

---

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

---

**AVALIAÇÃO GÊNICA DA SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL (eNOS)  
EM ADULTOS DE MEIA IDADE E IDOSOS HIPERTENSOS SUBMETIDOS AO  
TREINAMENTO FÍSICO: EFEITO NA PRESSÃO ARTERIAL**

**ANDERSON SARANZ ZAGO**

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, Área de Biodinâmica da Motricidade Humana.

**Setembro - 2007**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**Avaliação gênica da sintase do óxido nítrico endotelial (enos) em adultos de meia idade e idosos hipertensos submetidos ao treinamento físico: efeito na pressão arterial**

ANDERSON SARANZ ZAGO

Orientador – Prof. Dr. EDUARDO KOKUBUN

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

RIO CLARO – SP

Setembro / 2007

796.19 Zago, Anderson Saranz

Z18a Avaliação gênica da síntase do óxido nítrico endotelial (eNOS) em adultos de meia idade e idosos hipertensos submetidos ao treinamento físico: efeito na pressão arterial / Anderson Saranz Zago. – Rio Claro : [s.n.], 2007  
134 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Eduardo Kokubun

1. Educação física. 2. Educação física adaptada. 3. Exercício físico. 4. Hipertensão arterial. 5. Polimorfismo T-786C do gene da eNOS. I. Título.

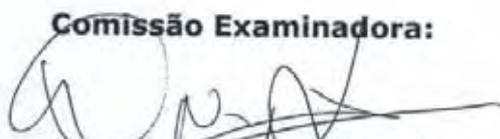
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE  
(ÁREA: BIODINÂMICA DA MOTRICIDADE HUMANA)**

**TESE DE DOUTORADO defendida em 14.09.07**

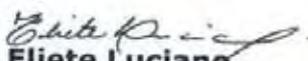
**"Avaliação gênica da sintase do óxido nítrico endotelial (enos)  
em adultos de meia idade e idosos hipertensos submetidos ao  
treinamento físico: efeito na pressão arterial"**

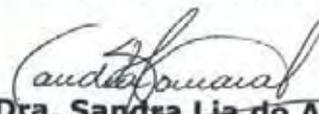
**ANDERSON SARANZ ZAGO**

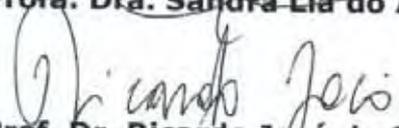
**Comissão Examinadora:**

  
**Prof. Dr. Eduardo Kokubun**

  
**Prof. Dr. Cláudio Alexandre Gobatto**

  
**Profa. Dra. Eliete Luciano**

  
**Profa. Dra. Sandra Lia do Amaral**

  
**Prof. Dr. Ricardo Jacó de Oliveira**

# **D**EDICATÓRIA

**À meus pais João e Judith e minha esposa Paula**

Qualquer palavra que eu diga será muito pouco para expressar o orgulho que tenho por ter vocês ao meu lado e por serem tão presentes em minha vida.

Obrigado por tudo.

# **A**GRADECIMENTOS

*É preciso reencantar nossa prática cotidiana. É urgente humanizar-se, agradecer.  
Depende de nós tornar isso possível. Sejamos semeadores não apenas de palavras.  
Mas de afetos e atitudes. Onde houver inquietação haverá transformação.  
Permita-se sonhar, conquistar e acreditar naquilo que faz. Este é o milagre da  
multiplicação do saber. E do vir à ser.*

A todos que compartilharam desta longa caminhada, agradeço por todos os momentos, por toda a ajuda e principalmente pela oportunidade que tive em conhecê-lo.

Em especial, gostaria de agradecer:

- Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (04/07779-4);
- Núcleo de Atividade Física, Esporte e Saúde (NAFES) / Departamento de Educação Física / UNESP – Rio Claro / Coordenador – Prof. Dr. Eduardo Kokubun;
- Laboratório de Atividade Física e Saúde / Departamento de Educação Física / UNESP – Rio Claro / Coordenadora - Profa. Dra. Angelina Zanescos;
- Laboratório de Farmacologia / UNICAMP – Campinas / Coordenador – Prof. Dr. Edson Antunes;
- Hemocentro / UNICAMP – Campinas / Coordenador – Prof. Dr. Fernando Costa
- Projeto de Extensão Atividade Física para a Terceira Idade – PROFIT / Departamento de Educação Física / UNESP – Rio Claro / Coordenadores – Prof. Dr. Sebastião Gobbi e Profa. Dra. Lílian Teresa Bucken Gobbi;
- Hypertension and Exercise Physiology Laboratory / Department of Kinesiology / University of Maryland – USA / Coordenador – Prof. Dr. Michael D. Brown;
- University of Maryland / Department of Kinesiology / Profa. Dr. Jane Clark e Prof. Dr. Márcio Alves de Oliveira;
- Laboratório para Estudos do Movimento (LEM) / Departamento de Educação Física / UNESP – Rio Claro / Coordenador – Prof. Dr. José Angelo Barela.

**Muito Obrigado...**

## **R**ESUMO

Uma alta incidência de hipertensão arterial, que possui uma etiologia multifatorial envolvendo fatores genéticos, ambientais e psicológicos, tem sido observada na população mundial. Desta forma o entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na gênese da hipertensão arterial é fundamental para se alcançar medidas preventivas e terapêuticas para o controle da pressão arterial. O óxido nítrico (NO) produzido pelas células endoteliais assume um importante papel no controle cardiovascular, pois tem sido considerado ser um potente vasodilatador e regulador da pressão arterial. Entretanto, as disfunções endoteliais, caracterizadas pela baixa produção e/ou biodisponibilidade do NO e alguns fatores genéticos (polimorfismos), podem contribuir para o surgimento da hipertensão arterial. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a influência de um programa de exercício aeróbio nas concentrações e biodisponibilidade de NO em portadores do polimorfismo T-786C do gene da eNOS e verificar o efeito dessas variáveis na pressão arterial. O DNA dos participantes foi isolado das células mononucleares periféricas e o diagnóstico genético foi realizado pela técnica de PCR. As análises de concentrações de NO, atividade da superóxido dismutase (SOD), pressão arterial, fluxo sanguíneo, composição corporal (índice de massa corporal e porcentagem de gordura corporal), perfil lipídico (colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol e triglicerídeos) e glicemia foram analisadas antes de após 6 meses de um programa de exercício físico aeróbio (70% do  $\dot{V}O_2$  max) em adultos de meia idade e idosos subdivididos de acordo com a genotipagem o nível inicial de pressão arterial. Os resultados mostraram que as variáveis do perfil lipídico não exerceram nenhuma influência na relação entre hipertensão, concentrações de NO e polimorfismo do gene da eNOS, enquanto que as variáveis de composição corporal

mostraram uma pequena influência nesta relação. As concentrações do NO foram associadas com os valores de pressão arterial e foram significativamente mais baixas nos grupos TC+CC comparados aos grupos TT no momento pré-treinamento (TT –  $18,4 \pm 4,4$  / TC+CC –  $15,2 \pm 3,1$   $\mu\text{M}$ ). Após os 6 meses de treinamento, as concentrações do NO aumentaram somente no grupo TC+CC, permanecendo inalterada no grupo TT (TT –  $18,1 \pm 3,7$  / TC+CC –  $16,9 \pm 3,1$   $\mu\text{M}$ ). Nenhuma diferença foi detectada para a atividade da SOD em ambos os grupos e momentos (pré-treinamento: TT –  $1,06 \pm 0,8$  / TC+CC –  $0,74 \pm 0,3$ ; pós-treinamento: TT –  $1,17 \pm 1,0$  / TC+CC –  $0,89 \pm 0,3$  U/ml). Este resultado sugere que os baixos níveis de NO do grupo TC+CC no momento pré-treinamento ocorreu devido à diminuição da expressão da eNOS ao invés de fatores associados à biodisponibilidade do NO. A ausência de mudanças na atividade da SOD pode estar mostrando que a capacidade antioxidante não está relacionada à hipertensão desses participantes. Desta forma conclui-se que o polimorfismo do gene da eNOS (T-786C) e as concentrações de NO não podem ser consideradas como marcadores, mas sim, como indicadores de hipertensão arterial. Ainda, o programa de exercício físico foi eficiente para melhorar a relação entre o polimorfismo T-786C da eNOS, as concentrações de NO e hipertensão arterial.

**Palavras-Chave:** óxido nítrico, polimorfismo T-786C do gene da eNOS, hipertensão arterial, pressão arterial.

## **A**bstract

Hypertension has a high incidence in the population of the world and its etiology is multifactorial, involving genetic, environmental and psychological factors. Understanding of the cell and molecular mechanisms involved in the genesis of hypertension is fundamental for the attainment of preventive and/or therapeutic measures for blood pressure control. Nitric Oxide (NO) produced by the endothelial cells has a particularly important role in cardiovascular control because it is a potent vasodilator and thus its role in blood pressure control is extremely relevant. However, the endothelial dysfunction which is characterized by a lower production and/or NO bioavailability, and some genetic factors can contribute to the genesis of hypertension. Therefore, the purpose of this study was investigate the influence of aerobic exercise training (AEX) on the NO concentration and bioavailability in 786C allele carriers and verify the effect of theses variable on the blood pressure. Genomic DNA was isolated from peripheral mononuclear cells and genotyping was done by standard PCR methods. The NOx assay, SOD activity, casual blood pressure, blood flow, body composition (body mass index and body fat), and lipid profile (cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, glucose, and triglycerides) was evaluated before and after 6 months of AEX (70% of  $\dot{V}O_2$  max) in adults and elderly divided in groups according genotype and blood pressure levels. The results showed that there is no interference of lipid profile on the relationship among hypertension, NO concentration and eNOS polymorphism and the body composition variables showed a small interference on this relationship. NOx levels was associated with blood pressure values and NOx levels were significantly lower in the TC+CC group compared to the TT group at baseline (TT –  $18,4 \pm 4,4$  / TC+CC -  $15,2 \pm 3,1$   $\mu$ M). Moreover, after 6 mo of AEX, NOx levels increased in the TC+CC group but did not change

in the TT group (TT –  $18,1 \pm 3,7$  / TC+CC –  $16,9 \pm 3,1$   $\mu\text{M}$ ). There were no significant differences in SOD activity in either genotype group before or after AEX (baseline: TT –  $1,06 \pm 0,8$  / TC+CC –  $0,74 \pm 0,3$ ; final: TT -  $1,17 \pm 1,0$  / TC+CC –  $0,89 \pm 0,3$  U/ml). These results suggest that lower NO<sub>x</sub> levels at baseline in the TC+CC group occur because of decreased eNOS expression instead of NO scavenging mechanisms. The absence of changes in SOD activity might suggest that antioxidant capacity is not impaired in these pre-hypertensive subjects. In conclusion the eNOS polymorphism (T-786C) and NO concentration can not be considered a marker of hypertension but an indicator of hypertension. In addition, the AEX has the capacity to improve the relationship among eNOS polymorphism, NO concentration and hypertension.

**Key-words:** nitric oxide, eNOS polymorphism, hypertension, blood pressure.

# SUMÁRIO

Dedicatória .....	ii
Agradecimentos .....	iii
Resumo .....	iv
Abstract .....	vi
Sumário .....	viii
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Tabelas.....	xiii
Lista de Abreviações.....	xiv
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>06</b>
Objetivo Geral.....	06
Objetivos Específicos.....	06
<b>DELINEAMENTO DA TESE.....</b>	<b>08</b>
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>10</b>
1.1 Introdução.....	11
1.2 Regulação da Pressão Arterial.....	11
1.3 Síntese do Óxido Nítrico.....	14
1.4 Papel do NO nas Doenças Cardiovasculares.....	19
1.5 Dislipidemias e Aterosclerose.....	20
1.6 Hipertensão Arterial.....	22
1.7 Óxido Nítrico e Exercício Físico.....	24
1.8 Considerações Finais.....	26
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>27</b>
2.1 Introdução.....	28
2.2 Síntese do Óxido Nítrico.....	29
2.3 Fatores Genéticos Envolvidos na Produção de NO.....	32
2.4 Biodisponibilidade do Óxido Nítrico.....	33
2.5 Influência Genética, Superóxido Dismutase e Exercício Físico.....	36
2.6 Considerações Finais.....	37
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>39</b>
3.1 Introdução.....	40
3.2 Objetivos.....	42
3.2.1 <i>Objetivo Geral</i> .....	42
3.2.2 <i>Objetivos Específicos</i> .....	42
3.3 Materiais e Métodos.....	43
3.4 Análise Estatística.....	46
3.5 Resultados.....	46
3.5.1 <i>Característica da Amostra</i> .....	47

3.5.2 Perfil lipídico, Glicêmico e Composição Corporal.....	49
3.6 Discussão.....	52
3.6.1 Característica da Amostra.....	52
3.6.2 Perfil lipídico e Composição Corporal.....	54
3.7 Conclusão.....	59
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>60</b>
4.1 Introdução.....	61
4.2 Objetivo.....	63
4.3 Materiais e Métodos.....	63
4.4 Análise Estatística.....	66
4.5 Resultados.....	66
4.5.1 Influência do exercício físico sobre os valores de pressão arterial e composição corporal.....	66
4.5.2 Influência do exercício físico sobre o perfil lipídico e glicêmico.....	69
4.6 Discussão.....	73
4.6.1 Composição Corporal.....	73
4.6.2 Perfil lipídico e glicêmico.....	76
4.6.3 Pressão Arterial.....	80
4.7 Conclusão.....	81
<b>CAPÍTULO 5.....</b>	<b>82</b>
5.1 Introduction.....	83
5.2 Research Design and Methods.....	85
5.2.1 Subjects.....	85
5.2.2 Screening.....	85
5.2.3 Dietary Stabilization.....	86
5.2.4 Baseline Testing.....	86
5.2.5 Forearm Blood Flow.....	87
5.2.6 Aerobic Exercise Training.....	88
5.2.7 Genetic Analysis.....	88
5.2.8 NO Assay.....	89
5.2.9 SOD Activity.....	89
5.3 Statistical Analysis.....	89
5.4 Results.....	90
5.5. Discussion.....	94
5.6 Conclusion.....	96
<b>SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES.....</b>	<b>97</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>103</b>
<b>ANEXO 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....</b>	<b>117</b>
<b>ANEXO 2: Aprovação do Comitê de Ética.....</b>	<b>119</b>
<b>ANEXO 3: Descrição Metodológica – PCR.....</b>	<b>121</b>
<b>ANEXO 4: Tabelas de Valores Normativos.....</b>	<b>126</b>

**ANEXO 5: Tabelas com os resultados dos capítulos 3 e 4..... 131**

# LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** Esquema ilustrativo da formação do óxido nítrico a partir do metabolismo da Arginina pela ativação da enzima Óxido Nítrico Sintase..... 15
- Figura 1.2** Esquema ilustrativo da síntese, liberação e ação do NO e o papel da eNOS na sua produção..... 18
- Figura 2.1** Esquema ilustrativo da síntese, liberação e ação do NO e o papel da eNOS na sua produção..... 30
- Figura 2.2** Ilustração da função do óxido nítrico (NO) no vaso sanguíneo e do processo de biodisponibilidade do NO produzido pelas células endoteliais. As setas contínuas indicam o efeito benéfico do NO no sistema cardiovascular, enquanto que as setas pontilhadas indicam a diminuição da biodisponibilidade do NO e a conseqüente vasoconstrição..... 34
- Figura 3.1** Ilustração gráfica dos valores de composição corporal de 142 voluntários subdivididos conforme o nível de pressão arterial e genotipagem. G1 – TT/NT; G2 – TT/HT; G3 – TC+CC/NT; G4 – TC+CC/HT. \*Diferença estatística com relação aos grupos normotensos G1 e G3 ( $p < 0,05$ )..... 49
- Figura 3.2** Ilustração gráfica dos valores de Pressão Arterial de 142 voluntários subdivididos conforme o nível de pressão arterial e genotipagem da eNOS. G1 – TT/NT; G2 – TT/HT; G3 – TC+CC/NT; G4 – TC+CC/HT. \*Diferença com relação aos grupos normotensos G1 e G3 ( $p < 0,05$ )..... 50
- Figura 3.3** Ilustração gráfica das variáveis de perfil lipídico, após um jejum de 12 horas, de 142 voluntários subdivididos em 4 grupos conforme o nível de pressão arterial e genotipagem da eNOS. G1 – TT/NT; G2 – TT/HT; G3 – TC+CC/NT; G4 – TC+CC/HT. \*Estatisticamente significativo com relação aos grupos G1, G3 e G4 ( $p < 0,05$ )..... 51
- Figura 3.4** Ilustração gráfica dos valores de glicose sanguínea, após um jejum de 12 horas, de 142 voluntários subdivididos em grupos conforme o nível de pressão arterial e genotipagem da eNOS. G1 – TT/NT; G2 – TT/HT; G3 – TC+CC/NT; G4 – TC+CC/HT. ANOVA não detectou diferença entre os grupos ( $p < 0,05$ )..... 51

