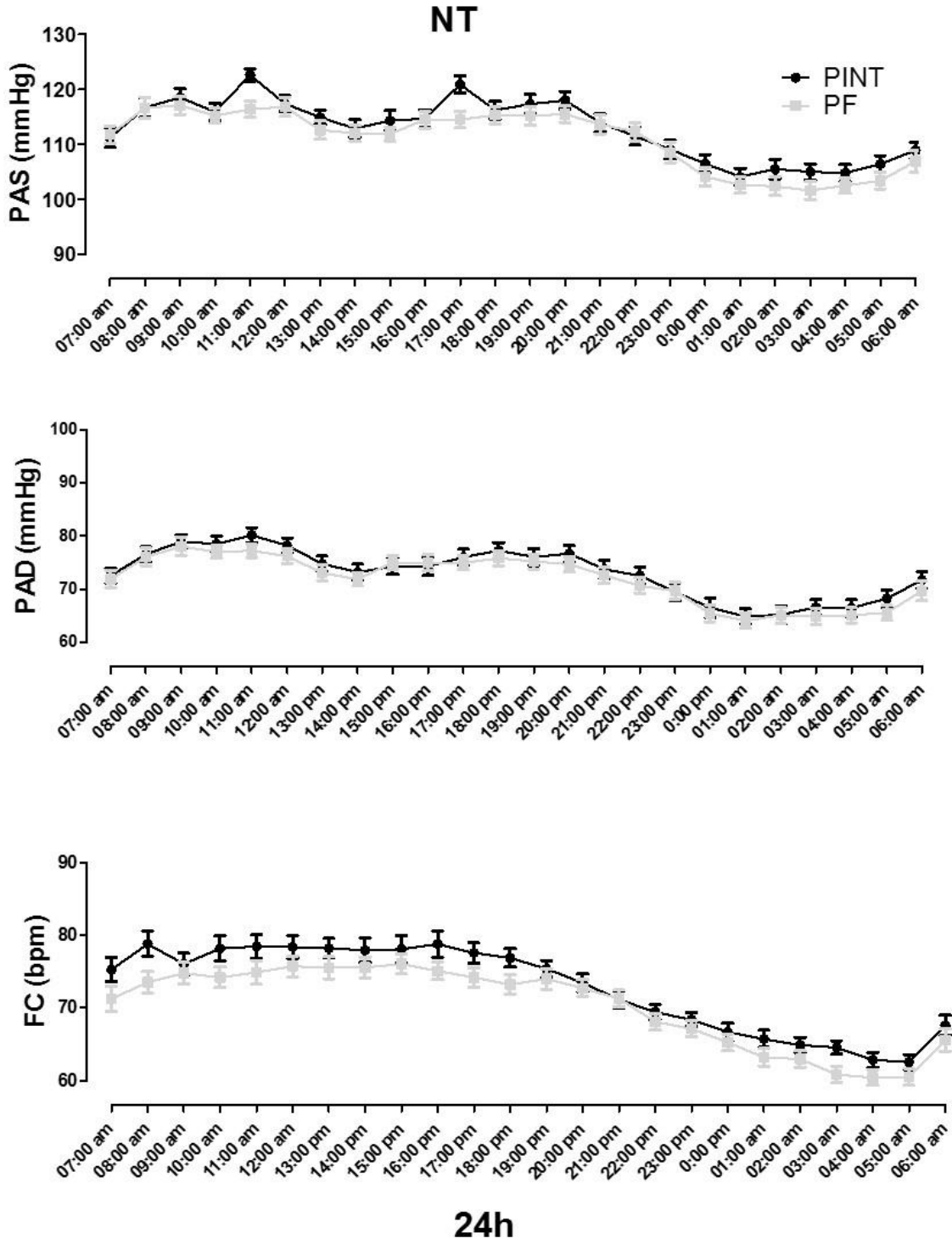
ZAROS, P.R.; PIRES, C.E.; BACCI M, JR.; MORAES, C.; ZANESCO, A. Effect of 6-months of physical exercise on the nitrate / nitrite levels in hypertensive postmenopausal women. *BMC Women ' s Health* v. 5, p. 1–5, 2009.

ZHANG, M.X.; ZHANG, C.; SHEN, Y.H.; WANG, J.; LI, X.N.; CHEN, L.; ZHANG, Y.; COSELLI, J.S.; WANG, X.L. Effect of 27nt Small RNA on Endothelial Nitric-Oxide Synthase Expression. v. 19, n. September, p. 3997–4005, 2008.

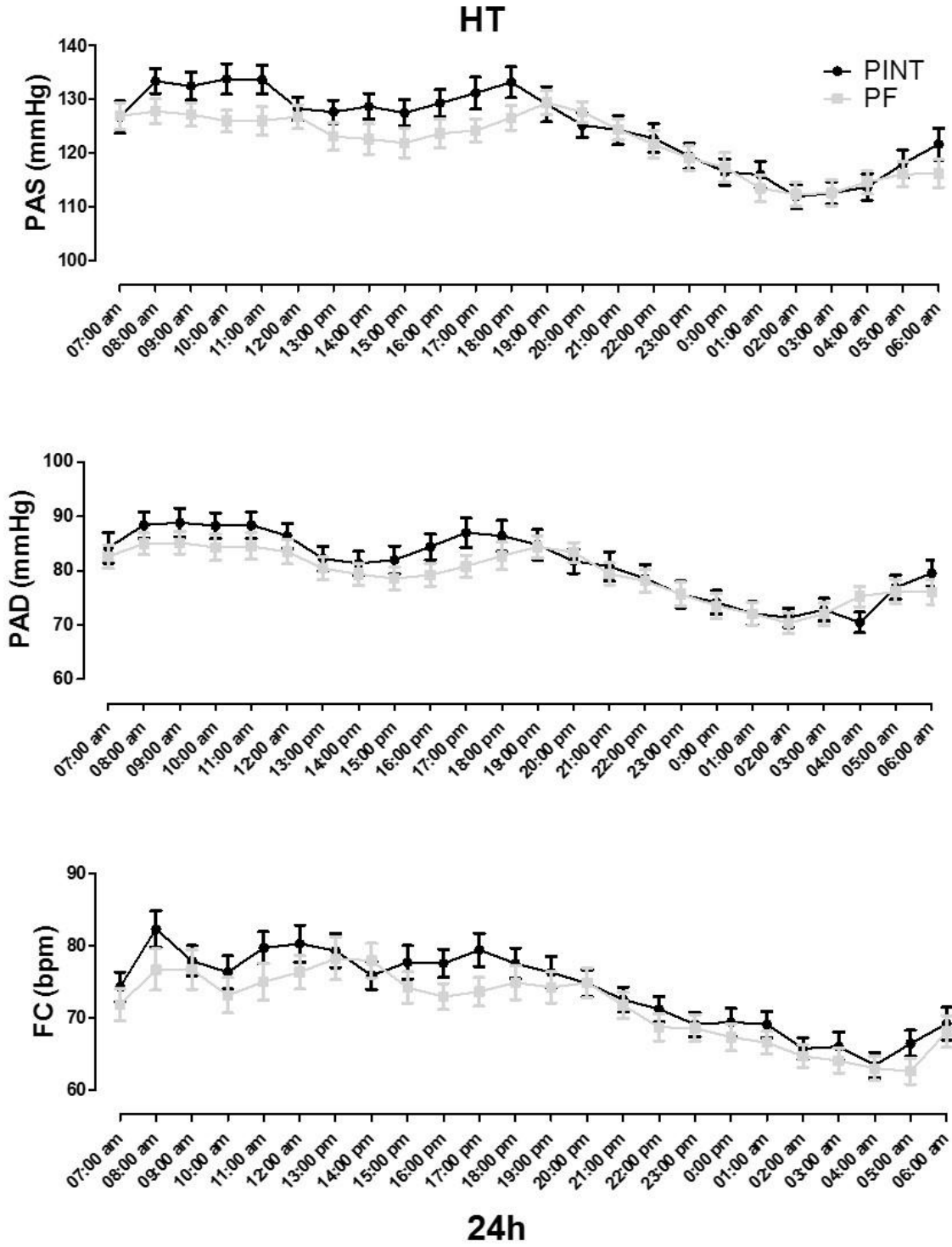
ZHANG, M.X.; OU, H.; SHEN, Y.H.; WANG, J.; WANG, J.; COSELLI, J.; WANG, X.L. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by small RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, n. 47, p. 16967–72, 22 nov. 2005.