- Figura 4.1** Ilustração gráfica dos valores de composição corporal de 30 voluntários subdivididos em grupos conforme o nível de pressão arterial e genotipagem da eNOS, nos momentos pré (primeira coluna de cada grupo) e pós (segunda coluna de cada grupo) treinamento. G1 – TT/NT; G2 – TT/HT; G3 – TC+CC/NT; G4 – TC+CC/HT. ANOVA não detectou diferença entre os grupos ( $p < 0,05$ )..... 67
- Figura 4.2** Ilustração gráfica dos valores de pressão arterial de 30 voluntários subdivididos em grupos conforme o nível de pressão arterial e genotipagem da eNOS, nos momentos pré (primeira coluna de cada grupo) e pós (segunda coluna de cada grupo) treinamento. G1 – TT/NT; G2 – TT/HT; G3 – TC+CC/NT; G4 – TC+CC/HT. \*Diferença estatística com relação aos grupos normotensos no momento pré-treinamento ( $p < 0,05$ )..... 68
- Figura 4.3** Ilustração gráfica do perfil lipídico e glicêmico de 30 voluntários subdivididos em grupos conforme o nível de pressão arterial e genotipagem da eNOS, nos momentos pré (primeira coluna de cada grupo) e pós (segunda coluna de cada grupo) treinamento. G1 – TT/NT; G2 – TT/HT; G3 – TC+CC/NT; G4 – TC+CC/HT. \*Estatisticamente significativa com relação aos demais grupos no momento pré-treinamento ( $p < 0,05$ )..... 70
- Figura 4.4** Ilustração gráfica dos valores de  $\dot{V}O_2$  max de 30 voluntários subdivididos em grupos conforme o nível de pressão arterial e genotipagem da eNOS, nos momentos pré (primeira coluna de cada grupo) e pós (segunda coluna de cada grupo) treinamento. G1 – TT/NT; G2 – TT/HT; G3 – TC+CC/NT; G4 – TC+CC/HT. ANOVA não detectou diferença entre os grupos ( $p < 0,05$ )..... 71
- Figura 5.1** Plasma NOx concentration and SOD activity before and after 6 mo of AEX in the genotype groups..... 91
- Figura 5.2** Main effect of the FBF at baseline (FBF-0) and during the 3 minutes of reactive hyperemia in NOS3 T-786C genotype groups baseline, before (panel A) and after (panel B) 6 months of AEX..... 92
- Figura 6** Ilustração da influência do exercício físico nas relações entre o polimorfismo T-786C do gene da eNOS, concentrações de óxido nítrico e hipertensão arterial..... 99

# LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b>	Distribuição do polimorfismo do gene da eNOS (T-786C) entre homens e mulheres, hipertensos e normotensos.....	47
<b>Tabela 3.2</b>	Distribuição do genótipo da eNOS (T-786C) e da incidência de hipertensão arterial de 142 adultos de meia idade e idosos.....	48
<b>Tabela 3.3</b>	Valores antropométricos e pressão arterial de 142 voluntários subdivididos conforme o nível de pressão arterial e genotipagem da eNOS.....(anexo 5)	132
<b>Tabela 3.4</b>	Perfil lipídico e glicêmico de 142 voluntários subdivididos em grupos conforme o nível de pressão arterial e genotipagem da eNOS.....(anexo 5)	132
<b>Tabela 4.1</b>	Valores antropométricos e de pressão arterial de 30 voluntários subdivididos em grupos conforme o nível de pressão arterial e genotipagem da eNOS nos momentos pré e pós programa de exercício físico.....(anexo 5).	133
<b>Tabela 4.2</b>	Valores de glicemia e perfil lipídico de 30 voluntários subdivididos em grupos conforme o nível de pressão arterial e genotipagem da eNOS nos momentos pré e pós programa de exercício físico.....(anexo 5)	133
<b>Tabela 4.3</b>	Análise de correlação entre as variáveis de composição corporal, pressão arterial, perfil lipídico e glicêmico de 30 participantes no momento pré-treinamento.....	72
<b>Tabela 4.4</b>	Análise de correlação entre as variáveis de composição corporal, pressão arterial, perfil lipídico e glicêmico de 30 participantes no momento pós-treinamento.....	73
<b>Tabela 5.1</b>	Subject characteristics for the genotype groups before and after 6 month of AEX.....	91
<b>Tabela 5.2</b>	Interactive effect of NOS3 gene polymorphism and AEX on FBF.....	92
<b>Tabela 5.3</b>	Correlation analysis among NOx, BP, and BF in both groups before (baseline) and after (final) 6 month of physical training.....	93

# LISTA DE ABREVIÇÕES

PA	Pressão Arterial
HA	Hipertensão Arterial
NT	Normotenso
HT	Hipertenso
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PAD	Pressão Arterial Diastólica
NO	Óxido Nítrico (nitric oxide)
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
TT	Não portador do polimorfismo do gene da eNOS
TC+CC	Portador do polimorfismo do gene da eNOS
PCR	Reação de Cadeia de Polimerase
IMC	Índice de Massa Corporal
GC	Gordura Corporal
CT	Colesterol Total
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
GL	Glicose
TG	Triglicérides
PLG	Perfil lipídico e glicêmico
SBH	Sociedade Brasileira de Hipertensão
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SBEM	Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia
ONOO <sup>-</sup>	Peroxynitrito
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânions Superóxido
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
WHO	World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

# INTRODUÇÃO

Com a grande alteração no quadro demográfico observada nos últimos anos, tem-se observado um aumento significativo da população mundial de idosos. No Brasil, segundo dados do IBGE (2004) o número de idosos passará de 14 milhões (dados atuais) para aproximadamente 31 milhões no ano de 2025, elevando desta forma, a expectativa de vida e conseqüentemente os problemas associados ao processo natural de envelhecimento, como por exemplo, osteoporose, obesidade, aterosclerose, doença arterial coronariana, doenças renais e hipertensão arterial. Dentre os vários problemas associados à saúde do idoso, as doenças cardíacas, em especial a hipertensão arterial, têm requerido uma atenção especial devido ao alto índice de mortalidade gerado por esta doença e, principalmente, devido o aumento crescente de sua prevalência, sobretudo, entre mulheres, negros e idosos.

Estima-se que para a população brasileira a prevalência da hipertensão arterial em crianças e adolescentes varia de 2% a 13% (aproximadamente 3,5 milhões de crianças e adolescentes), e à medida que a população envelhece, este número pode chegar a 65%, ou seja, a incidência de hipertensão arterial é elevada em idosos, sendo bastante relevante à probabilidade de ocorrência de qualquer evento como, insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio ou acidente vascular cerebral (MCARDLE *et al.*, 2003; SBH, 2006).

RUTHERFORD (2003) estimou que 25% da população mundial é hipertensa e que a hipertensão arterial é um dos principais fatores de risco para as doenças coronarianas. Um outro dado bastante interessante é que, de acordo com DÓREA e LOTUFO (2004), 50% dos indivíduos entre 60 e 69 anos e aproximadamente  $\frac{3}{4}$  da população acima dos 70 anos são afetados pela hipertensão arterial. Além disso, há uma correlação positiva e direta entre os níveis elevados de pressão arterial e o risco de doenças cardiovasculares independente do sexo, faixa etária e etnia. Em termos gerais, os principais problemas ocasionados pela hipertensão arterial são, ao nível cardíaco, uma excessiva carga de trabalho imposta ao coração, alterações nas estruturas e funções cardíacas (hipertrofia ventricular esquerda) e, no sistema vascular, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e hemorragias renais gerando insuficiência renal (SBH, 2004; SBH, 2006).

Assim, a compreensão dos mecanismos envolvidos na gênese da hipertensão arterial é fundamental para a realização de medidas preventivas e/ou terapêuticas com o objetivo de controlar os níveis pressóricos e conseqüentemente, reduzir os riscos cardiovasculares associados à hipertensão arterial e ao envelhecimento.

Sabe-se que a hipertensão arterial é uma doença crônico-não transmissível de etiologia multifatorial e que envolve diversos mecanismos como fatores genéticos, ambientais e psicológicos. Os fatores genéticos apontam a hipertensão arterial como uma doença poligênica, que tem a participação de diversos genes em sua expressão fisiopatológica. Alguns polimorfismos de determinados genes podem estar associados ao controle da pressão arterial contribuindo assim para o quadro hipertensivo. Já, os fatores não genéticos (ambientais e psicológicos) incluem o estresse, dieta rica em sal, obesidade, dislipidemia, resistência à insulina, sedentarismo, tabagismo e alta ingestão de bebidas alcoólicas, como os principais geradores desta doença.

Apesar de todos os fatores que podem gerar a hipertensão arterial, o organismo humano dispõe de vários mecanismos que buscam regular a pressão arterial mantendo-a dentro de padrões normais, sem que acarretem em implicações graves para o organismo humano (CAMPAGNOLE-SANTOS e HAIBARA, 2001). Desta forma, diferentes mecanismos fisiológicos, juntamente com algumas substâncias que interagem de maneira complexa, como por exemplo, angiotensina II e óxido nítrico, estão envolvidos na manutenção da pressão arterial, regulando o diâmetro e a reatividade vascular, a distribuição de fluidos dentro e fora dos vasos e o trabalho cardíaco (IRIGOYEN *et al.*, 2001; IRIGOYEN, 2005).

Em termos gerais, a pressão arterial pode ser controlada essencialmente por dois mecanismos: regulação neural, que é feita primariamente pelo sistema nervoso autônomo, através dos baroreceptores e quimiorreceptores e, a regulação humoral, que é realizada por uma variedade de substâncias liberadas por diferentes tipos celulares, como as células endoteliais e as células justaglomerulares. Qualquer alteração em um ou ambos os mecanismos de controle da pressão arterial (neural e/ou humoral), poderá refletir em elevação dos níveis pressóricos, instalando-se assim um quadro hipertensivo (GUYTON e HALL, 1996).

Neste aspecto, as células endoteliais têm recebido especial atenção pois possuem a capacidade de produzir e secretar diversas substâncias que atuam diretamente no controle do tônus vascular, regulando a vasomotricidade, a permeabilidade vascular e conseqüentemente, o nível de pressão arterial (PALMER *et al.*, 1987; IGNARRO *et al.*, 1988; YANAGISAWA *et al.*, 1988; RUTHERFORD, 2003; VANHOUTTE, 2003; ZANESCO e ANTUNES, 2005). Dentre essas substâncias, o óxido nítrico (NO), por ser considerado um potente vasodilatador, assume um papel de extrema relevância para o

controle da pressão arterial. (MONCADA *et al.*, 1991; FLEMING e BUSSE, 1999; VANHOUTTE, 2003).

Em tese, concentrações normais do NO estariam proporcionando ao mecanismo de controle cardiovascular uma vasodilatação suficiente para manter os níveis pressóricos normais, evitando-se assim a incidência da hipertensão arterial.

Por outro lado, diversos fatores podem estar interferindo neste mecanismo, reduzindo a concentração de NO na corrente sanguínea e, esta redução, tem sido apontada por vários autores ter uma relação inversamente proporcional com os valores de pressão arterial (KELLY *et al.*, 1996; DORIS, 2002; LAUER *et al.*, 2002; FUKAI, 2007). Assim, baixas concentrações de NO circulante podem ser consideradas como uma das causas da elevada incidência de hipertensão arterial, especialmente na população idosa.

Os principais mecanismos que poderiam estar comprometendo as concentrações de NO circulante são os fatores genéticos e os fatores relacionados à biodisponibilidade do NO. Os fatores genéticos assumem um papel importante relacionado principalmente à produção de NO. Tem sido apontado pela literatura que a presença de polimorfismos no gene da “óxido nítrico sintase endotelial” (eNOS), enzima responsável pela produção de NO, proporciona uma diminuição da expressão deste gene, diminuindo assim a sua produção. A biodisponibilidade do NO não estaria relacionado à produção, mas sim, à funcionalidade do NO, ou seja, algumas substâncias, estariam reagindo com a molécula de NO, neutralizando seu efeito cardioprotetor.

Desta forma, tanto o polimorfismo do gene da eNOS, em especial o polimorfismo T-786C, quanto a diminuição da biodisponibilidade do NO estariam diminuindo a concentração e função do NO, comprometendo assim, o grau de vasodilatação.

Um dos mecanismos que tem sido apontado pela literatura que contrapõe os efeitos do polimorfismo do gene da eNOS e da diminuição da biodisponibilidade do NO é a

força de cisalhamento que o sangue exerce na parede arterial denominada de *shear stress*. Diversos autores reportaram que o *shear stress* é capaz de estimular um aumento na expressão do gene da eNOS, principalmente em portadores de polimorfismos e, também, de aumentar a produção da superóxido dismutase (SOD), enzima responsável pelo aumento da biodisponibilidade do NO.

Como o exercício físico, possui a capacidade de aumentar o fluxo sanguíneo e, conseqüentemente o *shear stress*, o exercício físico pode ser considerado como um importante estímulo para o aumento tanto da produção quanto da biodisponibilidade do NO e, principalmente, como uma ferramenta para o controle da pressão arterial.

Desta forma, este estudo busca responder qual seria a influência que um programa de exercício físico regular exerceria sobre a concentração de NO, levando-se em consideração os fatores genéticos e a biodisponibilidade do NO.

# **O**BJETIVOS

## **Objetivo Geral**

O objetivo deste estudo foi verificar o efeito de um programa de exercício físico regular na concentração e na biodisponibilidade do óxido nítrico em portadores do polimorfismo T-786C do gene da eNOS e, verificar a associação destas variáveis na pressão arterial.

## **Objetivos Específicos**

- a.) Identificar e verificar se as variações polimórficas comuns no gene da eNOS estariam relacionadas ao quadro hipertensivo em indivíduos adultos de meia idade e idosos, determinando o possível papel do polimorfismo T-786C do gene da eNOS como marcador de hipertensão arterial;
- b.) Verificar a influência que os valores de glicose, perfil lipídico e composição corporal estariam exercendo sobre os níveis de pressão arterial em indivíduos portadores do polimorfismo T-786C do gene da eNOS;
- c.) Avaliar a relação entre a concentração e biodisponibilidade do óxido nítrico em portadores do polimorfismo T-786C do gene da eNOS;

- d.) Avaliar se o exercício físico aeróbio teria efeito sobre a pressão arterial destes voluntários, relacionando tais efeitos com o polimorfismo T-786C do gene da eNOS e as concentrações plasmáticas de óxido nítrico.

## **D**elineamento da Tese

Para um melhor delineamento desta tese, os capítulos foram estruturados sob a forma de artigos, sendo subdivididos da seguinte forma:

- *Capítulo 1*: Este capítulo teve como objetivo realizar uma revisão bibliográfica sobre os mecanismos de controle da pressão arterial, destacando a função das células endoteliais e a sua relação com as doenças cardiovasculares. Dentre esses mecanismos, especial atenção foi atribuída ao óxido nítrico, um potente vasodilatador produzido pelas células endoteliais, que exerce grande influência no controle da hipertensão arterial. Desta forma foi realizada uma revisão sobre os mecanismos de síntese e função do óxido nítrico, sua relação com as doenças cardiovasculares e a importância do exercício físico neste controle;

- *Capítulo 2*: O capítulo 2 teve como objetivo realizar uma revisão bibliográfica sobre os mecanismos responsáveis pela biodisponibilidade do óxido nítrico, destacando o papel da superóxido dismutase no aumento da biodisponibilidade do óxido nítrico e a função do exercício físico neste mecanismo. Também foi realizada uma revisão sobre a influência genética nos mecanismos de controle da pressão arterial e, como o exercício físico poderia

estar auxiliando no aumento da expressão de determinados genes, especialmente em indivíduos portadores de polimorfismos;

- *Capítulo 3:* O capítulo 3 teve como objetivo verificar a influência que o perfil lipídico e glicêmico e as variáveis de composição corporal estariam exercendo sobre os níveis de pressão arterial em indivíduos portadores do polimorfismo T-786C do gene da eNOS;

- *Capítulo 4:* O objetivo do capítulo 4 foi verificar qual a influência que um programa aeróbio de exercício físico exerceria sobre o perfil lipídico e glicêmico e sobre as variáveis de composição corporal e concentrações de óxido nítrico em indivíduos portadores do polimorfismo T-786C do gene da eNOS, verificando qual a associação que essas variáveis teriam sobre a pressão arterial de idosos;

- *Capítulo 5:* O capítulo 5 teve como objetivo investigar a influência do exercício físico e do polimorfismo T-786C do gene da eNOS nas concentrações de óxido nítrico, na atividade da superóxido dismutase, no fluxo sanguíneo e na pressão arterial.

# CAPÍTULO I

## *Óxido nítrico, doenças cardiovasculares e exercício físico<sup>1</sup>*

### RESUMO

As células endoteliais, presentes nos vasos sanguíneos, desempenham importante papel em nosso organismo, controlando diversas funções celulares. Dentre elas, pode-se citar o controle da pressão arterial, a síntese e expressão de moléculas de adesão na resposta inflamatória, controle da agregação plaquetária, metabolismo de substâncias vasodilatadoras (bradicinina) e vasoconstritoras (angiotensina II), e finalmente, síntese de substâncias, como a endotelina, a prostagladina, o fator hiperpolarizante derivado do endotélio e o óxido nítrico. O óxido nítrico (NO) é um potente vasodilatador que regula a pressão arterial e também atua na inibição da agregação plaquetária, impedindo os processos tromboembólicos. Diferentes estudos mostram, de forma consistente que, o exercício físico regular, praticado com intensidade moderada, promove redução da pressão arterial, melhora os níveis glicêmicos em pacientes diabéticos, e o perfil lipídico em indivíduos com dislipidemias. No entanto, até a década de 90, não se sabia o quê ou quais fatores estariam relacionados aos efeitos benéficos da prática de exercício físico. Após a descoberta da molécula do NO, direta correlação entre a produção de NO e os efeitos benéficos do exercício físico foram relatados. Essa revisão abordará os atuais conhecimentos sobre o NO e o papel do exercício físico, em sua produção e liberação, enfocando principalmente as doenças cardiovasculares.

**Palavras chave:** Óxido nítrico, exercício físico, doenças cardiovasculares.

---

<sup>1</sup> Zago, A. S. e Zanenco, A. Nitric oxide, cardiovascular disease and physical exercise. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v.87, n.6, Dec, p.e264-70. 2006.

## 1.1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial (HA) possui alta incidência na população mundial e sua etiologia é multifatorial, envolvendo fatores genéticos, ambientais e psicológicos (DÓREA e LOTUFO, 2004; WHO, 2004). Sua incidência tem aumentado de maneira crescente, sobretudo, entre mulheres, negros e idosos. Mais de 50% dos indivíduos entre 60 e 69 anos e aproximadamente  $\frac{3}{4}$  da população acima dos 70 anos são afetados pela HA (DÓREA e LOTUFO, 2004). Além disso, existe uma correlação positiva e direta entre os níveis de pressão arterial elevado e o risco de doenças cardiovasculares independente do sexo, faixa etária e etnia (DÓREA e LOTUFO, 2004; WHO, 2004; SBH, 2006). Assim, a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na gênese da HA é fundamental para a realização de medidas preventivas e/ou terapêuticas com o objetivo de controlar os níveis pressóricos e conseqüentemente, reduzir os riscos cardiovasculares associados à HA. Desta forma, esta revisão busca abordar os mecanismos envolvidos no controle da pressão arterial, enfocando o papel do endotélio vascular e a importância do exercício físico na regulação da produção de óxido nítrico pelas células endoteliais.

## 1.2 REGULAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL

A pressão arterial (PA) pode ser controlada essencialmente por dois mecanismos: regulação neural, que é feita primariamente pelo sistema nervoso autônomo (associado aos barorreceptores e quimiorreceptores) e a regulação humoral, que é feita por uma variedade de substâncias liberadas por diferentes tipos celulares, como as células endoteliais. Um outro mecanismo que também contribui significativamente para o controle da pressão arterial é o sistema renal (PERROTTI *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2007). Alterações em um ou ambos os mecanismos de controle da PA (neural e/ou humoral),

poderão refletir em elevação dos níveis pressóricos, instalando-se assim um quadro de HA (GUYTON e HALL, 1996).

O sistema nervoso autônomo é composto pelo sistema nervoso simpático e parassimpático, e tem papel fundamental no controle da PA, sendo ambos muito estudados no sentido de compreender a sua participação na gênese e/ou manutenção do estado hipertensivo. Os barorreceptores, mediadores primários do sistema nervoso autônomo no controle da PA e da frequência cardíaca, são receptores mecânicos que respondem, via terminações nervosas, à deformação ou estiramento das paredes dos vasos onde estão localizados. Os seios carotídeos e a crossa da aorta são os locais de maior concentração dessas aferências e com maior expressão fisiológica (GUYTON e HALL, 1996).

Os seios carotídeos são dilatações das artérias carótidas internas que possuem a parede desta região mais fina e com maior quantidade de tecido elástico do que de tecido muscular liso comparada a outras porções da parede arterial. A inervação sensorial desta área é provida pelos ramos do nervo glossofaríngeo, enquanto que a inervação dos barorreceptores aórticos é feita pelo nervo aórtico (GEBBER e SNYDER, 1970). As aferências barorreceptoras terminam no núcleo do trato solitário (NTS), onde normalmente são efetuadas as respostas de inibição da descarga simpática e intensificação da resposta vagal.

O aumento da PA promove estimulação dos barorreceptores aórticos e carotídeos, desencadeando reflexamente uma inibição da descarga simpática, enquanto que uma queda da PA pode produzir o efeito contrário (KRIEGER, 1964; GUYTON e HALL, 1996). Os quimiorreceptores estão localizados em várias artérias, como por exemplo na aorta e carótida e, respondem a estímulos químicos de pressão parcial de oxigênio ( $O_2$ ), pressão parcial de dióxido de carbono ( $CO_2$ ) e pH, sendo extremamente importantes nos estados de anoxia e/ou hipóxia (GUYTON e HALL, 1996) (MACHADO *et al.*, 1992; BARROS *et al.*, 2002; FERNANDES *et al.*, 2005).

O controle humoral é feito por diversos tipos celulares. As células justaglomerulares presentes nos rins liberam a renina que na corrente sanguínea vai atuar sobre uma proteína plasmática, chamada angiotensinogênio, formando a angiotensina I. A angiotensina I, por sua vez, é convertida em angiotensina II, sendo que, esta conversão ocorre quase que totalmente nos pequenos vasos dos pulmões, catalisada pela enzima conversora presente no endotélio dos vasos pulmonares. A angiotensina II é um potente vasoconstritor e sua ligação com os receptores AT<sub>1</sub>, presentes na musculatura lisa vascular, ativa a proteína G com conseqüente ativação de fosfolipase C- $\beta$  e formação de 1,4,5-trifosfato e diacilglicerol que induz o aumento da concentração intracelular de cálcio e ativação da proteína quinase C, promovendo vasoconstrição e conseqüentemente elevação da PA (COGOLLUDO *et al.*, 2005). Cabe salientar que a resposta a angiotensina II é bifásica na maior parte dos leitos vasculares, pois ocorre uma discreta vasodilatação desencadeada pela ativação dos receptores AT<sub>2</sub> presentes nas células endoteliais, seguida de potente vasoconstrição, pela ativação dos receptores AT<sub>1</sub> presentes nas células vasculares lisas. A angiotensina II promove também, hipertrofia ventricular esquerda, vasoconstrição renal, contração de células mensageiras, aumento da atividade da bomba de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> proximal e distal dos túbulos renais, inibição da secreção de renina e liberação de aldosterona (GUYTON e HALL, 1996; COGOLLUDO *et al.*, 2005).

As células endoteliais também desempenham relevante papel no controle do tônus cardiovascular, regulando a vasomotricidade, a permeabilidade vascular, o metabolismo de substâncias endógenas e exógenas, e a atividade plaquetária e leucocitária (ZANESCO e ANTUNES, 2005).

Furchgott & Zawadzki (1980) foram os primeiros pesquisadores a demonstrarem a importância do endotélio no controle do tônus vascular. Os autores relataram que a vasodilatação induzida pela acetilcolina era dependente da presença de um endotélio

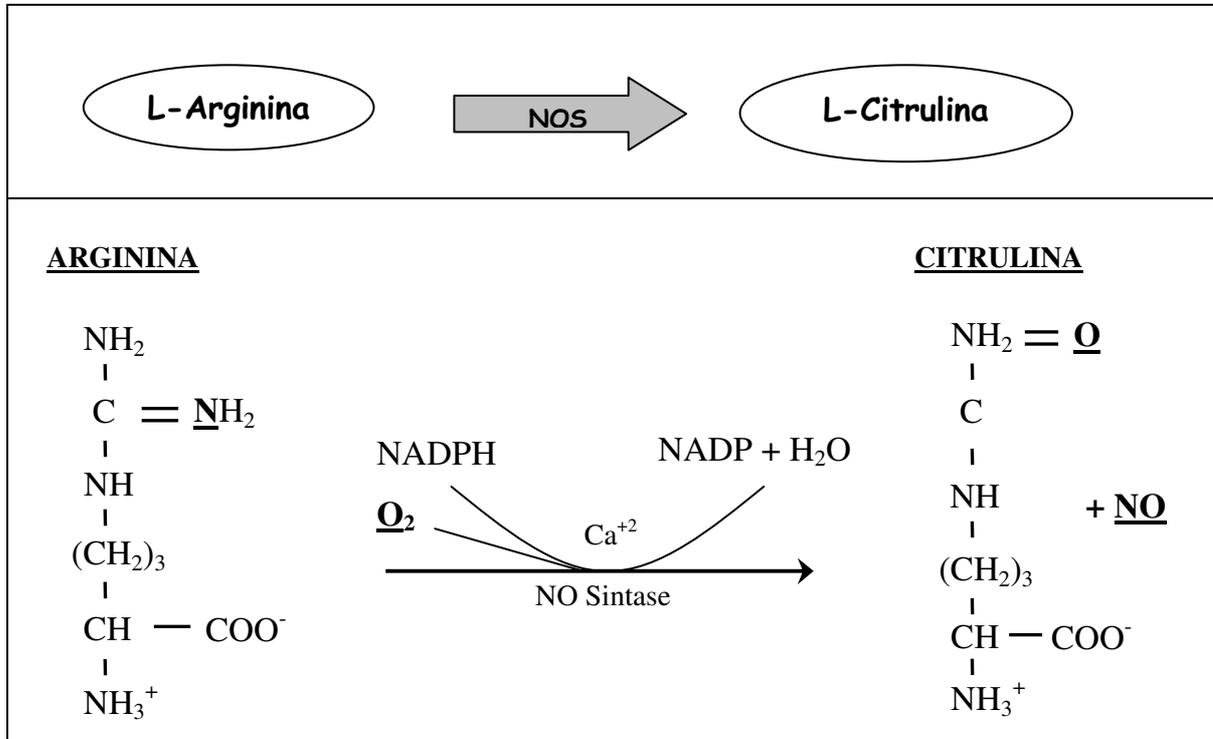
íntegro, e que as células endoteliais liberavam um fator de relaxamento, denominado de fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF). Além da acetilcolina, verificou-se posteriormente, que outros agonistas como a histamina, bradicinina, ATP, trombina, noradrenalina, angiotensina II e serotonina também eram capazes de liberar EDRF. Estudos mostram que as células endoteliais são capazes de sintetizar várias substâncias vasoativas, que foram classificadas em fatores relaxantes e fatores contráteis. Os fatores relaxantes derivados do endotélio são: o óxido nítrico (NO), a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980; PALMER *et al.*, 1987; IGNARRO *et al.*, 1988; VANHOUTTE, 2003). Os fatores contráteis derivados do endotélio são a endotelina, angiotensina II e o tromboxano (YANAGISAWA *et al.*, 1988).

Em especial, o NO produzido pelas células endoteliais desempenha um papel de grande importância no controle cardiovascular, tanto no controle da resistência periférica vascular como na agregação plaquetária (VANHOUTTE, 2003). O NO é um potente vasodilatador e assim seu papel no controle da PA é extremamente relevante. Além disso, o NO inibe a agregação plaquetária impedindo a formação de trombos, e conseqüentemente prevenindo os processos de trombozes e doenças atero-trombóticas, tais como infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral (MONCADA *et al.*, 1991; VANHOUTTE, 2003).

### **1.3 SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO**

A biossíntese do NO compreende uma das funções mais importantes do metabolismo da L-arginina no organismo. O NO é formado a partir do nitrogênio da guanidina presente na L-arginina, sob a ação catalítica da enzima sintase do óxido nítrico (NOS), gerando concentrações equimolares de L-citrulina e NO (MONCADA *et al.*, 1991;

COHEN e VANHOUTTE, 1995; LEHNINGER, 2002). O processo de formação do NO está ilustrado na figura 1.1.



**FIGURA 1.1:** Esquema ilustrativo da formação do óxido nítrico a partir do metabolismo da Arginina pela ativação da enzima Óxido Nítrico Sintase (adaptado de LEHNINGER, 2002).

Para que a síntese do NO seja realizada, é necessária a ativação de uma enzima, desencadeando todo o processo de sua formação. Assim, a síntese de NO ocorre somente a partir da ativação da Óxido Nítrico Sintase (NOS) que existe em duas isoformas: a isoforma constitutiva e a induzível (PALMER *et al.*, 1988; BREDT *et al.*, 1991; LEHNINGER, 2002).

As isoformas constitutivas (cNOS) são originalmente encontradas nos neurônios e no endotélio, sendo então denominadas de nNOS (NOS neuronal) e eNOS (NOS endotelial), respectivamente. A isoforma nNOS, comumente chamadas de isoforma I ou de bNOS (brain NOS), é encontrada no cérebro, na medula espinhal, nos gânglios simpáticos, em glândulas adrenais, nos neurônios nitrérgicos e em outras estruturas como células

epiteliais de pulmões, útero e estômago, células da mácula densa do rim, células da ilhota pancreática e músculo esquelético (MONCADA *et al.*, 1991). A isoforma eNOS, também chamadas de isoforma III, está ligada à membrana das células endoteliais, regulando o tônus da célula muscular lisa vascular, bem como a adesão e agregação plaquetária. A eNOS também pode ser encontrada em sinciciotrofoblastos, células epiteliais tubulares do rim, células intersticiais do cólon e hipocampo.

Ambas isoformas encontram-se presentes nas células e são estimuladas por uma cascata bioquímica que envolve a participação de íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Assim a ativação da NOS constitutiva é dependente da elevação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  nas células endoteliais, como será visto posteriormente com mais detalhes. Tanto a eNOS quanto a nNOS 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 tetrahydrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ) (MONCADA *et al.*, 1991; MOMBOULI e VANHOUTTE, 1999; VANHOUTTE, 2003; MONCADA e HIGGS, 2006). Em humanos, e presumivelmente, na maioria das outras espécies, estas isoformas são codificadas por três diferentes genes localizados em três cromossomos distintos (MONCADA e HIGGS, 2006).

A isoforma induzível (iNOS) é ativada a partir de alguns estímulos patológicos, como por exemplo, lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), citocinas, incluindo a interleucina-1, endotoxinas e fator de necrose tumoral, e são independentes de íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta isoforma pode ser expressa em uma grande variedade de tipos celulares incluindo macrófagos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, células de Kupffer, hepatócitos e células epiteliais. Uma das grandes diferenças entre a NOS constitutiva e a induzível é que a iNOS é capaz de liberar grandes quantidades de NO por períodos de tempo relativamente longo, podendo gerar alguns efeitos exagerados, produzindo respostas tóxicas ao organismo, enquanto que a cNOS produz pequenas quantidades de NO e por menor tempo (SCHULZ e

TRIGGLE, 1994; DOMINICZAK e BOHR, 1995; TIBIRICA, 2001; MONCADA e HIGGS, 2006). Apesar de existirem diferenças entre as isoformas de NOS, todas elas atuam no sentido de catalisar a oxidação do átomo de nitrogênio terminal do grupamento guanidino da L-arginina formando quantidades equimolares de NO e L-citrulina (PALMER *et al.*, 1988; BREDET *et al.*, 1991; LEHNINGER, 2002), conforme observado na figura 1.1.

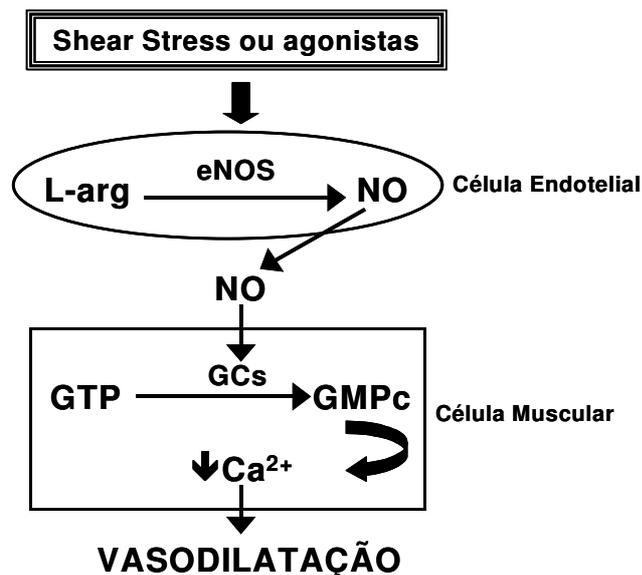
A ativação da NOS, especialmente a eNOS e, a conseqüente síntese de NO pelas células endoteliais ocorre a partir de estímulos que podem ser químicos ou físicos. Os estímulos químicos são originados da interação de agonistas endógenos/exógenos com receptores específicos presentes nas células endoteliais, como por exemplo, a acetilcolina, o ATP, e a bradicinina. A interação agonista-receptor, na célula endotelial, promove a formação de inositol trifosfato (IP3), que por sua vez induz a liberação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo endoplasmático, elevando os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular formando o complexo cálcio-camodulina, ativando a enzima NOS, que irá atuar na L-arginina, gerando a formação do NO pelo endotélio (MONCADA, 1994; MONCADA e HIGGS, 2006).