ZINTZARAS, E.; KITSIOS, G.; STEFANIDIS, I. Endothelial NO synthase gene polymorphisms and hypertension: a meta-analysis. *Hypertension*, v. 48, n. 4, p. 700–10, out. 2006.

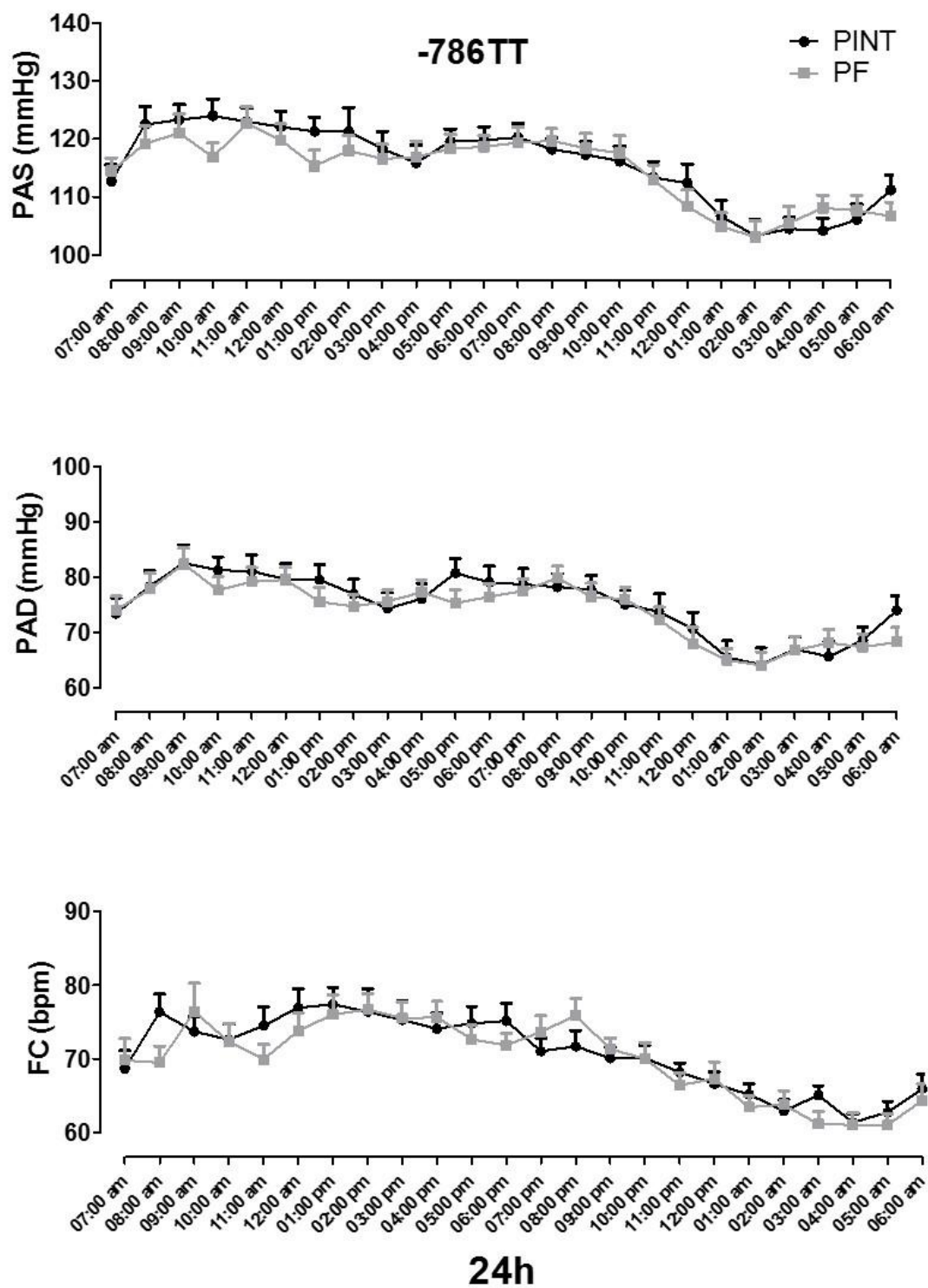
Anexo A - Efeitos de 24 sessões de exercício físico aeróbico sobre as 24h de comportamento da pressão arterial ambulatorial e frequência cardíaca em relação ao grupo de voluntários normotensos