O estímulo físico é feito pela força que o sangue exerce na parede das artérias, denominada força de cisalhamento, ou *shear stress*. O mecanismo pelo qual o shear stress promove a formação de NO ainda não está completamente esclarecido. Sabe-se que as células endoteliais possuem mecanoreceptores, que podem ativar diretamente as proteínas G, os canais iônicos e enzimas do grupo das proteínas quinases e fosfatases que vão promover a formação de segundos mensageiros desencadeando uma série de reações químicas, que envolvem a participação dos íons cálcio, até a vasodilatação propriamente dita (SESSA *et al.*, 1994; HIGASHI *et al.*, 1999; FISHER *et al.*, 2001; BOO e JO, 2003).

Assim, as células endoteliais comportam-se de forma dinâmica e respondem às alterações tanto dos estímulos físicos (shear stress) quanto aos estímulos químicos promovendo a síntese e liberação de substâncias vasoativas (BOO e JO, 2003).

Uma vez liberado, o NO difunde-se rapidamente da célula geradora para a célula alvo, ou mais particularmente, das células endoteliais para a musculatura lisa do vaso sanguíneo. Na célula muscular lisa, o NO irá ativar uma enzima catalítica, a guanilato ciclase solúvel (GCs). Essa ativação é feita pelo acoplamento do NO com o grupamento heme desta enzima (sítio receptor), que por sua vez irá formar o monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), a partir da quebra do trifosfato de guanosina (GTP). A formação do GMPc promove a ativação da bomba de cálcio dentro da célula muscular lisa, diminuindo as concentrações de cálcio intracelular que promoverá a redução do tônus vascular (MONCADA, 1997).

A figura 1.2 ilustra a síntese, liberação e ação do NO nos vasos sanguíneos e o papel da eNOS na sua produção.



**FIGURA 1.2:** Esquema ilustrativo da síntese, liberação e ação do NO e o papel da eNOS na sua produção

Outros mecanismos pelos quais a via NO/GMPc induz vasodilatação incluem inibição da geração de IP3 (na musculatura lisa), desfosforilação da cadeia leve de miosina,

inibição do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , ativação de proteínas quinases e estimulação da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de membrana (MURAD *et al.*, 1992; FISHER *et al.*, 2001; MCARDLE *et al.*, 2003).

Assim, em vasos sanguíneos, o aumento intracelular de GMPc induz ao relaxamento do músculo liso vascular e conseqüentemente, vasodilatação. Em plaquetas, a formação de GMPc irá inibir a agregação plaquetária, fato que justifica a atuação do NO neste mecanismo, haja vista que o NO desencadeia a formação de GMPc (MONCADA, 1994). No rim, isso desencadeará um aumento da excreção renal de sódio e a conseqüente perda de água e diminuição do volume sanguíneo (MURAD *et al.*, 1993; SCOTT-BURDEN e VANHOUTTE, 1993).

Como a musculatura lisa não possui a troponina, proteína reguladora presente no músculo esquelético, que é ativada pelos íons  $\text{Ca}^{2+}$  para promover a contração muscular, a contração da musculatura lisa ocorre devido à combinação entre o cálcio e a calmodulina. Essa combinação ativa uma enzima fosforilativa, a miosina quinase, que tem a função de fosforilar as cadeias leves da miosina, adquirindo a capacidade de se fixar ao filamento de actina e realizar a contração muscular. Desta forma, a diminuição da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  impediria a combinação cálcio/calmodulina, gerando um relaxamento da musculatura lisa vascular e a conseqüente vasodilatação (WEBB, 2003).

#### **1.4 PAPEL DO NO NAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES**

O papel do NO no sistema cardiovascular foi extensamente estudado, sendo atribuído ao NO um papel protetor na HA, na aterosclerose, na doença arterial coronariana e nas doenças trombo-embólicas (SCOTT-BURDEN e VANHOUTTE, 1993; ROSSELLI *et al.*, 1995; BEST *et al.*, 1998; DREXLER e HORNIG, 1999; KINGWELL, 2000; VIARO *et al.*, 2000; MCARDLE *et al.*, 2003).

Diversas doenças, como as dislipidemias, a aterosclerose, a HA, apresentam em sua gênese e/ou em seus mecanismos, alterações na função endotelial. Assim a disfunção endotelial, caracterizada por menor produção e/ou biodisponibilidade de NO, é um dos fatores que contribuem para o aparecimento das doenças cardiovasculares (KINGWELL, 2000).

### **1.5 DISLIPIDEMIAS E ATEROSCLEROSE**

As dislipidemias englobam a hipertrigliceridemia e a hipercolesterolemia. A hipertrigliceridemia, é definida como níveis de triglicérides com valores acima de 200mg/dL, enquanto que a hipercolesterolemia é definida como elevação da concentração plasmática de colesterol acima de 240mg/dL (WHO, 2004) ou 200mg;dL de acordo com a “I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica” (SBH, 2004). Na hipercolesterolemia, a quantidade de lipoproteína de baixa densidade (LDL) é alta e sua elevada concentração na circulação favorece sua oxidação (LDL-ox). O processo de aterosclerose está estreitamente relacionado aos níveis plasmáticos de LDL, especialmente após a sua oxidação. Acredita-se que a presença de LDL-ox seja a primeira etapa no processo de desenvolvimento da aterosclerose (PARTHASARATHY *et al.*, 1992), e sua oxidação está diretamente relacionada a sua concentração plasmática. Elevada concentração de LDL colesterol promove uma saturação do seu sistema de remoção, acarretando assim, um aumento no seu tempo de permanência na circulação e conseqüentemente sua oxidação. A molécula de LDL pode ser oxidada por íons cálcio, lipoxigenases (produzidas pelas células endoteliais), mieloperoxidases (secretadas pelos fagócitos) e espécies reativas de oxigênio (CURI, 2002) desencadeando todo o processo aterosclerótico.

O NO produzido pelas células endoteliais desempenha importante papel protetor na aterosclerose, inibindo a oxidação das moléculas de LDL colesterol e impedindo a

agregação plaquetária (MOMBOULI e VANHOUTTE, 1999; ZANESCO e ANTUNES, 2005). O mecanismo pelo qual o NO impede a formação da molécula de LDL-ox, é feito através de sua ação antioxidante (que é dependente da concentração), impedindo a formação de ânions superóxido (radicais livres), que promovem a oxidação da molécula de LDL colesterol. A ação antiagregante do NO é devida a sua ligação com a molécula de guanilatociclase que induz a formação de guanilato monofosfato cíclico (GMPc) que promove a redução da concentração de íons cálcio dentro da plaqueta, inibindo sua ativação e agregação (MORO *et al.*, 1996; HOBBS e MONCADA, 2003).

A formação de LDL-ox promove eventos celulares de recrutamento de leucócitos para a região vascular afetada, que irão produzir substâncias deletérias para as células endoteliais (interleucinas) reduzindo a produção de NO e/ou sua biodisponibilidade. Estudos clínicos mostram que indivíduos com hipercolesterolemia apresentam diminuição na produção dos fatores relaxantes derivados do endotélio (DREXLER e HORNIG, 1999). Por outro lado, outros estudos mostram que a produção do NO não é afetada pelos níveis elevados de colesterol circulantes, mas que a produção de espécies reativas de oxigênio como os ânions superóxidos ( $O_2^-$ ) reagem com a molécula de NO produzida, diminuindo a sua disponibilidade para as células e favorecendo os processos trombo-embólicos. Isto estaria acontecendo devido ao fato da hipercolesterolemia estar associada ao aumento da atividade da NAD/NADPH oxidase, fatores fundamentais para a formação dos ânions superóxido (HEITZER *et al.*, 1996; DREXLER e HORNIG, 1999; ROSENSON, 2004).

A redução de NO, promove a agregação plaquetária, a hiperplasia e hipertrofia das células musculares lisas, acarretando significativa redução da luz dos vasos e conseqüentemente isquemia dos tecidos. No coração, um fluxo sanguíneo reduzido nos vasos coronarianos acarreta deficiência no funcionamento do miocárdio (BOLAD e DELAFONTAINE, 2005). Estudos em animais de laboratório mostraram que o

comprometimento do processo relaxante dependente do endotélio em vasos coronarianos pode provocar insuficiência cardíaca crônica (LEVINE *et al.*, 1990; DREXLER e HORNIG, 1999; VIARO *et al.*, 2000; MCARDLE *et al.*, 2003).

A melhora do perfil lipídico restaura a produção e/ou biodisponibilidade do NO. Desta forma, a redução das concentrações plasmáticas de LDL colesterol e/ou aumento da fração de HDL colesterol, que faz o transporte reverso da molécula de LDL colesterol, são medidas extremamente benéficas para o organismo na prevenção e/ou tratamento da aterosclerose (BEST *et al.*, 1998). Uma das formas de se reduzir os níveis de LDL colesterol circulantes é através da prática regular de exercícios físicos. Diversos trabalhos mostraram que indivíduos fisicamente ativos possuem um perfil lipídico dentro dos valores normais quando comparados com indivíduos sedentários (DREXLER e HORNIG, 1999; KINGWELL, 2000; NUNES *et al.*, 2006). Assim, a prática de exercício físico regular é uma importante medida de prevenção e/ou tratamento das dislipidemias, cujos mecanismos envolvem a restauração da função das células endoteliais e melhora do perfil lipídico (NUNES *et al.*, 2006).

## **1.6 HIPERTENSÃO ARTERIAL**

A HA é uma doença de etiologia multifatorial que causa lesões em vários órgãos, tais como, coração, cérebro, vasos, rins e retina, sendo considerada um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento das complicações cardiovasculares, como por exemplo, 40% das mortes por acidentes vasculares encefálicos e 25% das doenças coronarianas. Para o diagnóstico da HA, além dos níveis tensionais, os fatores de risco, a lesão de órgãos alvos e as comorbidades associadas devem ser considerados. A HA é basicamente uma doença assintomática, mas por outro lado, pode as vezes apresentar alguns

sintomas tais como cefaléia, geralmente matutina e de localização occipital, tonturas, palpitações e desconforto precordial (GUYTON e HALL, 1996).

O efeito do exercício físico regular sobre a HA tem sido estudado tanto em animais de laboratório como em seres humanos. Dados experimentais mostram que a redução da PA após exercício é maior em indivíduos hipertensos do que em normotensos. A redução dos valores de PA sistólica e diastólica decorrente do exercício físico varia de 18–20mmHg e de 7-9 mmHg respectivamente, em humanos com hipertensão leve ou moderada, e em indivíduos normotensos, a redução é de 8-10 mmHg e 3-5 mmHg, respectivamente (KENNEY e SEALS, 1993).

Os efeitos benéficos do exercício físico sobre o controle da PA têm sido abordados sob dois aspectos: preventivos e terapêuticos. Os aspectos preventivos envolvem a promoção da saúde e prevenção do estado hipertensivo em sujeitos com maior risco de desenvolver a doença. Os aspectos terapêuticos envolvem além da redução dos níveis pressóricos e alteração do perfil lipídico, diminuição da mortalidade, mesmo quando não ocorre redução dos níveis pressóricos.

Estudos têm demonstrado que variações na intensidade do exercício têm diferentes efeitos na PA em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e em humanos (TIPTON *et al.*, 1982; GRASSI *et al.*, 1994). Os exercícios aeróbios como ciclismo, natação, subir e descer escadas ou corrida leve em esteira são mais eficazes como terapia alternativa (ou concomitante com terapia farmacológica) no tratamento da hipertensão leve ou moderada (FRANKLIN *et al.*, 1991; NEGRAO *et al.*, 1993; GAVA *et al.*, 1995; MONTEIRO e FILHO, 2004; PESCATELLO *et al.*, 2004). Os programas de condicionamento físico para hipertensos preconizam que os exercícios devem ser realizados, no mínimo, três vezes por semana, durante pelo menos 30 minutos por sessão. Exercícios de baixa a moderada intensidade (40-70% de  $\dot{V}O_2$  max ) acarretam melhores resultados na redução da PA do que

exercícios de maior intensidade ( $> 75\%$  de  $\dot{V}O_2 \text{ max}$ ) (PESCATELLO *et al.*, 2004). A maioria dos estudos mostra que a redução da PA em sujeitos com hipertensão essencial ocorre dentro de três semanas a três meses após o início do treinamento físico e essa redução é mantida enquanto se mantém o treinamento (KINGWELL, 2000; PESCATELLO *et al.*, 2004).

Vários estudos em animais mostram que a inibição da NOS por análogos da L-arginina, por exemplo, o L-NAME, produz redução na produção de NO e HA de maneira dose-dependente (GARDINER *et al.*, 1990; KLABUNDE *et al.*, 1991; RICHARD *et al.*, 1991; RIBEIRO *et al.*, 1992; ZATZ e BAYLIS, 1998; RIADO *et al.*, 1999). A administração diária de L-NAME (20mg/rato/dia) a ratos leva à inibição crônica da síntese de NO produzindo elevação de PA que é acompanhada por alterações funcionais e estruturais do rim (BAYLIS *et al.*, 1992; RIBEIRO *et al.*, 1992) e do coração (MORENO *et al.*, 1996). No coração, as anormalidades cardíacas incluem principalmente hipertrofia ventricular e focos de necrose e fibrose (MORENO *et al.*, 1996; BABAL *et al.*, 1997; DEVLIN *et al.*, 1998; LUVARA *et al.*, 1998). As lesões cardíacas parecem ser decorrentes da intensa vasoconstrição coronariana provocada pelo L-NAME que leva a uma menor oferta de oxigênio e nutrientes aos cardiomiócitos provocando a morte dos mesmos. O miócito morto dá então origem a um tecido conjuntivo cicatricial do tipo fibrótico que pode trazer um comprometimento relativamente sério ao sistema cardíaco. Estes estudos reforçam o efeito benéfico do NO no sistema cardiovascular e, particularmente, no controle da PA.

## 1.7 ÓXIDO NÍTRICO E EXERCÍCIO FÍSICO

Até a década de 90, diversos estudos mostravam a importância da prática de exercício físico regular na prevenção e tratamento de diversas doenças, em especial as doenças cardiovasculares. No entanto, o quê ou quais fatores estariam envolvidos nos efeitos

benéficos do exercício físico não eram conhecidos. A partir da descoberta da molécula de NO, inúmeros trabalhos foram realizados avaliando-se o efeito do exercício físico sobre as células endoteliais, sobre a produção de fatores relaxantes e sobre a correlação com os efeitos benéficos produzidos pelo exercício físico (DELP *et al.*, 1993; SESSA *et al.*, 1994; HIGASHI *et al.*, 1999; ROBERTS *et al.*, 1999; KINGWELL, 2000).

Estudos com seres humanos e animais de laboratório mostraram que o *shear stress* induzido pelo exercício físico é um poderoso estímulo para a liberação de fatores vasorelaxantes produzidos pelo endotélio vascular, como o NO e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), acarretando assim redução dos valores de PA (KINGWELL, 2000; KURU *et al.*, 2002). Foi demonstrado que o treinamento físico moderado aumenta o relaxamento da musculatura lisa vascular e não vascular, e que esse maior relaxamento seria devido a maior produção de EDHF e NO pelas células endoteliais em resposta ao exercício físico (CLARKSON *et al.*, 1999; GRIFFIN *et al.*, 1999; HIGASHI *et al.*, 1999; CLAUDINO *et al.*, 2004). Além disso, foi observado que o *shear stress* induzido pelo exercício físico aumenta a expressão da NOS endotelial e neuronal (SESSA *et al.*, 1994; SHEN *et al.*, 1994; ROBERTS *et al.*, 1999).

Assim, os efeitos benéficos da prática de exercício regular sobre as doenças cardiovasculares foram associados, principalmente, a maior produção de agentes vasodilatadores derivados do endotélio (NO e EDHF), com conseqüente redução da resistência vascular periférica, diminuição dos níveis de LDL colesterol e inibição da agregação plaquetária (KINGWELL *et al.*, 1997; KINGWELL, 2000). Este efeito estaria gerando uma melhora nos níveis pressóricos e, conseqüentemente, uma menor incidência de HA.

É importante salientar que o exercício físico parece ter efeito de proteção na integridade do endotélio, quer seja aumentando a produção de NO em vasos com endotélio

íntegro, quer restaurando a disfunção endotelial. Higashi e colaboradores (1999) confirmaram esta afirmação ao comparar a responsividade vascular entre indivíduos hipertensos e normotensos diante do exercício físico aeróbio. Os autores observaram que, voluntários normotenso apresentaram relaxamento dos vasos sanguíneos significativamente maiores do que o grupo hipertenso após a sessão de exercício físico, sugerindo a existência de disfunção endotelial no grupo hipertenso. E, comparando grupos hipertensos controle e praticantes de um programa de 12 semanas de exercício físico aeróbio, a responsividade vascular foi aumentada no grupo que se exercitava, ou seja, o exercício físico contribui para restabelecer a função endotelial. Desta forma, o papel do exercício físico torna-se essencial para o controle cardiovascular, tanto pelo benefício no controle da PA como pela inibição da agregação plaquetária e da formação de LDL-ox, atuando de forma preventiva e/ou terapêutica em diversas patologias como a aterosclerose, HA e as dislipidemias.