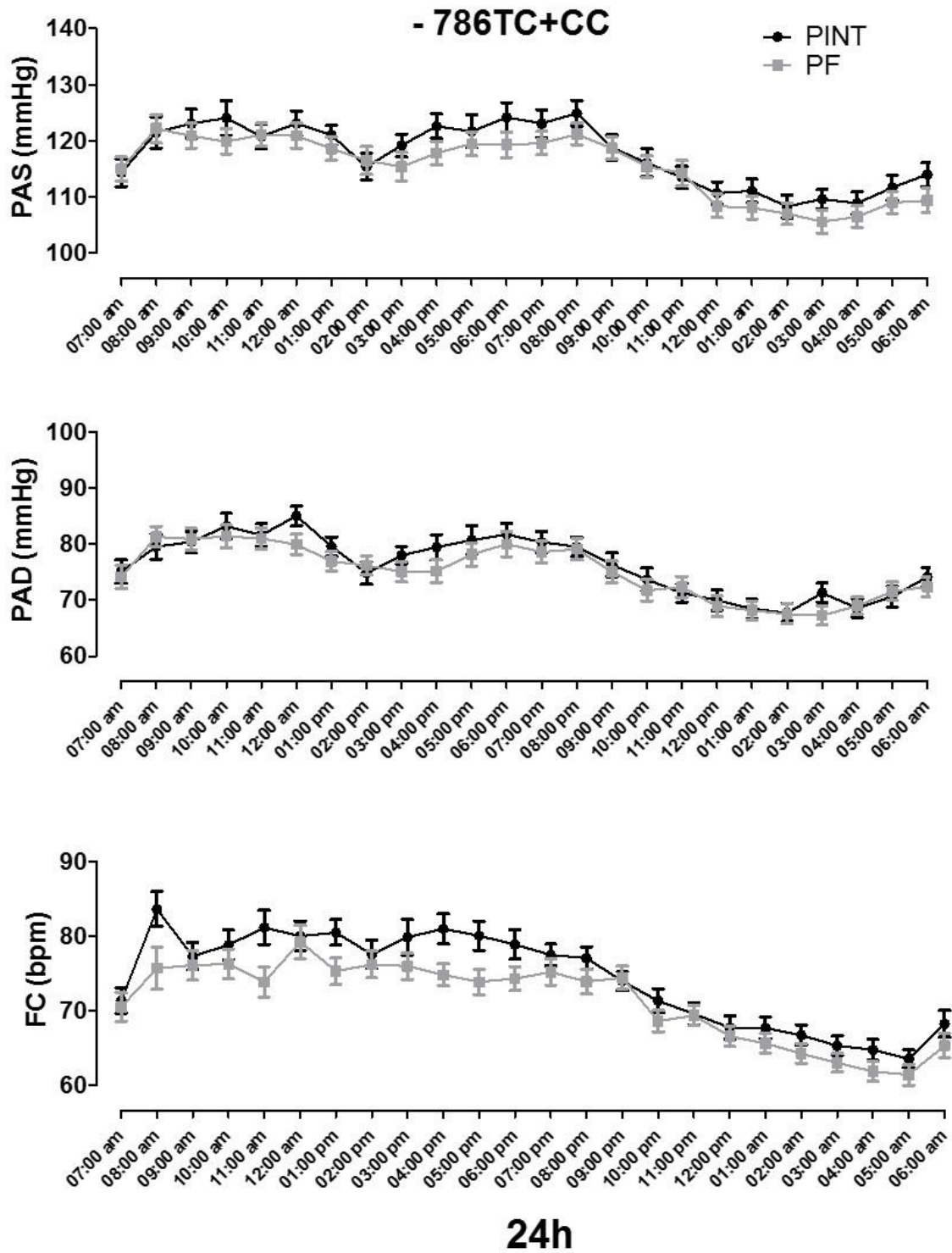
Anexo B - Efeitos de 24 sessões de exercício físico aeróbico sobre as 24h de comportamento da pressão arterial ambulatorial e frequência cardíaca em relação ao grupo de voluntários hipertensos



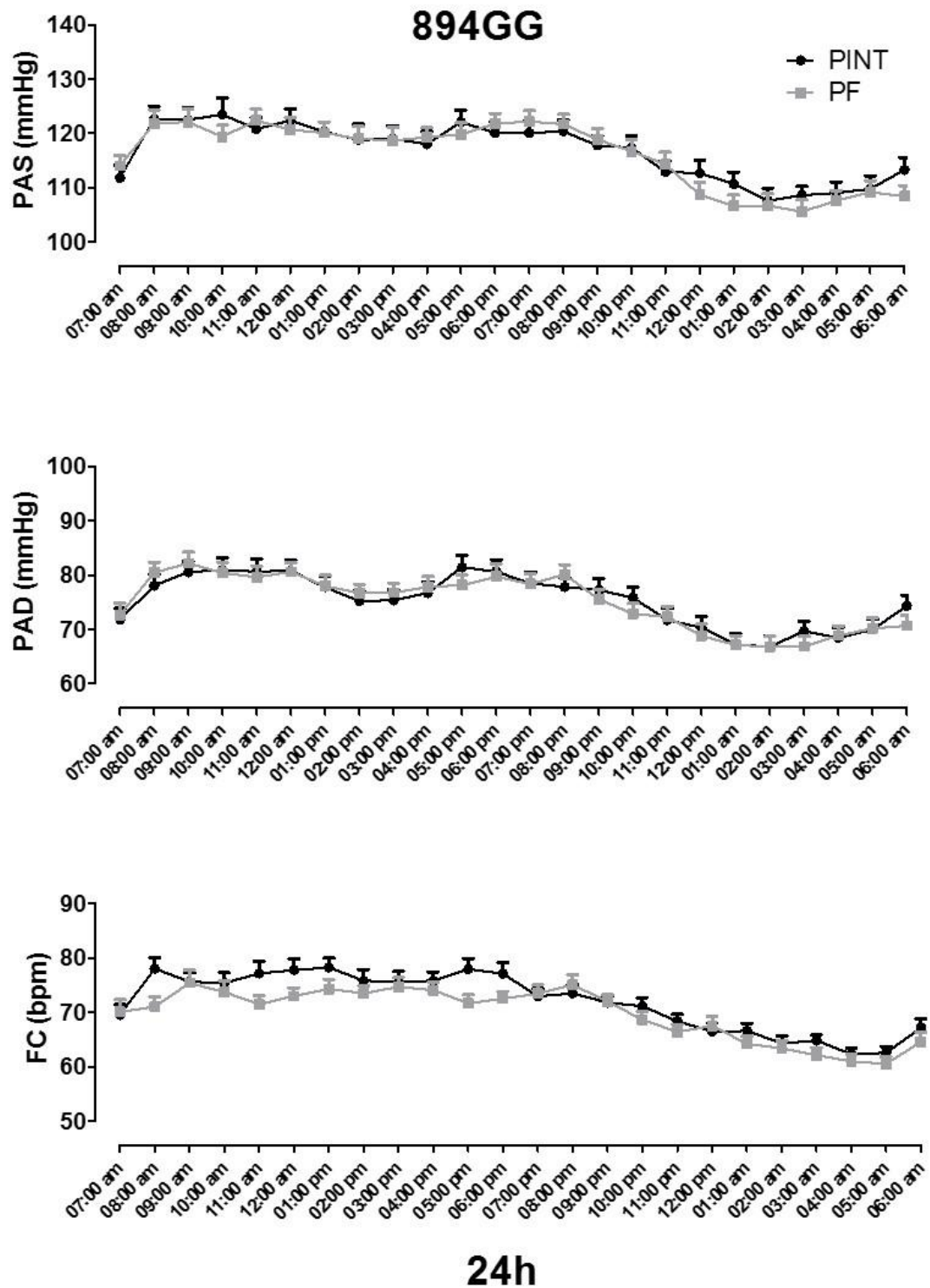
Anexo C - Efeitos de 24 sessões de exercício físico aeróbico sobre as 24h de comportamento da pressão arterial ambulatorial e frequência cardíaca para o grupo de voluntários normotensos+hipertensos não polimórfico (TT) em relação à posição - 786 do gene NOS3



Anexo D - Efeitos de 24 sessões de exercício físico aeróbico sobre as 24h de comportamento da pressão arterial ambulatorial e frequência cardíaca para o grupo de voluntários normotensos+hipertensos polimórfico (TC+CC) em relação à posição -786 do gene NOS3

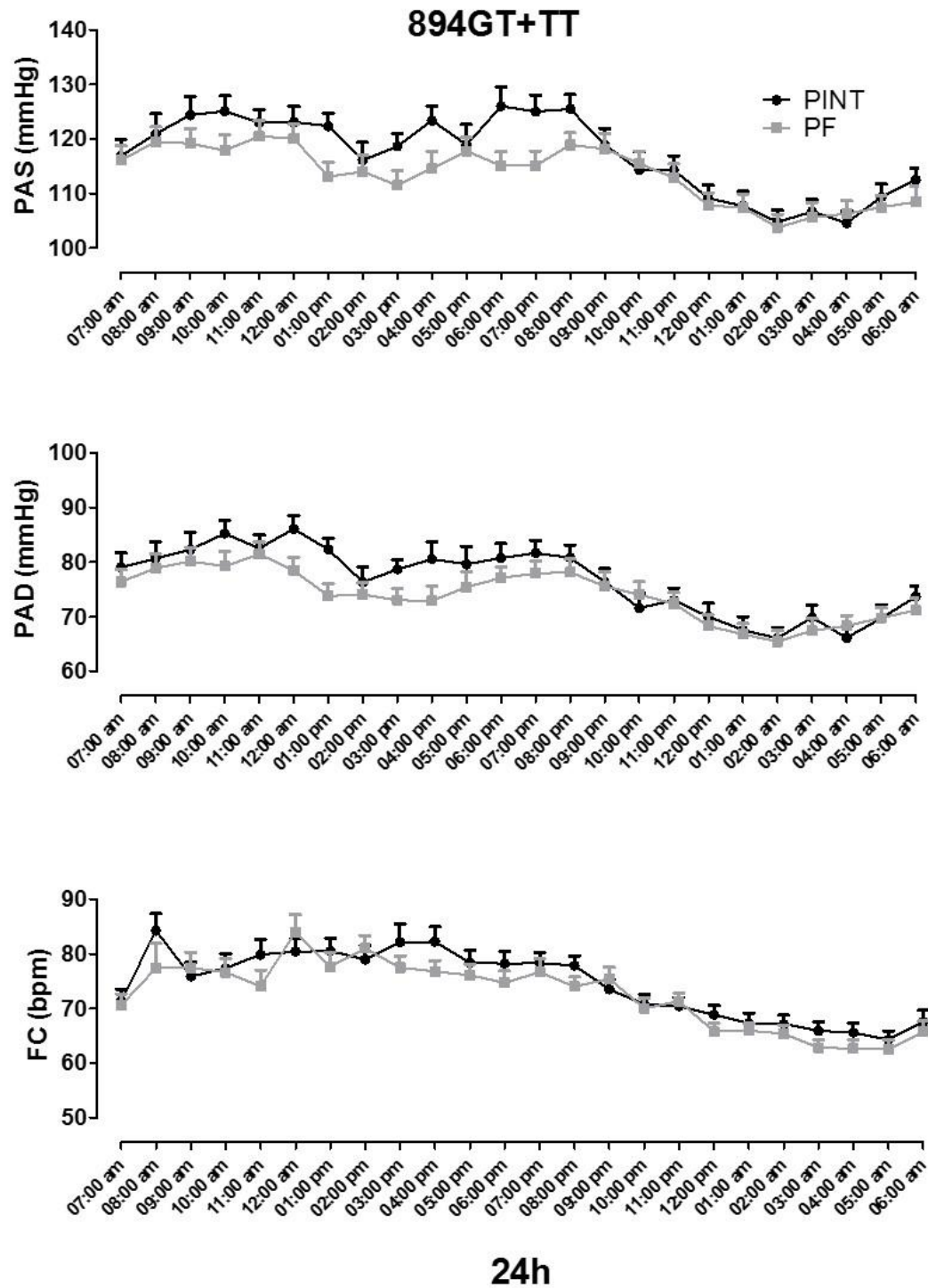


Anexo E - Efeitos de 24 sessões de exercício físico aeróbico sobre as 24h de comportamento da pressão arterial ambulatorial e frequência cardíaca para o grupo de voluntários normotensos+hipertensos não polimórfico (GG) em relação à posição 894 do gene NOS3

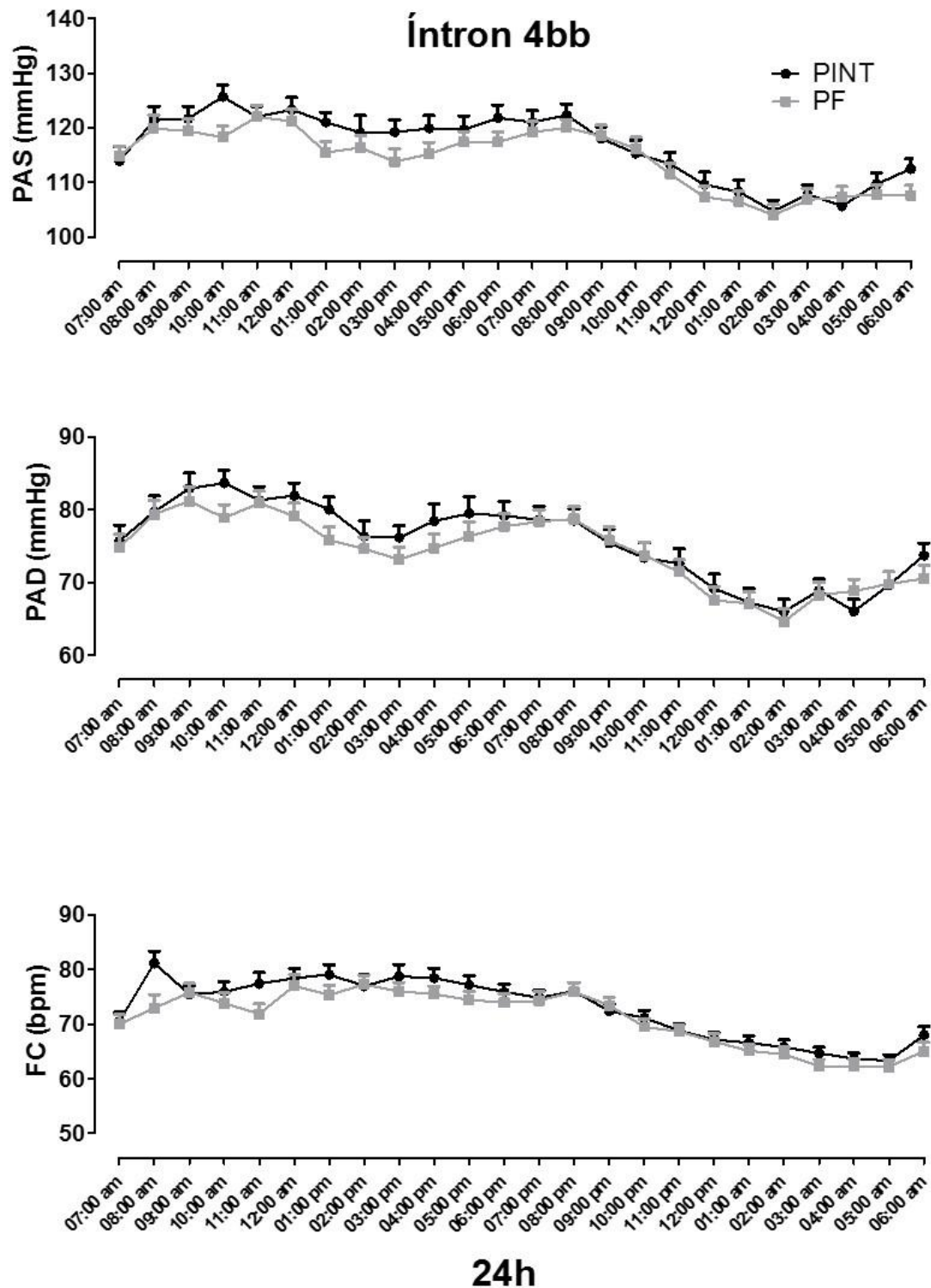


Anexo F - Efeitos de 24 sessões de exercício físico aeróbico sobre as 24h de comportamento da pressão arterial ambulatorial e frequência cardíaca para o grupo de voluntários normotensos+hipertensos polimórfico (GT+TT) em relação à posição