## **1.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O papel do NO nas doenças cardiovasculares tem merecido destaque em todas as áreas de conhecimentos. A ação benéfica do NO na PA, nas doenças tromboembólicas e nas dislipidemias está bem estabelecida. A integridade do endotélio é fundamental para a produção do NO, e o exercício físico tem sido empregado como uma ferramenta extremamente importante para manter a função endotelial e/ou restaurá-la. Assim, a prática regular de exercícios físicos é fundamental para a manutenção da saúde e prevenção e/ou tratamento das doenças cardiovasculares, entre outras. O Brasil possui um índice elevado de indivíduos sedentários sendo necessário políticas públicas voltadas para o investimento na área de esporte e lazer. Além disso, a qualificação profissional do educador físico, dentro da área de saúde, é de grande relevância como estratégia educacional na redução da incidência de doenças cardiovasculares na população brasileira.

## CAPÍTULO 2

### *Exercício físico como estímulo para o aumento da Produção e Biodisponibilidade do Oxido Nítrico e seu efeito no controle da Pressão Arterial<sup>2</sup>*

#### RESUMO

O óxido nítrico (NO) tem sido considerado como um dos importantes mecanismos para o controle da pressão arterial. Proveniente do metabolismo da L-arginina a partir da ativação da “óxido nítrico sintase endotelial” (eNOS), o NO contribui para aumentar o grau de vasodilatação e, conseqüentemente diminuição nos valores de pressão arterial. Mas, existem alguns mecanismos que podem estar contribuindo para a diminuição das concentrações de NO, como por exemplo, os fatores genéticos, em especial o polimorfismo T-786C do gene da eNOS, e a biodisponibilidade do NO. Várias substâncias podem estar atuando no sentido de neutralizar o efeito do NO, impedindo desta forma o efeito que o NO teria na vasodilatação. Contrapondo-se a esses efeitos, o exercício físico tem sido considerado uma importante ferramenta para o aumento nas concentrações de NO. Este efeito ocorre basicamente pelo aumento do *shear stress* proveniente do próprio exercício físico que possui a capacidade de estimular um aumento na expressão do gene da eNOS combatendo assim a deficiência provocada pelo polimorfismo e também, devido a capacidade de aumentar a produção de superóxido dismutase (SOD), enzima que tem a capacidade de reagir com as substâncias que estariam neutralizando o NO. Desta forma o exercício físico pode ser considerado como um importante mecanismo para aumentar a produção e a biodisponibilidade do NO.

**Palavras chave:** Óxido nítrico, exercício físico, doenças cardiovasculares.

---

<sup>2</sup> Artigo de Revisão submetido para publicação

## 2.1 INTRODUÇÃO

Por ser uma doença crônico-degenerativa de etiologia multifatorial, a hipertensão arterial (HA) tem sido apontada como um dos principais fatores de risco para as doenças cardiovasculares, especialmente para a população idosa (ACSM, 2000; MCARDLE *et al.*, 2003; RUTHERFORD, 2003; DÓREA e LOTUFO, 2004; IBGE, 2004; SBH, 2006). Atualmente cerca de 25% da população mundial é hipertensa e, 50% dos indivíduos entre 60 e 69 anos e aproximadamente  $\frac{3}{4}$  da população acima dos 70 anos são afetados pela HA (RUTHERFORD, 2003; DÓREA e LOTUFO, 2004; IBGE, 2004; SBH, 2004).

Contrapondo-se aos inúmeros fatores que podem estar gerando a HA, o organismo humano dispõe de vários mecanismos que buscam manter os níveis pressóricos dentro em uma faixa considerada normal, sem que acarretem em implicações graves para o organismo. Diferentes mecanismos fisiológicos estão envolvidos na manutenção da pressão arterial (PA), regulando o calibre e a reatividade vascular, a distribuição de fluidos dentro e fora dos vasos e o trabalho cardíaco (CAMPAGNOLE-SANTOS e HAIBARA, 2001; IRIGOYEN *et al.*, 2001). Um desses mecanismos importantes para o controle cardiovascular é a produção e liberação de Óxido Nítrico (NO), especialmente os produzidos pelas células endoteliais (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980; PALMER *et al.*, 1987; IGNARRO *et al.*, 1988; VANHOUTTE, 2003; ZANESCO e ANTUNES, 2005; YETIK-ANACAK e CATRAVAS, 2006).

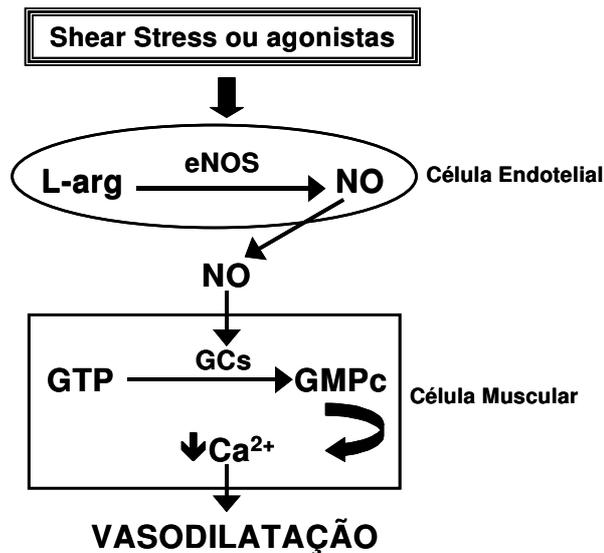
O NO desempenha um papel de grande importância no controle da PA por ser considerado um potente vasodilatador e um inibidor da agregação plaquetária, impedindo a formação de trombos, e conseqüentemente prevenindo os processos de trombozes e doenças atero-trombóticas (MONCADA *et al.*, 1991; VANHOUTTE, 2003; YETIK-ANACAK e CATRAVAS, 2006).

## 2.2 SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO

A biossíntese do NO compreende uma das funções mais importantes do metabolismo da L-arginina no organismo. O NO é formado a partir do nitrogênio da guanidina presente na L-arginina, sob a ação catalítica da enzima óxido nítrico sintase (NOS), gerando concentrações equimolares de L-citrulina e NO (PALMER *et al.*, 1988; BREDT *et al.*, 1991; MONCADA *et al.*, 1991; COHEN e VANHOUTTE, 1995; LEHNINGER, 2002; SIASOS *et al.*, 2006).

Em especial, a NOS endotelial (eNOS) exerce grande influência no controle cardiovascular, haja vista que ela é responsável por aproximadamente 90% da concentração de nitrito presente no plasma (VIARO *et al.*, 2000; KLEINBONGARD *et al.*, 2006). Desta forma, com a ativação da eNOS, a produção de NO é desencadeada e, uma vez liberado, o NO difunde-se rapidamente da célula geradora para a célula alvo, ou seja, das células endoteliais para as células musculaturas lisa do vaso sanguíneo. Na célula muscular lisa, o NO ativa uma enzima catalítica, a guanilato ciclase solúvel (GCs). Essa ativação é feita pelo acoplamento do NO com o grupamento heme desta enzima (sítio receptor), formando o monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), a partir da quebra do trifosfato de guanosina (GTP). A formação do GMPc promove a ativação da bomba de cálcio dentro da célula muscular lisa, diminuindo as concentrações de cálcio intracelular, promovendo assim a redução do tônus vascular e, conseqüentemente, vasodilatação (PALMER *et al.*, 1988; MONCADA, 1994; GUYTON e HALL, 1996; VIARO *et al.*, 2000; WEBB, 2003; MONCADA e HIGGS, 2006; ZAGO e ZANESCO, 2006).

A figura 2.1 ilustra a síntese, liberação e ação do NO e o papel da eNOS na sua produção.



**FIGURA 2.1:** Esquema ilustrativo da síntese, liberação e ação do NO e o papel da eNOS na sua produção (ZAGO e ZANESCO, 2006)

Os íons  $Ca^{2+}$  desempenham importante papel no controle do tônus vascular. Como a musculatura lisa não possui a troponina, proteína reguladora presente no músculo esquelético, que é ativada pelos íons  $Ca^{2+}$  para promover a contração muscular, a contração da musculatura lisa ocorre devido à combinação entre o cálcio e a calmodulina. Essa combinação ativa uma enzima fosforilativa, a miosina quinase, que tem a função de fosforilar as cadeias leves da miosina, adquirindo a capacidade de se fixar ao filamento de actina e realizar a contração muscular. Desta forma, a diminuição da concentração de  $Ca^{2+}$  impediria a combinação cálcio/calmodulina, gerando um relaxamento da musculatura lisa vascular e a conseqüente vasodilatação (LEHNINGER, 2002; WEBB, 2003).

Para que a eNOS seja ativada e que o NO possa ser produzido em níveis satisfatório, o estímulo pode ocorrer basicamente por dois mecanismos: um estímulo químico proveniente da interação de agonistas endógenos/exógenos com receptores específicos presentes nas células endoteliais, como por exemplo a acetilcolina, o ATP e a bradicinina (COHEN e VANHOUTTE, 1995; MOMBOULI e VANHOUTTE, 1999; VANHOUTTE,

2003; MONCADA e HIGGS, 2006), ou por estímulos mecânicos provenientes da força que o sangue exerce na parede das artérias, denominada de força de cisalhamento, ou *shear stress* (MONCADA *et al.*, 1991; COHEN e VANHOUTTE, 1995). Sabe-se que as células endoteliais possuem mecanorreceptores, que podem ativar diretamente as proteínas G, os canais iônicos e enzimas do grupo das proteínas quinases e fosfatases que, por sua vez, promoverão a formação de segundos mensageiros, desencadeando uma série de reações químicas, que envolvem a participação dos íons cálcio, até a vasodilatação propriamente dita (SESSA *et al.*, 1994; HIGASHI *et al.*, 1999; FISHER *et al.*, 2001; BOO e JO, 2003). Neste contexto, o exercício físico tem sido considerado um importante mecanismo para o estímulo da produção de NO pelas células endoteliais, pois durante o exercício ocorre um aumento do fluxo sanguíneo devido a um aumento da demanda de oxigênio para o músculo em atividade e, conseqüentemente um aumento do *shear stress*, (HIGASHI *et al.*, 1999; HAGBERG *et al.*, 2000; KINGWELL, 2000; HIGASHI e YOSHIKUMI, 2004).

Devido sua potente ação vasodilatadora, o NO tem exercido um importante papel cardioprotetor reduzindo a incidência de várias doenças cardiovasculares em especial a HA (MONCADA, 1994; COHEN e VANHOUTTE, 1995; ROSSELLI *et al.*, 1995; BEST *et al.*, 1998; DREXLER e HORNIG, 1999; KINGWELL, 2000; VIARO *et al.*, 2000; MCARDLE *et al.*, 2003). Sua ação vasodilatadora promove uma diminuição da resistência periférica, com conseqüente diminuição dos níveis pressóricos, além de possuir uma ação inibitória da oxidação das moléculas de LDL colesterol, impedindo a agregação plaquetária, pois, sua ligação com a molécula de guanilato-ciclase induz a formação de guanilato monofosfato cíclico (GMPc) que promove a redução da concentração de íons cálcio dentro da plaqueta, inibindo sua ativação e agregação (MORO *et al.*, 1996; HOBBS *et al.*, 1999; MOMBOULI e VANHOUTTE, 1999; HOBBS e MONCADA, 2003; ZANESCO e ANTUNES, 2005; PEREIRA *et al.*, 2006).

Por possuir uma correlação inversa com as disfunções endoteliais e com a incidência de fatores de risco para as doenças cardiovasculares, concentrações baixas de NO podem significar uma diminuição de sua função cardio-protetora (HEISS *et al.*, 2006; KLEINBONGARD *et al.*, 2006; SIASOS *et al.*, 2006). Assim, diversas doenças, como as dislipidemias, aterosclerose e HA, apresentam em sua gênese, e/ou em seus mecanismos, alterações na função endotelial que contribuem para uma menor produção e/ou uma diminuição da biodisponibilidade de NO (KLEINBONGARD *et al.*, 2006). Heiss e colaboradores (2006) confirmaram tal afirmação ao concluir que pacientes com disfunção endotelial, medidos através do fluxo sanguíneo da artéria braquial, possuíam níveis mais baixos de NO quando comparados com pacientes com função endotelial normal.

Desta forma é hipotetizado que a HA poderia estar sendo gerada basicamente por dois mecanismos que estariam influenciando na diminuição da produção do NO, como as alterações genéticas e os fatores relacionados à diminuição de sua biodisponibilidade.

### **2.3 FATORES GENÉTICOS ENVOLVIDOS NA PRODUÇÃO DE NO**

Para que toda a cascata bioquímica da produção de NO esteja acontecendo, o primeiro passo seria a ativação da enzima NOS, especialmente a eNOS. Diversos estudos têm mostrado que a presença de polimorfismos no gene da eNOS poderiam estar alterando as informações genéticas responsáveis pela sua ativação, comprometendo sua função cardio-protetora (NAKAYAMA *et al.*, 1999; DATA *et al.*, 2003; ERBS, 2003; ROSSI *et al.*, 2003; HELTIANU *et al.*, 2005; DENGEL *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2006; SANDRIM, 2006).

O gene da eNOS consiste de 26 exons e 25 introns localizados no braço longo do cromossomo 7 na posição 7q35 a 36. Os principais polimorfismos do gene da eNOS encontrados na população são denominados de T-786C e G-894T. A substituição do

nucleotídeo T (timina) pelo C (citosina) na posição 786 e/ou, do nucleotídeo G (guanina) pelo T (timina) na posição 894 no gene da eNOS pode refletir em alterações na atividade *promoter* deste gene, com redução na transcrição da eNOS, e conseqüentemente diminuição na produção de NO. Apenas como exemplo, Sandrim (2006) cita em seu estudo que o polimorfismo T-786C tem sido responsável por uma diminuição de 30 a 50% da atividade *promoter* do gene da eNOS, ou seja, especificamente para o polimorfismo T-786C, os indivíduos portadores do alelo c (TC ou CC) possuem uma menor expressão do gene da eNOS com relação aos indivíduos não portadores do alelo c (TT).

Desta forma, a presença de polimorfismos no gene da eNOS, pode ser considerado com um dos fatores determinante para a incidência da HA, devido a diminuição da produção de NO (WANG e WANG, 2000; DATA *et al.*, 2003; TANGUREK *et al.*, 2006). Concomitantemente, a alta correlação entre HA e envelhecimento foi hipotetizada por VIARO e colaboradores (2000) que o envelhecimento produz uma diminuição e alteração da atividade e da expressão da eNOS, reduzindo sua atividade e contribuindo para o quadro hipertensivo, além de outras patologias associadas como aterosclerose e trombose. Assim, algumas alterações genéticas (polimorfismos) associadas ao processo natural de envelhecimento podem estar tendo um efeito direto no controle cardiovascular, especialmente no controle da pressão arterial.

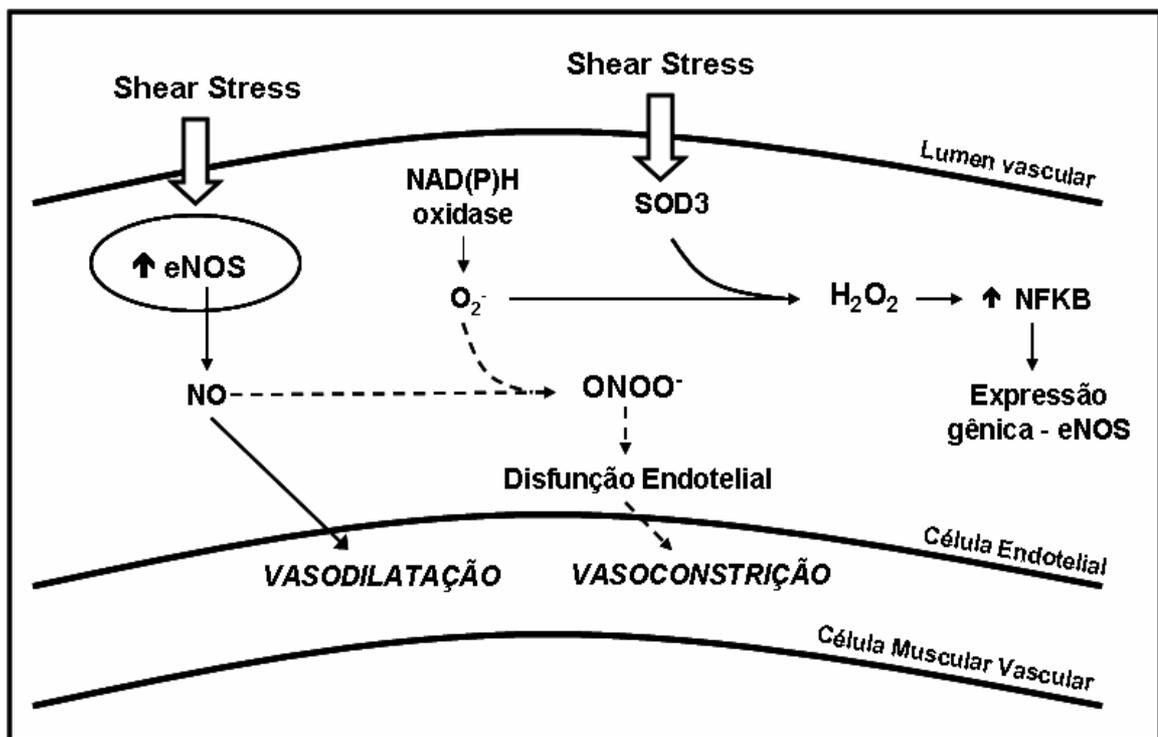
## **2.4 BIODISPONIBILIDADE DO ÓXIDO NÍTRICO**

Na hipótese de que a produção de NO esteja ocorrendo normalmente, um outro fator que poderia estar contribuindo para elevar os níveis da PA é a biodisponibilidade do NO, ou seja, alguma substância estaria neutralizando seu efeito cardioprotetor.