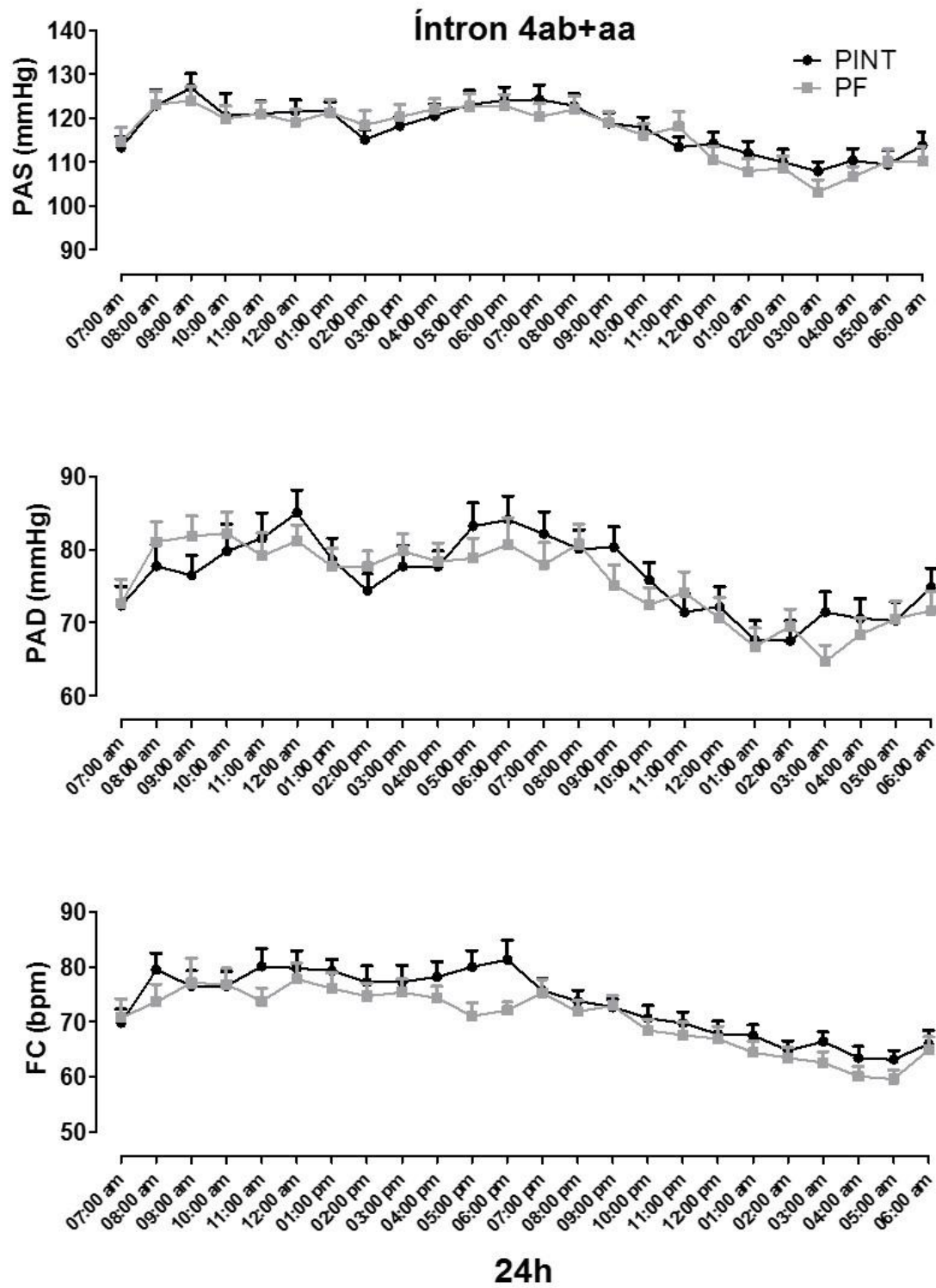
894do gene NOS 3



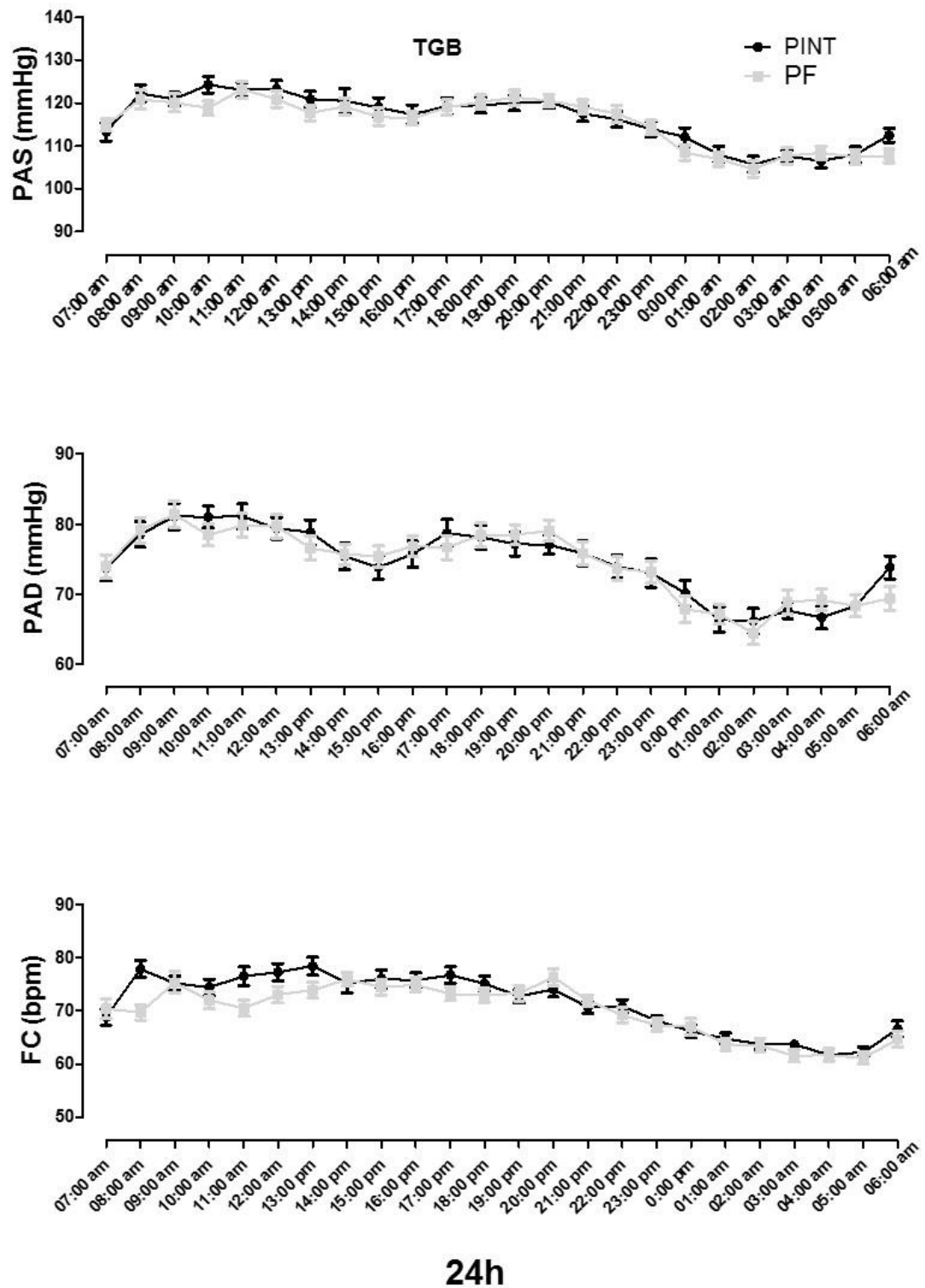
Anexo G - Efeitos de 24 sessões de exercício físico aeróbico sobre as 24h de comportamento da pressão arterial ambulatorial e frequência cardíaca para o grupo de voluntários normotensos+hipertensos não polimórfico (bb) em relação à posição
Íntron 4 do gene NOS3