Inúmeros estudos têm mostrado que a alta atividade da enzima NAD(P)H, estimulada por fatores humorais (citocinas), agentes vasoativos e fatores físicos como o shear

stress, é capaz de produzir uma alta quantidade de ânions superóxido ( $O_2^-$ ), também conhecida como espécies reativas de oxigênio (EROS) (ULLRICH e BACHSCHMID, 2000; JUNG *et al.*, 2003; TOUYZ e SCHIFFRIN, 2004; GROBE *et al.*, 2006). Uma alta exposição às EROS são comumente chamadas de estresse oxidativo.

Fisiologicamente, a EROS é produzida em baixas concentrações e funciona como um sinalizador molecular para manter a integridade vascular e como um regulador da função endotelial (TOUYZ, 2004; RUSH *et al.*, 2005). Mas, quando em altas concentrações, os  $O_2^-$  por possuírem alta afinidade com a molécula de NO produzida pelas células endoteliais, irão reagir com o NO formando os peroxynitrito ( $ONOO^-$ ). Estas moléculas são responsáveis em grande parte pelo processo de disfunção endotelial (Figura 2.2) e pela diminuição da concentração de NO. Desta forma, a produção de  $ONOO^-$  trará um comprometimento para a biodisponibilidade do NO e conseqüentemente para o grau de vasodilatação (TOUYZ, 2004; RUSH *et al.*, 2005).



**FIGURA 2.2:** Ilustração da função do óxido nítrico (NO) no vaso sanguíneo e do processo de biodisponibilidade do NO produzido pelas células endoteliais. As setas contínuas indicam o efeito benéfico do NO no sistema cardiovascular, enquanto que as setas pontilhadas indicam a diminuição da biodisponibilidade do NO e a conseqüente vasoconstrição.

Uma das formas de se impedir a formação do  $\text{ONOO}^-$  e, conseqüentemente diminuir a incidência de qualquer disfunção endotelial, é através do aumento de antioxidantes, que podem ser químicos (glutadione, vitaminas C e E e os  $\beta$ -caroteno) e enzimáticos (superóxido dismutase) (RUSH *et al.*, 2005). Diversos autores apontam as superóxido dismutase (SOD) como uma possibilidade promissora para o combate da disfunção endotelial induzida pelo aumento da EROS (ULLRICH e BACHSCHMID, 2000; JUNG *et al.*, 2003; TOUYZ e SCHIFFRIN, 2004; RUSH *et al.*, 2005; KALS *et al.*, 2006).

As SOD são substâncias que possuem alta afinidade com os  $\text{O}_2^-$ . A reação entre ambos (SOD e  $\text{O}_2^-$ ) estaria impedindo a formação dos  $\text{ONOO}^-$  (figura 2.2), beneficiando o sistema cardiovascular em praticamente dois mecanismos. Primeiro, quando o SOD reage com os  $\text{O}_2^-$ , a concentração de  $\text{O}_2^-$  diminui. Com esta diminuição, a quantidade de NO para o sistema aumenta, pois o NO não estaria reagindo com o  $\text{O}_2^-$ , aumentando desta forma sua biodisponibilidade. Segundo, a reação  $\text{O}_2^- + \text{SOD}$  gera a produção de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) que possui uma importante função de ativar a NF-kB, que é um mecano-receptor presente nas células endoteliais, que tem como uma de suas funções o aumento da expressão gênica da eNOS (FUKAI, 2007). Assim, além de aumentar a biodisponibilidade do NO, este mecanismo estaria aumentando o estímulo para a produção de NO (ULLRICH e BACHSCHMID, 2000; JUNG *et al.*, 2003; TOUYZ e SCHIFFRIN, 2004; RUSH *et al.*, 2005).

Desta forma o aumento da atividade da SOD é essencial para o funcionamento normal do NO devido sua ação em converter  $\text{O}_2^-$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$ , re-estabelecendo os níveis normais de NO, contribuindo assim para a vasodilatação e conseqüentemente diminuição da incidência de HA. Esta afirmação está de acordo com o estudo de Jung e colaboradores (2007) que constataram que a diminuição da atividade da SOD pode contribuir para uma diminuição dos níveis de NO e conseqüentemente de vasodilatação. Neste estudo os autores

reportaram que a inativação da SOD teve como consequência um aumento da disfunção vascular e um aumento das concentrações de EROS.

Da mesma forma para a produção de NO, um dos principais estímulos para o aumento da atividade da SOD tem sido o aumento do *shear stress* proveniente do exercício físico (WANG *et al.*, 2000; TOUYZ, 2004; GUZIK *et al.*, 2005; RUSH *et al.*, 2005; LANDMESSER *et al.*, 2006). Ou seja, o exercício físico assume um importante papel para o controle cardiovascular, atuando neste caso, no aumento da biodisponibilidade do NO.

## **2.5 INFLUÊNCIA GENÉTICA, SUPEROXIDO DISMUTASE E EXERCÍCIO FÍSICO**

Um das formas que tem sido apontado por diversos estudos para o aumento da produção de NO (DELP *et al.*, 1993; SESSA *et al.*, 1994; HIGASHI *et al.*, 1999; KINGWELL, 2000) e para o aumento da atividade da SOD (ULLRICH e BACHSCHMID, 2000; JUNG *et al.*, 2003; TOUYZ e SCHIFFRIN, 2004; RUSH *et al.*, 2005) tem sido o *shear stress* proveniente de estímulos gerados pelo exercício físico.

Sabe-se que o exercício físico aumenta o fluxo sanguíneo pulsátil elevando a pressão nas paredes das artérias e, esta pressão, denominada de *shear stress*, estimula mecanossensores presentes nas células endoteliais tais como as proteínas G, os canais iônicos, as junções intercelulares, as integrinas e/ou os lipídeos de membrana. A capacidade das células endoteliais de perceber e responder às mudanças no fluxo sanguíneo é um fator essencial na regulação do tônus vascular e envolve a ativação de fatores de crescimento celular que promove o remodelamento da parede arterial e manutenção da integridade do endotélio.

Desta forma o exercício físico tem sido considerado como um estimulador da síntese de NO pelas células endoteliais (PALMER *et al.*, 1988) e do aumento da atividade da SOD (RUSH *et al.*, 2005), via *shear stress*. Mesmo em casos em que a presença de

polimorfismos do gene da eNOS estivesse diminuindo a produção de NO, o aumento do *shear stress* pelo exercício físico estaria relacionado a um aumento do estímulo da região promotora deste gene, acarretando assim um aumento da expressão gênica e, conseqüentemente da produção de NO (BRAY, 2000; HAGBERG *et al.*, 2000; DATA *et al.*, 2003; ROSSI *et al.*, 2003; RUTHERFORD, 2003; HIGASHI e YOSHIZUMI, 2004; JONES e HINGORANI, 2005).

É importante salientar que o exercício físico parece ter efeito de proteção na integridade do endotélio, quer seja aumentando a produção de NO em vasos com endotélio íntegro, ou restaurando a disfunção endotelial, por impedir a formação dos peroxinitrito. HIGASHI e colaboradores (1999) confirmam esta afirmação ao comparar a responsividade vascular entre indivíduos hipertensos e normotensos diante do exercício físico aeróbio. Os autores observaram que voluntários normotenso apresentaram relaxamento dos vasos sanguíneos significativamente maiores do que o grupo hipertenso após a sessão de exercício físico, sugerindo assim a existência de disfunção endotelial no grupo hipertenso. E, comparando grupos hipertensos controle e praticantes de um programa de 12 semanas de exercício físico aeróbio, a responsividade vascular foi aumentada no grupo que se exercitava, ou seja, o exercício físico contribui para restabelecer a função endotelial. Desta forma, o papel do exercício físico torna-se essencial para o controle cardiovascular, tendo resultados significativos no controle da pressão arterial, atuando de forma preventiva e/ou terapêutica em diversas patologias como a aterosclerose, hipertensão arterial e as dislipidemias.

## **2.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Por ser o exercício físico considerado um importante estimulador do *shear stress*, e este por sua vez, um importante estimulador da produção do óxido nítrico pelas células endoteliais e do aumento da biodisponibilidade do NO via aumento da atividade da

superóxido dismutase, o exercício físico pode ser considerado um importante meio para o tratamento não-farmacológico para pressão arterial e, em especial, como uma ferramenta eficaz para a prevenção de hipertensão arterial na população idosa, diminuindo assim os fatores de risco para as doenças cardiovasculares.

## CAPÍTULO 3

### *Influência das variáveis de composição corporal e do perfil lipídico nos níveis de pressão arterial em adultos de meia idade e idosos portadores do polimorfismo T-786C do gene da eNOS<sup>3</sup>*

#### RESUMO

Dentre os diversos mecanismos envolvidos na gênese da hipertensão arterial, o polimorfismo do gene da eNOS (T-786C) associado à obesidade e dislipidemias poderiam estar exercendo um papel decisivo para a elevação dos níveis pressóricos. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar qual a interferência que os valores de composição corporal e do perfil lipídico estariam exercendo sobre os níveis de pressão arterial em indivíduos portadores do polimorfismo T-786C do gene da eNOS. Os participantes foram agrupados de acordo com a genotipagem (TT e TC+CC) e o nível de pressão arterial (normotenso e hipertenso) formando 4 grupos. Para as variáveis de composição corporal foram mensurados o índice de massa corporal (IMC) e porcentagem de gordura corporal (%GC) e para o perfil lipídico colesterol total, LDL-c, HDL-c, triglicérides e glicose. As únicas diferenças encontradas foram no IMC para o grupo G4 (G1 –  $25,9 \pm 3$ ; G2 –  $28,0 \pm 5$ ; G3 –  $25,9 \pm 4$ ; G4 –  $29,1 \pm 5$  kg/m<sup>2</sup>) e os valores de pressão arterial sistólica e diastólica dos grupos hipertensos quando comparados aos grupos normotensos (G1 –  $122,8 \pm 8$  /  $80,7 \pm 3$ ; G2 –  $142,9 \pm 6$  /  $90,5 \pm 5$ ; G3 –  $123,1 \pm 8$  /  $79,0 \pm 4$ ; G4 –  $141,4 \pm 7$  /  $91,4 \pm 6$  mmHg). Desta forma, os resultados indicaram que os valores de composição corporal e perfil lipídico foram similares, devido à ausência de diferenças em quase todas as variáveis, indicando que tais valores estariam exercendo pouca interferência sobre os níveis de pressão arterial independentemente do genótipo da eNOS.

**Palavras Chave:** Pressão Arterial, Polimorfismo T-786C do gene da eNOS, Composição corporal e Perfil lipídico

---

<sup>3</sup>Estudo desenvolvido no Departamento de Educação Física – UNESP / Rio Claro, Laboratório de Farmacologia e no Hemocentro – UNICAMP / Campinas.

### 3.1 INTRODUÇÃO

Dentre os vários mecanismos de controle da pressão arterial, o óxido nítrico (NO), por ser um potente vasodilatador, tem recebido grande atenção. Em concentrações normais, o NO estaria proporcionando um grau de vasodilatação suficiente para manter os níveis pressóricos dentro de um padrão considerado normal. Em contrapartida, baixas concentrações de NO estariam relacionadas a um menor grau de vasodilatação, exercendo assim uma influência direta sobre os valores de pressão arterial (MONCADA *et al.*, 1991; DOMINICZAK e BOHR, 1995; KELLY *et al.*, 1996; DREXLER e HORNIG, 1999; CRYSTAL *et al.*, 2001; NAPOLI *et al.*, 2006).

Alguns fatores podem estar relacionados a uma menor concentração de NO, por exemplo, pode-se citar os fatores genéticos, obesidade e dislipidemias.

Os fatores genéticos estão relacionados diretamente com a produção de NO. Tem sido reportado pela literatura que o polimorfismo T-786C do gene da “óxido nítrico sintase endotelial” (eNOS) possui a capacidade de diminuir a atividade promotora deste gene, acarretando numa diminuição de sua função. O polimorfismo T-786C significa que os indivíduos portadores do alelo C possuem a substituição do nucleotídeo timina (T) pelo nucleotídeo citosina (C) e, esta substituição além de estar relacionado com a diminuição da produção de NO, exerce uma influência direta sobre os níveis pressóricos desses indivíduos (YOSHIMURA *et al.*, 2000; DATA *et al.*, 2003; ERBS, 2003; TAVERNA *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2006; SANDRIM, 2006).

Com relação à composição corporal, de acordo com a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) a obesidade tem sido apontada como uma importante condição que predispõe à morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares (SBEM, 2006). Em especial, a obesidade possui uma alta relação com a hipertensão arterial devido à

sobrecarga de trabalho imposta ao coração e pelo aumento da resistência periférica nos vasos sanguíneos (YETIK-ANACAK e CATRAVAS, 2006).

Este aumento da resistência periférica pode estar associado à formação de placas de gordura nas artérias (aterosclerose) provenientes de níveis aumentados de LDL-colesterol (LDL-c). Na realidade, acredita-se que a presença de LDL-c oxidado seja a primeira etapa no processo de desenvolvimento da aterosclerose e isso, está estreitamente relacionado à hipertensão arterial (PARTHASARATHY *et al.*, 1992).

Desta forma, as dislipidemias também assumem um papel importante para o controle da pressão arterial, pois além de estarem relacionadas à obesidade, o LDL-c possui uma relação direta com a biodisponibilidade do NO. O LDL-c, por possuir uma associação com o aumento da atividade da NAD/NADPH oxidase, fator fundamental para a formação dos ânions superóxido (HEITZER *et al.*, 1996; DREXLER e HORNIG, 1999; CURI, 2002; ROSENSON, 2004), estaria contribuindo para o aumento desses ânions, que por sua vez, além de contribuírem para a oxidação do LDL-c, contribuem para a diminuição da biodisponibilidade do NO devido à sua grande afinidade com a molécula de NO. Assim, a relação da hipercolesterolemia com a diminuição da biodisponibilidade do NO é associada a uma rápida degradação do NO provocado pelo aumento da produção de ânions superóxidos, diminuindo a concentração dos fatores relaxantes derivados do endotélio (OHARA *et al.*, 1993; DREXLER e HORNIG, 1999).

Assim, o LDL-c pode estar relacionado ao aumento da pressão arterial devido à disfunção endotelial provocada pela diminuição da biodisponibilidade do NO (OHARA *et al.*, 1993; BILSBOROUGH *et al.*, 2003).

Em termos gerais, tanto a obesidade quanto as dislipidemias, poderiam estar influenciando no grau de vasodilatação. Assim, em estudos que envolvam a análise de NO, há a necessidade de se mensurar as variáveis de composição corporal (CC), perfil lipídico e glicemia (PLG), tornando possível verificar a influência destas variáveis sobre as concentrações de NO e, conseqüentemente sobre os valores pressóricos da população estudada. Essas variáveis incluem: para a composição corporal o índice de massa corporal (IMC) e porcentagem de gordura corpora (%GC); no perfil lipídico o colesterol total (CT), as lipoproteínas de baixa e alta densidade (LDL-c e HDL-c respectivamente), os triglicérides (TG) e a glicemia (GL).

## **3.2 OBJETIVO**

### **3.2.1 Objetivo Geral**

O objetivo geral do presente estudo foi verificar a influência que os valores de composição corporal, perfil lipídico e glicemia estariam exercendo sobre os níveis de pressão arterial em adultos de meia idade e idosos portadores do polimorfismo T-786C do gene da eNOS.

### **3.2.2 Objetivos Específicos**

- a) Relacionar a presença do polimorfismo T-786C com os níveis de pressão arterial de adultos de meia idade e idosos;
- b) Analisar a associação existente entre os valores de composição corporal, perfil lipídico e glicemia com o polimorfismo T-786C do gene da eNOS e pressão arterial de indivíduos do meia idade e idosos.

### 3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

*O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da “Universidade Estadual Paulista” e, após terem sido fornecidas e discutidas informações de todos os procedimentos e os riscos de participação no estudo, todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê.*

Os participantes foram recrutados através de panfletos e anúncios dentro da comunidade universitária da “Universidade Estadual Paulista”, áreas circunvizinhas à universidade e através de visitas a grupos de terceira idade da cidade de Rio Claro. Para a participação neste estudo os seguintes *critérios de inclusão* foram adotados: idades entre 50 e 75 anos; não fumante; não diabético (nível de glicose em jejum < 130 mg/dL); limite máximo de pressão arterial sistólica (PAS) de repouso de 159mmHg e de pressão arterial diastólica (PAD) 99mmHg (SBH - Estágio 1 de hipertensão); Índice de Massa Corporal (IMC) menor que 40; ter realizado um teste de esforço com resultado “normal” e não ter nenhuma outra condição médica ou ortopédica que poderiam impedir a realização de exercício físico; não ter diagnosticado nenhuma doença cardiovascular (angina, doenças valvulares), cerebrovascular, neurológica ou psiquiátrica; não fazer uso de qualquer medicação conhecida que afete o metabolismo de glicose ou a hemodinâmica renal. As pessoas que responderam aos anúncios ou aos convites foram previamente examinadas para obter informações sobre a idade, massa corporal e estatura, tabagismo, localização e acesso para o transporte, hábito de atividade física, condições médicas e uso de medicação para determinar suas qualificações e interesses e, estando às informações de acordo com os critérios de inclusão, os participantes foram qualificados para iniciarem as avaliações propostas pelo estudo.

Após esta primeira etapa, os participantes foram submetidos a uma bateria de testes e, todos deveriam estar a pelo menos 24 horas sem ter realizado qualquer exercício físico. A bateria de teste compreendeu as seguintes avaliações:

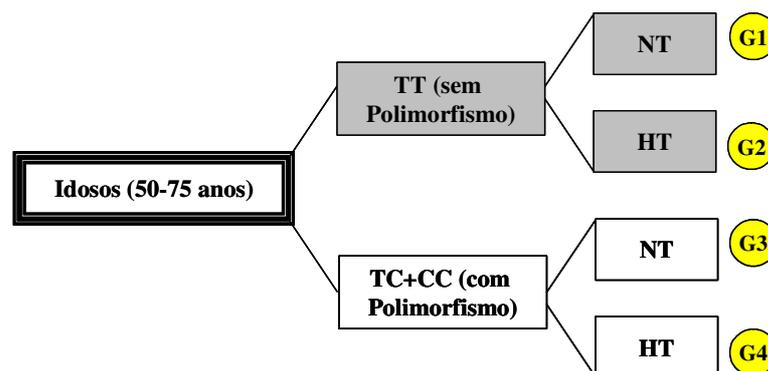
*a) Aferição da Pressão Arterial:* Para se determinar os valores de pressão arterial (PA) do indivíduo foram realizadas 3 registros da PA em dias separados, utilizando-se um esfigmomanômetro aneróide com tamanho adequado para o diâmetro do braço do participante e estetoscópio, após o participante estar a pelo menos 15 minutos na posição sentada e de repouso. A classificação em hipertenso e normotenso foi realizada a partir da média entre as três aferições da pressão arterial;

*b) Análise sanguínea:* Após jejum de 12 horas, foram coletadas, por uma enfermeira especializada neste tipo de coleta, com material descartável, 10ml de sangue venoso através da veia antecubital. Esta amostra foi dividida em duas porções, sendo 5ml destinados para a determinação de exame bioquímico de rotina e, os outros 5ml destinados para a análise genética da eNOS. Os exames bioquímicos compreenderam as análises de colesterol total (CT), HDL-colesterol (HDL-c), LDL-colesterol (LDL-c), triglicérides (TG) e glicemia (GL), pelos métodos enzimáticos-colorimétrico, através de kits comerciais (LABORLAB).

*c) Análise do polimorfismo T-786C do gene da eNOS:* O DNA dos participantes, obtidos das células brancas, mais especificamente de monócitos periféricos, e a determinação do gene da eNOS T-786C foi feita de acordo com o protocolo de DATA et al (2003) (descrição detalhada ver anexo 3). Esse método consiste basicamente em: extração do DNA dos leucócitos das amostras de sangue utilizando a técnica de extração por Fenol-Cloroformio. O genótipo eNOS -786 foi determinado pela técnica de amplificação da “reações de cadeia de polimerase” (PCR) usando *primers* específicos: F:5’- CACCCAGGCCACCCCAACT-3’ e R:5’-GCCGCAGGTCGACAGAGAGACT-3’. O DNA foi, então, desnaturado por 2 minutos a 96°C, seguido de 35 ciclos de desnaturação (30s, 96°C), anelamento (30s, 65°C), extensão

(60s, 72°C) e após os 35 ciclos, um período de estabilização por 5 minutos a 72°C. Em seguida, após a técnica de PCR foram realizadas as digestões dos produtos do PCR com a enzima *MspI* e a análise de eletroforese em um gel composto de 2% agarose. A partir deste procedimento, o diagnóstico do polimorfismo T-786C do gene da eNOS passa a ser possível, haja vista que o alelo T produz um fragmento de 415 bp e o alelo C produz um fragmento de 370 bp e 45 bp, sendo possível à determinação dos indivíduos portadores do alelo C (TC e CC) e os indivíduos portadores de alelo T (TT).

Com a genotipagem (TT e TC+CC) e com a classificação de pressão arterial (normotenso e hipertenso), quatro grupos foram formados de acordo com o organograma 1.



**ORGANOGRAMA 1:** Representação do 4 grupos formados de acordo com o genótipo da eNOS e com o nível inicial de pressão arterial

Cabe ressaltar que o grupo G3 era composto por participantes que faziam uso de medicação anti-hipertensiva, ou seja, eram participantes hipertensos mas que apresentaram a pressão arterial dentro dos valores normais preconizados pela SBH (2006) nas três aferições de pressão arterial. A medicação dos participantes não foi interrompida durante a realização do estudo.

*d) Composição Corporal:* Para o cálculo do IMC (peso/estatura<sup>2</sup>) foram mensuradas as medidas de massa corporal e estatura e, para o cálculo do percentual de gordura corporal (%GC) foi utilizado a avaliação das dobras cutâneas baseando-se no protocolo de Jackson & Pollock (ACSM, 2000), que considera a somatória de 4 pregas cutâneas para os homens (tríceps, abdominal, supra-ilíaca e coxa) e, 5 pregas para as mulheres (subescapular, abdômen, supra-ilíaca, tríceps e coxa). Em cada dobra foram realizadas 3 mensurações consecutivas e, o resultado final consistiu da média entre as 3 medições.

### **3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para análise dos resultados foram utilizados uma análise descritiva (média e desvio-padrão) e uma análise de variância (ANOVA 2 X 2) tendo como fatores o polimorfismo do gene da eNOS (TT e TC+CC) e a classificação da pressão arterial (NT e HT). Nesta análise foram considerados como variáveis dependentes o perfil lipídico e composição corporal e, como independentes a genotipagem e o nível de pressão arterial, adotando-se o nível de significância de  $p < 0,05$ .

Uma análise de correlação de Pearson também foi utilizada para se verificar a relação existente entre as variáveis de composição corporal, perfil lipídico e pressão arterial dos participantes deste estudo.

### **3.5 RESULTADOS**

Após a divulgação dos anúncios e dos convites serem realizados, aproximadamente 180 idosos entraram em contato para participar do estudo, mas, apenas 142 idosos estavam dentro dos critérios de inclusão estabelecidos previamente. Todos os 142 participantes selecionados somente iniciaram as atividades propostas após serem esclarecidos sobre todos os procedimentos da pesquisa.

### 3.5.1 Característica da amostra

Para se verificar como o polimorfismo T-786C do gene da eNOS se distribuiu com relação às características dos participantes deste estudo, foi realizado uma análise descritiva diferenciando homens e mulheres, hipertensos e normotensos e, portadores ou não do alelo C.

É importante salientar que ambos os genótipos TC e CC foram agrupados em um mesmo grupo, constituindo o grupo TC+CC. Esta união ocorreu porque, além do número de indivíduos portadores do genótipo CC ser reduzido, diversos estudos têm apontado que ambos os genótipos apresentam respostas similares com relação à expressão do gene da eNOS (DATA *et al.*, 2003; ROSSI *et al.*, 2003; DENGEL *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2006; SANDRIM, 2006).

Desta forma, o padrão de distribuição do genótipo da eNOS, entre homens e mulheres, com relação ao nível de pressão arterial estão sumarizados na tabela 3.1.

**TABELA 3.1:** Distribuição do polimorfismo do gene da eNOS (T-786C) entre homens e mulheres, hipertensos e normotensos.

	G1 (n=19)	G2 (n=27)	G3 (n=38)	G4 (n=58)
	TT/NT	TT/HT	TC+CC/NT	TC+CC/HT
Homens (n=24)	2	8	5	9
Mulheres (n=118)	17	19	33	49

Os dados representam o número de participantes de acordo com o genótipo da eNOS (T-786C), sexo e nível de pressão arterial. G1 - TT/NT – grupo 1, não polimórfico e normotenso; G2 - TT/HT – grupo 2, não polimórfico e hipertenso; G3 - TC+CC/NT – grupo 3, polimórfico e normotenso; G4 - TC+CC/HT – grupo 4, polimórfico e hipertenso.

Conforme pode ser constatado, o número de mulheres participantes deste estudo foi maior que o de homens, especialmente para os grupos G3 e G4 e, o número de

indivíduos portadores do polimorfismo T-786C da eNOS (TC+CC) também foi maior do que os não portadores do alelo C (TT), especialmente para o sexo feminino.

Apesar desta diferença, a prevalência do polimorfismo T-786C do gene da eNOS entre homens e mulheres é praticamente a mesma, haja vista que dos 24 homens analisados, 14 apresentaram o polimorfismo (60%), enquanto que das 118 mulheres, 82 apresentaram o polimorfismo (69%).

Somando-se a similaridade da prevalência deste polimorfismo entre homens e mulheres e o número de participantes masculinos ser reduzido com relação ao número de mulheres, optou-se por fazer todas as análises não discriminando os resultados entre homens e mulheres.

Desta forma, a distribuição dos participantes com relação ao polimorfismo do gene da eNOS (T-786C) e de acordo com a classificação da pressão arterial estão sumarizados na tabela 3.2.

**TABELA 3.2:** Distribuição do genótipo da eNOS (T-786C) e da incidência de hipertensão arterial de 142 adultos de meia idade e idosos.

	TT	TC + CC
Normotensos	19 (13 %)	38 (27 %)
Hipertensos	27 (19 %)	58 (41 %)

Os dados representam o número de participantes de acordo com o genótipo da eNOS (T-786C), e nível de pressão arterial. TT – não polimórfico; TC+CC – polimórfico.

Com relação aos valores de pressão arterial, dos 142 participantes, 57 (40%) foram considerados como normotenso enquanto os outros 85 participantes (60%) como hipertenso. Desta forma, pode-se notar que o número de pessoas hipertensas foi maior do que o de normotensas independentemente do genótipo. Mesmo quando os participantes foram

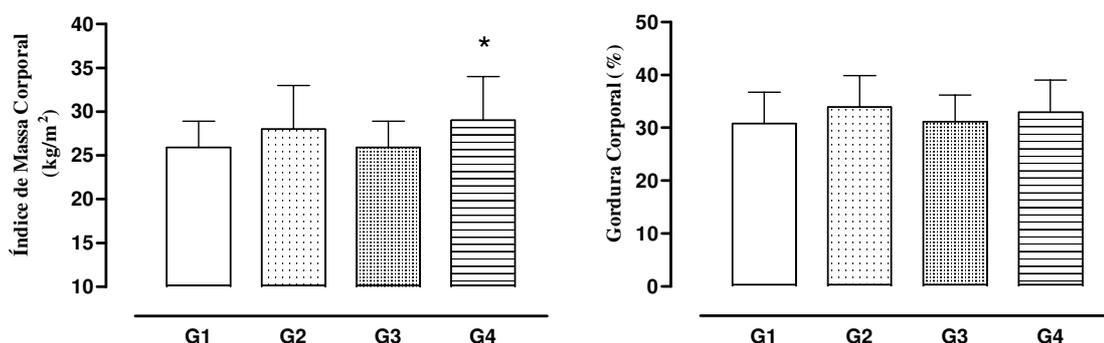
divididos em grupos conforme a presença do alelo C, o número de hipertensos também foi maior, especialmente para o grupo TC+CC (G4).

Especificamente para a genotipagem, 46 participantes (32 %) foram classificados como TT (não portador do polimorfismo) enquanto que 96 participantes (68 %) como TC+CC (portadores do polimorfismo).

### 3.5.2 Perfil Lipídico, Glicemia e Composição Corporal

Apesar de ambos os grupos hipertensos apresentarem valores de IMC ligeiramente superiores do que os grupos normotensos (G1 -  $25,9 \pm 3$  / G2 -  $28,0 \pm 5$  / G3 -  $25,9 \pm 4$  / G4 -  $29,1 \pm 5$ ), apenas o G4 apresentou diferenças com relação aos grupos G1 e G3. Este resultado mostra que independentemente do genótipo, indivíduos com valores maiores de IMC tendem a apresentarem valores maiores de pressão arterial (figura 3.1).

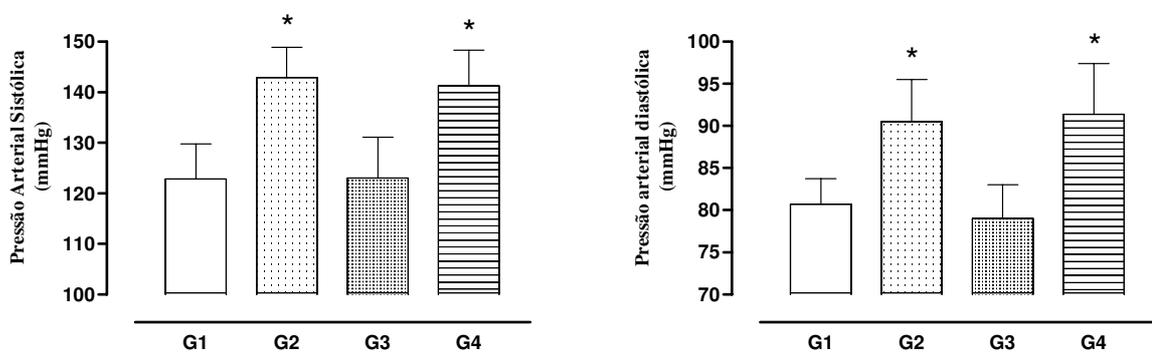
A porcentagem de gordura corporal não apresentou diferenças com relação aos grupos (G1 -  $30,8 \pm 6$  / G2 -  $33,9 \pm 6$  / G3 -  $31,2 \pm 5$  / G4 -  $33,0 \pm 7$ ). Este resultado ocorreu independentemente do genótipo ou nível de pressão arterial, possuindo valores similares entre os grupos (figura 3.1)\*.



**FIGURA 3.1:** Ilustração gráfica dos valores de composição corporal de 142 voluntários subdivididos conforme o nível de pressão arterial e genotipagem. G1 – TT/NT; G2 – TT/HT; G3 – TC+CC/NT; G4 – TC+CC/HT. \*Diferença estatística com relação aos grupos normotensos G1 e G3 ( $p < 0,05$ ).

\*Tabela 3.3: Valores antropométricos e pressão arterial de 142 voluntários subdivididos conforme o nível de pressão arterial e genotipagem da eNOS (ver anexo 5).