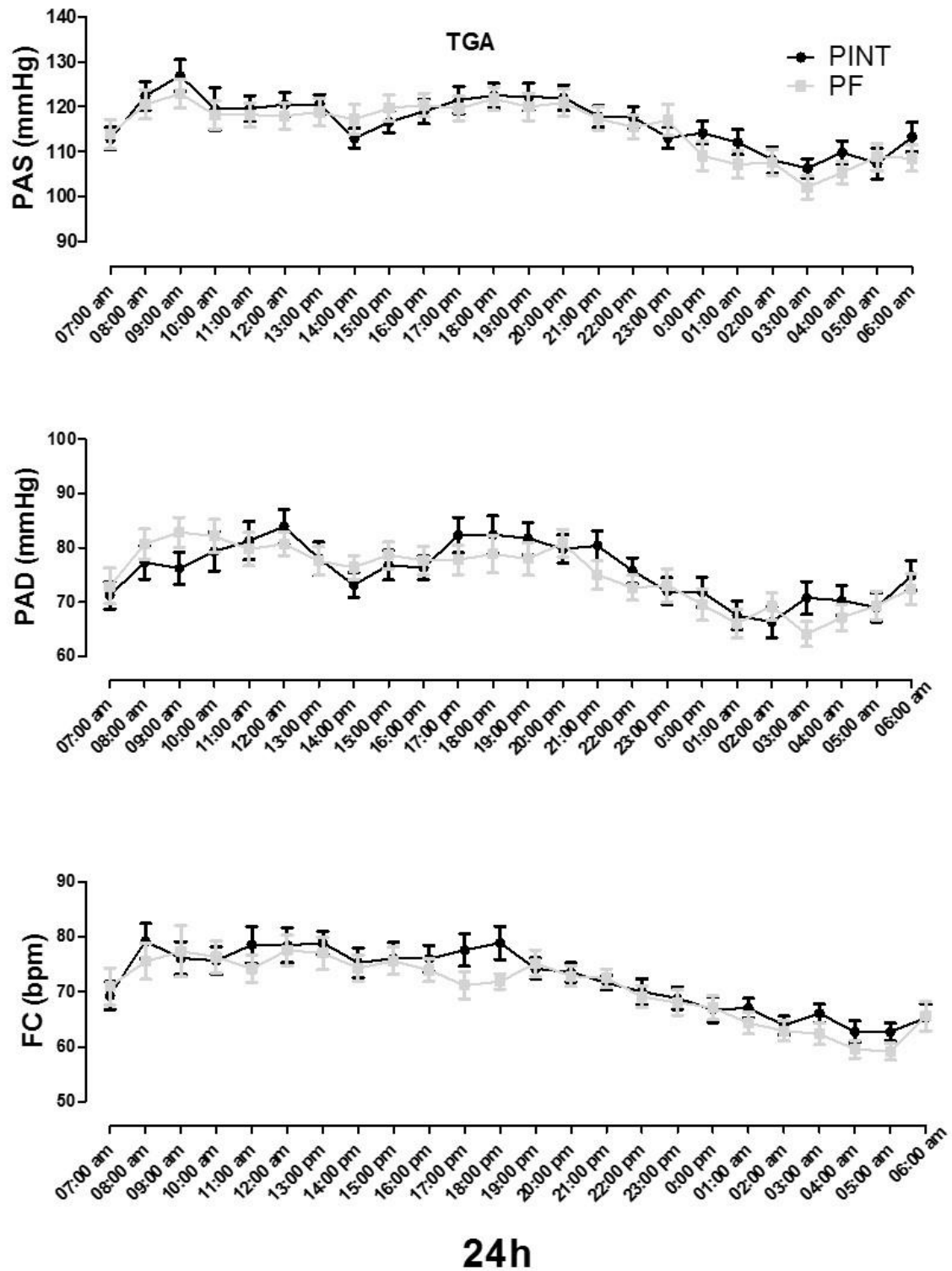
Anexo H - Efeitos de 24 sessões de exercício físico aeróbico sobre as 24h de comportamento da pressão arterial ambulatorial e frequência cardíaca para o grupo de voluntários normotensos+hipertensos polimórfico (ab+aa) em relação à posição Íntron 4 do gene NOS3



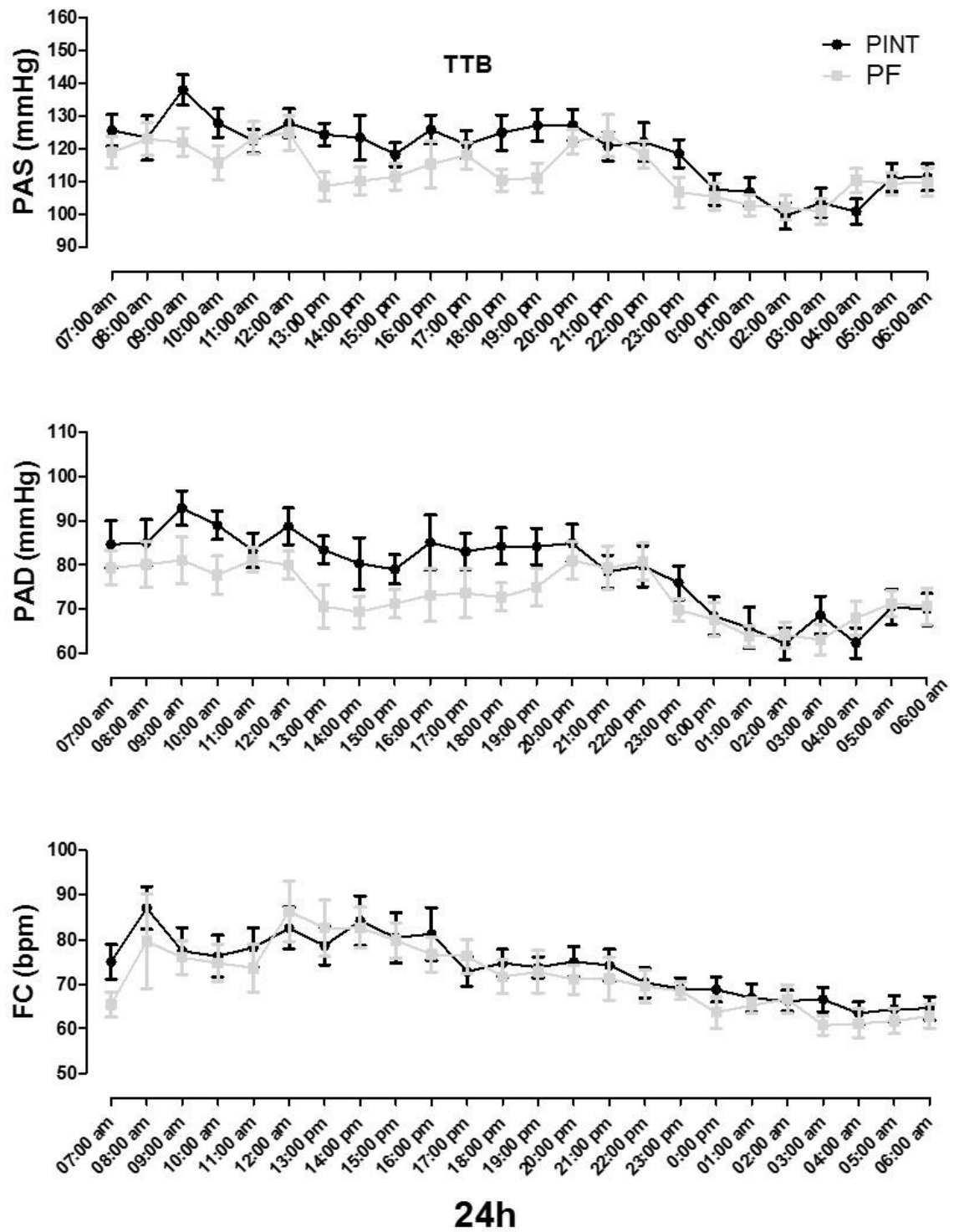
Anexo I - Efeitos de 24 sessões de exercício físico aeróbio sobre as 24h de comportamento da pressão arterial ambulatorial e frequência cardíaca para o grupo de voluntários normotensos+hipertensos haplótipo (TGb) em relação às posições - 786, 894 e Íntron 4 do gene NOS3



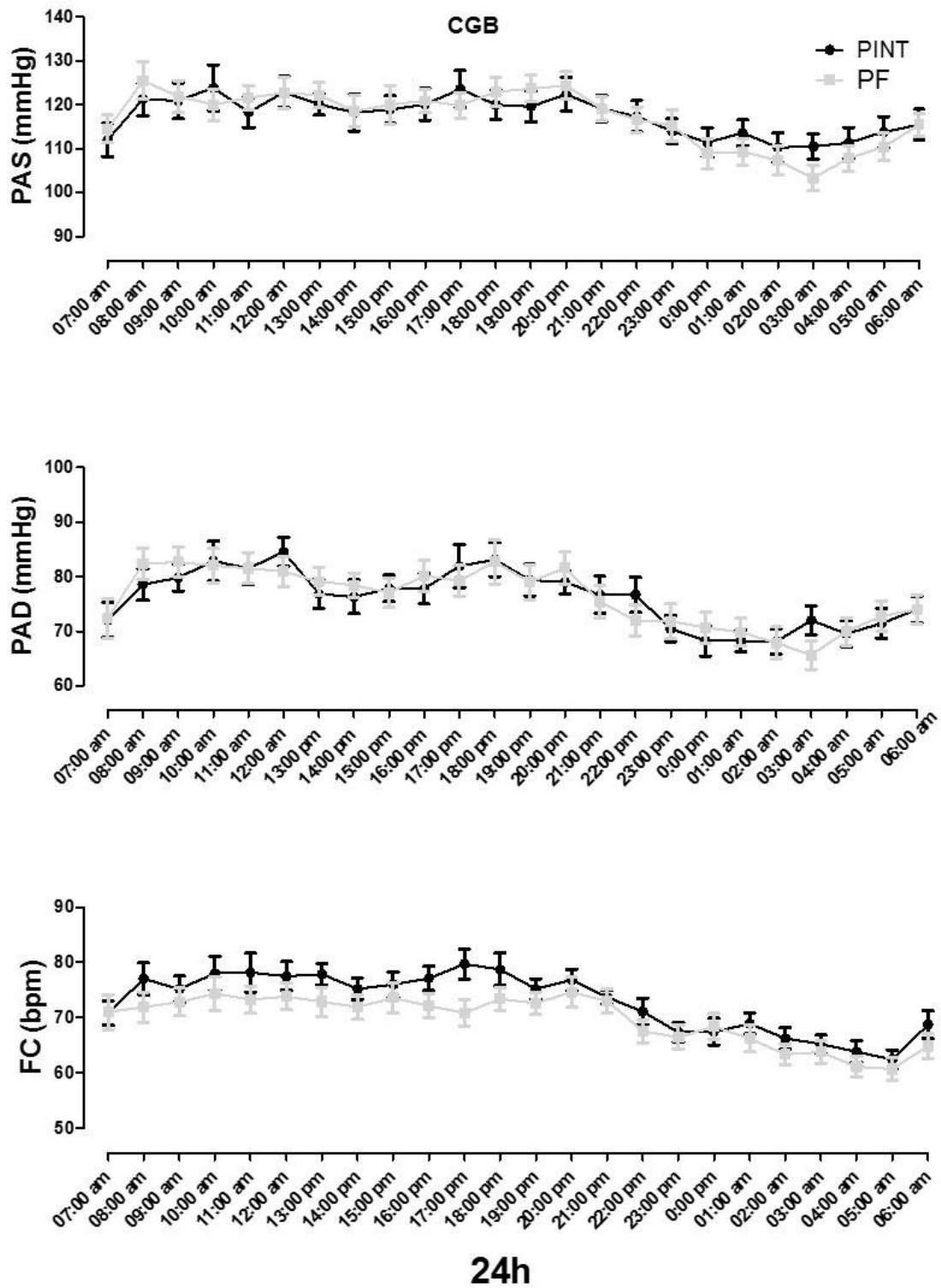
Anexo J - Efeitos de 24 sessões de exercício físico aeróbio sobre as 24h de comportamento da pressão arterial ambulatorial e frequência cardíaca para o grupo de voluntários normotensos+hipertensos haplótipo (TGA) em relação às posições - 786, 894 e Íntron 4 do gene NOS3



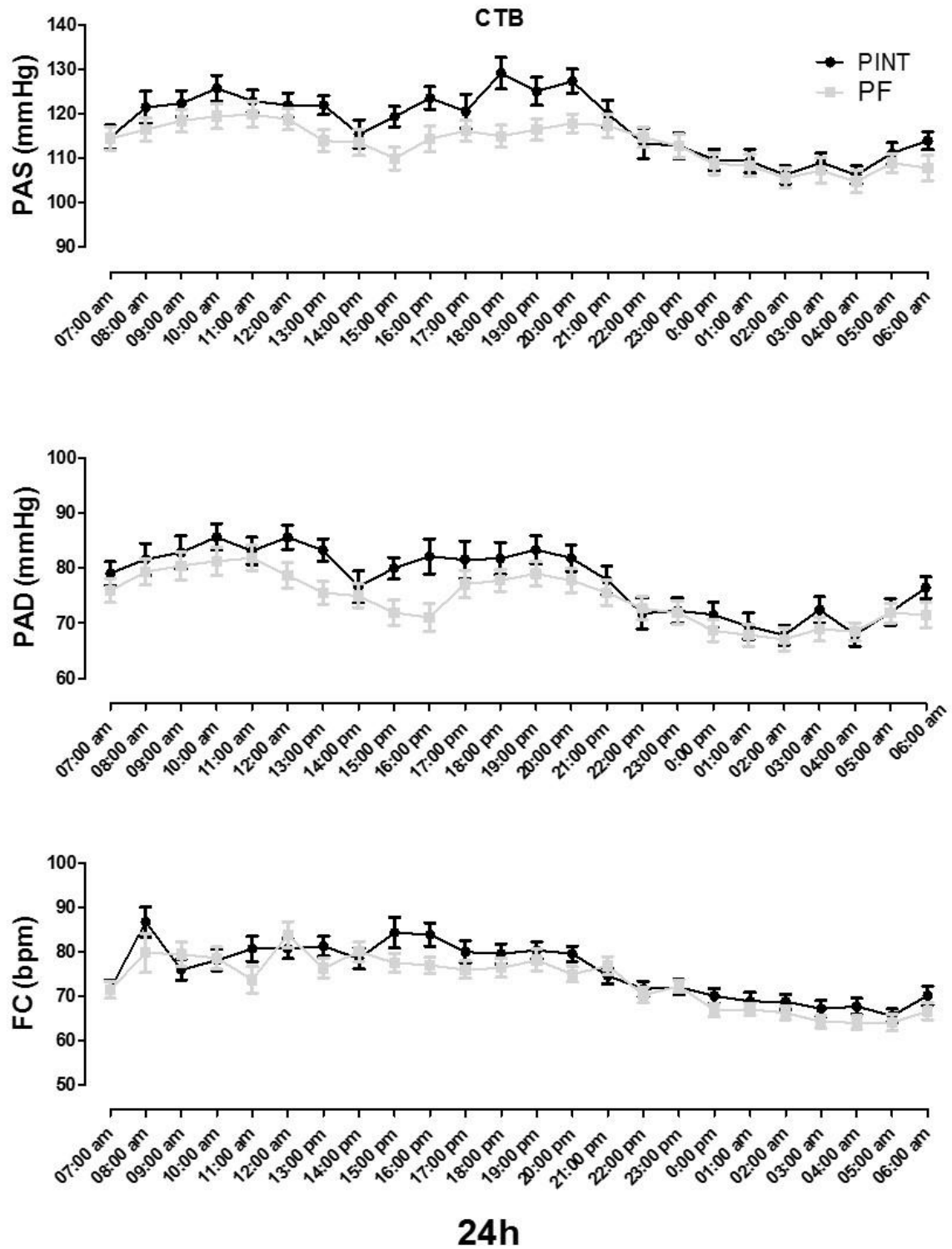
Anexo K - Efeitos de 24 sessões de exercício físico aeróbico sobre as 24h de comportamento da pressão arterial ambulatorial e frequência cardíaca para o grupo de voluntários normotensos+hipertensos haplótipo (TTb) em relação às posições - 786, 894 e Íntron 4 do gene NOS3



Anexo L - Efeitos de 24 sessões de exercício físico aeróbio sobre as 24h de comportamento da pressão arterial ambulatorial e frequência cardíaca para o grupo de voluntários normotensos+hipertensos haplótipo (CGB) em relação às posições - 786, 894 e Íntron 4 do gene NOS3



Anexo M - Efeitos de 24 sessões de exercício físico aeróbico sobre as 24h de comportamento da pressão arterial ambulatorial e frequência cardíaca para o grupo de voluntários normotensos+hipertensos haplótipo (CTb) em relação às posições - 786, 894 e Íntron 4 do gene NOS3



ANEXO N - Parecer do Cômite de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
 Campus de Rio Claro



DECISÃO CEP Nº 028/2010

Instituição: UNESP – IB – CRC	Departamento: Educação Física
Protocolo nº: 1028/2010	DATA DE REGISTRO NO CEP: 08.03.2010
Projeto de Pesquisa: Interação dos genótipos/ haplótipos para as posições - 786T>C, GLU298Asp e íntron 4 do gene daNOS e os efeitos do treinamento físico aeróbio sobre o sistema cardiovascular e a atividade das enzimas antioxidantes em adultos.	

Pesquisa Individual	Pesquisador Responsável: -.-
---------------------	------------------------------

Pesquisa Alunos de Graduação	Pesquisador Responsável: -.-
	Orientando(a): -.-

Pesquisa Alunos de Pós-Graduação	Pesquisador Responsável: Carlos Henrique Grossi Sponton
	Orientador(a): Profa Dra. Angelina Zanescio

Objetivo Acadêmico:	☐ TCC ☐ Mestrado ☒ Doutorado ☐ Outros (especificar)
---------------------	---

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Rio Claro, em sua 7ª reunião extraordinária, realizada em 05/05/2010,

☒ (x)	Aprovou o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
☐ ()	Desde que atendidas as pendências apontadas na reunião (vide anexo), aprova o Projeto de Pesquisa acima citado.
☐ ()	Referendou o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
☐ ()	Aprovou retornar ao interessado para atendimento das pendências encontradas (prazo máximo de 60 dias):
☐ ()	Não Aprovou.
☐ ()	Retirou , devido à permanência das pendências.
☐ ()	Aprovou o Projeto de Pesquisa acima citado e o encaminha , com o devido parecer, para apreciação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa- CONEP/MS , por se tratar de um dos casos previstos no capítulo VIII, item 4.c.

“Formulário para Acompanhamento dos Protocolos de Pesquisa Aprovados”
Data de Entrega: Junho de 2013

Rio Claro, 13 de maio de 2010.
 Prof. Dra. Maria Izabel Souza Camargo

Instituto de Biociências – Seção Técnica Acadêmica
 Avenida 24-A nº 1515 - CEP 13506-900 – Rio Claro - S.P. – Brasil - tel 19 3526-4105 - fax 19 3534-0009 - http://www.rc.unesp.br