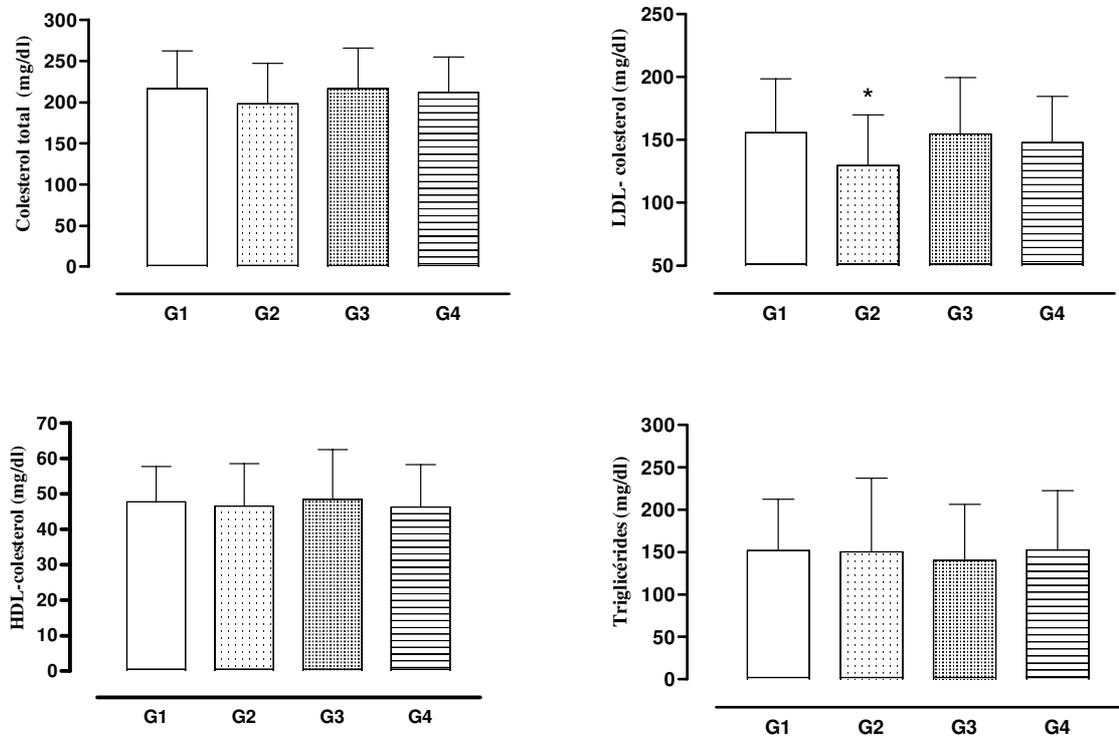
Com relação aos valores de pressão arterial sistólica (G1 -  $122,8 \pm 8$  / G2 -  $142,9 \pm 6$  / G3 -  $123,1 \pm 8$  / G4 -  $141,4 \pm 7$ ) e pressão arterial diastólica (G1 -  $80,7 \pm 3$  / G2 -  $90,5 \pm 5$  / G3 -  $79,0 \pm 4$  / G4 -  $91,4 \pm 6$ ), a ANOVA detectou diferenças tanto para a PAS quanto para a PAD entre os grupos, conforme a própria divisão estabelecida previamente em normotenso e hipertenso (figura 3.2). Esta diferença foi detectada somente com relação aos valores de pressão arterial, independentemente do polimorfismo T-786C do gene da eNOS.



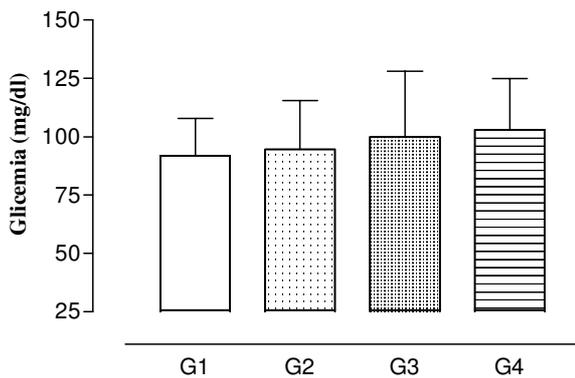
**FIGURA 3.2:** Ilustração gráfica dos valores de Pressão Arterial de 142 voluntários subdivididos conforme o nível de pressão arterial e genotipagem da eNOS. G1 – TT/NT; G2 – TT/HT; G3 – TC+CC/NT; G4 – TC+CC/HT. \*Diferença com relação aos grupos normotensos G1 e G3 ( $p < 0,05$ ).

Além das variáveis de composição corporal e pressão arterial, também foi realizado a análise do perfil lipídico e glicemia e, nenhuma diferença foi encontrada para as variáveis CT (G1 -  $216,7 \pm 46$  / G2 -  $197,97 \pm 49$  / G3 -  $216,94 \pm 49$  / G4 -  $212,03 \pm 43$ ), HDL-c (G1 -  $47,72 \pm 10$  / G2 -  $46,53 \pm 12$  / G3 -  $48,43 \pm 14$  / G4 -  $46,24 \pm 12$ ), TG (G1 -  $151,45 \pm 61$  / G2 -  $150,19 \pm 87$  / G3 -  $139,92 \pm 66$  / G4 -  $152,29 \pm 70$ ) e GL (G1 -  $91,95 \pm 16$  / G2 -  $94,59 \pm 21$  / G3 -  $100,07 \pm 28$  / G4 -  $102,93 \pm 22$ ). A única variável que apresentou diferenças estatísticas foi o LDL-c (G1 -  $155,56 \pm 43$  / G2 -  $129,74 \pm 45$  / G3 -  $154,65 \pm 45$  /

G4 -  $147,60 \pm 42$ ), que apresentou valores relativamente mais baixos para o grupo G2 com relação aos demais grupos (Figuras 3.3 e 3.4)\*.



**FIGURA 3.3:** Ilustração gráfica das variáveis de perfil lipídico, após um jejum de 12 horas, de 142 voluntários subdivididos em 4 grupos conforme o nível de pressão arterial e genotipagem da eNOS. G1 – TT/NT; G2 – TT/HT; G3 – TC+CC/NT; G4 – TC+CC/HT. \*Estatisticamente significante com relação aos grupos G1, G3 e G4 ( $p < 0,05$ ).



**FIGURA 3.4:** Ilustração gráfica dos valores de glicose sanguínea, após um jejum de 12 horas, de 142 voluntários subdivididos em grupos conforme o nível de pressão arterial e genotipagem da eNOS. G1 – TT/NT; G2 – TT/HT; G3 – TC+CC/NT; G4 – TC+CC/HT. ANOVA não detectou diferença entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

\* Tabela 3.4: Perfil lipídico e glicêmico de 142 voluntários subdivididos em grupos conforme o nível de pressão arterial e genotipagem da eNOS (ver anexo 5).

Como somente o grupo G2 apresentou valores de LDL-c inferiores e, devido a similaridade de resultados nos quatro grupos, é possível afirmar que o fator perfil lipídico e glicemia não foram considerados como fatores limitadores deste estudo, haja vista que todas as variáveis estariam exercendo a mesma influência em todos os grupos.

Confirmando este resultado, a análise de correlação mostrou moderada a alta correlação somente entre as variáveis de uma mesma categoria, ou seja, somente entre as variáveis de CC, PLG e PA.

### **3.6 DISCUSSÃO**

#### **3.6.1 Característica da amostra**

Em termos gerais, quando esses resultados são analisados diferenciando homens e mulheres, pode-se observar que em todos os grupos o número de mulheres foi maior do que o número de homens, especialmente para os grupos G3 e G4. Embora o número de mulheres seja superior, a prevalência do polimorfismo T-786C do gene da eNOS é praticamente a mesma, haja vista que a proporção entre homens e mulheres foi muito próxima (60 e 69% respectivamente). Apesar do número de mulheres ser maior que o número dos homens, a variável sexo, não é um fator que está influenciando os resultados deste estudo. Assim, esses resultados sugerem que a prevalência deste polimorfismo não é dependente do sexo.

Com relação à distribuição do polimorfismo T-786C do gene da eNOS, os resultados mostraram que 32% dos participantes foram diagnosticados como TT, enquanto 68% como TC+CC. Este resultado está de acordo com os estudos de Nagasaki (TT – 36% / TC+CC – 64%), Tanus-Santos (TT – 32% / TC+CC – 68%), Rossi (TT – 29,4% / TC+CC – 70,6%) e Sandrim (TT – 33% / TC+CC – 67%) que apresentaram uma distribuição muito

próxima às encontradas por este estudo (TANUS-SANTOS *et al.*, 2001; ROSSI *et al.*, 2003; NAGASSAKI *et al.*, 2005; SANDRIM *et al.*, 2006).

Com relação a variável pressão arterial, o número de participantes hipertensos (n=85) foi maior do que o de normotensos (n=57) e os grupos diagnosticados como polimórficos para o gene da eNOS (G3 e G4) foram os que apresentaram os maiores números de integrantes hipertensos (96).

De acordo com a literatura, a presença do polimorfismo do gene da eNOS (T-786C) estaria relacionada a uma menor produção de NO e, conseqüentemente, a uma menor vasodilatação, aumentando assim a incidência de hipertensão arterial (SCHULZ e TRIGGLE, 1994; MIYAMOTO *et al.*, 1998; MONCADA e HIGGS, 2006; ZAGO e ZANESCO, 2006). Desta forma, o número de hipertensos e de portadores do polimorfismo deste estudo estariam corroborando, em partes, com a literatura, pois a maioria dos indivíduos portadores do polimorfismo são hipertensos. Mas, esta relação existente entre os valores de pressão arterial e a presença do polimorfismo da eNOS estaria de acordo com as características descritas pela literatura apenas para os grupos G1 e G4, ou seja, pessoas não polimórficas (G1) estariam apresentando níveis normais de pressão arterial devido à contribuição que as concentrações de NO estariam exercendo e, em contrapartida, as pessoas polimórficas (G4), devido à deficiência na produção de NO, teriam seus níveis de PA relativamente elevados.

Os grupos G2 e G3 fogem um pouco desta descrição, apresentando características opostas ao que vem sendo preconizado. É importante lembrar que para o G2, indivíduos portadores do alelo T com diagnóstico de hipertensão arterial, a PA possui diversos fatores que podem estar envolvidos em sua etiologia. Neste caso, esses valores elevados de PA provavelmente estão sendo gerados por outros mecanismos envolvidos no controle da pressão arterial, como por exemplo, maior ativação do sistema nervoso simpático ou qualquer alteração renal, que podem estar gerando um quadro hipertensivo. Para o grupo

G3, pessoas portadoras do polimorfismo do gene da eNOS e que apresentam valores normais de PA, uma das justificativas para este resultado seria o fato de que a maioria dos participantes deste grupo faziam uso de medicação anti-hipertensiva. Esta medicação, provavelmente, estaria mantendo a pressão arterial desses participantes em níveis normais, compensando a provável diminuição da produção de NO.

É importante ressaltar que este resultado não reflete a prevalência populacional com relação ao polimorfismo T-786C do gene da eNOS, pois os participantes foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão, citados anteriormente, para fins deste estudo.

### **3.6.2 Perfil lipídico e composição corporal**

Com o objetivo de analisar os valores de composição corporal e o perfil lipídico com relação à genotipagem e os níveis de pressão arterial, pode-se afirmar que ambas as variáveis não se comportaram de forma dependente do polimorfismo T-786C do gene da eNOS, haja vista que praticamente nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos com relação aos valores de composição corporal e do perfil lipídico, exceto para os valores de LDL-c para o grupo G2 e IMC para o grupo G4.

Especificamente para os valores de composição corporal, os grupos hipertensos apresentaram valores de IMC relativamente mais elevados quando comparados com os grupos normotensos, mas apenas o G4 apresentou significância. Com este resultado é possível afirmar que houve uma relação com a variável hipertensão arterial independentemente da presença do polimorfismo T-786C do gene da eNOS. Este resultado foi similar ao estudo de Hamet e colaboradores (1998) que também concluíram que existe uma relação positiva entre hipertensão arterial e obesidade, mostrando uma significativa melhora nos valores de pressão arterial após a redução de peso em adultos e idosos.

Desta forma, poder-se-ia levantar a hipótese de que a obesidade estaria exercendo uma influência para os valores mais elevados de pressão arterial dos participantes desses grupos independentemente do genótipo da eNOS. Mas, contrariando esta hipótese, este estudo mostra que o fator obesidade não estaria interferindo nos resultados finais, pois apenas o G4 apresentou diferenças estatísticas para o IMC. O grupo G2 também apresentou valores elevados de pressão arterial, mas não apresentou diferenças estatísticas com relação aos grupos normotensos (G1 e G3) para as variáveis de composição corporal. Além disso, todos os 4 grupos receberam a mesma classificação de “sobrepeso”, segundo a “Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica” (ABESO) e segundo a “Sociedade Brasileira de Cardiologia” (SBC). O valor de IMC preconizado por ambas as sociedades para esta classificação seria de 25 a 30 kg/m<sup>2</sup> e, neste caso, todos os grupos estão dentro de uma mesma faixa de valores (SBEM, 2006). Como os grupos normotensos receberam a mesma classificação que os grupos hipertensos, o fator obesidade estaria exercendo pouca influência nos valores de pressão arterial dos participantes deste estudo. Esta justificativa está em concordância com Goulart e Benseñor (2006) que encontraram resultados similares de IMC mostrando valores relativamente elevados nos grupos hipertensos com relação aos normotensos, mas, ambos os grupos, com uma mesma classificação para a composição corporal.

Um outro fator que poderia estar justificando a ausência de interferência da obesidade nos resultados gerais deste estudo são os valores de gordura corporal. Além de nenhuma diferença ser encontrada para esta variável, todos os grupos também receberam a mesma classificação de “sobrepeso” ou “acima da média” de acordo com ambas as sociedades (SBEM, 2006; SBH, 2006; SBC, 2007).

Em termos gerais este resultado pode ser considerado como um fator positivo para este estudo, pois, a terminologia sobrepeso foi atribuída para todos os grupos tanto para

o IMC quanto para a %GC e isso, pode estar minimizando a interferência que o fator composição corporal estaria exercendo nos valores de pressão arterial para os participantes deste estudo. Ainda, o polimorfismo T-786C do gene da eNOS se comportou de forma independente das variáveis de composição corporal.

Para o perfil lipídico, todos os grupos apresentaram resultados muito próximos da margem que os classifica entre “normais” ou “limítrofes”, fato que justifica a ausência de diferenças para estas variáveis.

Especificamente para os níveis de colesterol total, os grupos apresentam valores muito próximos ou ligeiramente acima dos valores normais segundo as diretrizes da SBC e da “Sociedade Brasileira de Hipertensão” (SBH). Com relação ao LDL-c, o grupo G2 apresentou diferenças com relação aos demais grupos e, é o único grupo que estaria dentro dos padrões considerados normais pelas SBC e SBH, enquanto que os outros três grupos receberam uma classificação “limítrofe” por apresentarem resultados ligeiramente acima do esperado para a população. Para o HDL-c, todos os grupos apresentaram valores dentro dos padrões recomendados pelas sociedades citadas anteriormente. Os níveis de triglicérides também estavam muito próximos ou ligeiramente acima dos valores recomendados em todos os grupos. Neste caso, há uma ligeira diferenciação com relação à classificação do TG, pois a SBH sugere como limite para a normalidade o valor de 150mg/dL, mas, de acordo com a SBC, este valor seria de 200mg/dL. Desta forma, os valores deste estudo estariam ligeiramente acima ou dentro da faixa considerada normal para os valores de TG. A glicemia de jejum mostrou que os voluntários estão dentro dos valores de normalidade em todos os grupos, estando de acordo com o próprio critério de inclusão para a participação neste estudo (SBEM, 2006; SBH, 2006; SBC, 2007).

Apesar dos grupos estarem praticamente dentro de um mesmo perfil bioquímico, os níveis relativamente elevados de LDL-c poderiam estar contribuindo para a

diminuição da biodisponibilidade do NO, devido ao aumento da atividade NAD(P)H e formação dos ânions superóxido, o que poderia estar causando uma diminuição da vasodilatação (HEITZER *et al.*, 1996; DREXLER e HORNIG, 1999; ROSENSON, 2004) e uma possível disfunção endotelial, fato que estaria agravando a incidência da hipertensão arterial (CHANNON e GUZIK, 2002; SAKURAI e SAWAMURA, 2003; RUSH *et al.*, 2005). Entretanto, devido ao fato dos grupos estarem praticamente com os mesmos valores, parece que o perfil lipídico dos participantes desse estudo não está sendo o fator determinante para os níveis de pressão arterial elevado dos grupos hipertensos, pois os grupos normotensos possuíam o mesmo perfil lipídico, mas, apresentaram respostas diferentes para a pressão arterial.

Este resultado também assume uma importância muito grande para este estudo, pois, a maioria dos estudos revisados, apontam para uma relação entre hipertensão arterial e perfil lipídico (HAMET *et al.*, 1998; BILSBOROUGH *et al.*, 2003), ou seja, valores elevados de colesterol total, LDL-c ou TG e, valores diminuídos de HDL-c estariam proporcionando uma elevação dos valores de pressão arterial. Para este estudo esta relação não foi confirmada, pois o perfil lipídico e os valores de glicemia foram similares em ambos os grupos hipertensos e normotensos. Um outro dado importante foi a ausência de relação com as variáveis do perfil lipídico com o polimorfismo T-786C do gene da eNOS.

Apesar dos participantes não estarem em um patamar ideal em termos de composição corporal e perfil lipídico, em nenhuma das classificações foi atribuído a terminologia “obeso” para os resultados de composição corporal e altos níveis de colesterol ou LDL-c, por exemplo, para os valores do perfil lipídico, nenhum grupo apresentou discrepâncias de acordo com as classificações das Sociedades citadas por este estudo e também pela própria análise estatística realizada. Estas classificações são de extrema importância, pois a obesidade e a hipercolesterolemia tem sido reportada como uma das

causas de várias doenças cardiovasculares, em especial a hipertensão arterial (PARTHASARATHY *et al.*, 1992; MCARDLE *et al.*, 2003; SBH, 2004; WHO, 2004; SBH, 2006) e, a ausência deste fator pode ser considerada positiva. Assim, pode-se dizer que além de todos os participantes possuírem resultados similares, o fator obesidade e hipercolesterolemia não foram um dos itens que estariam influenciando os valores de pressão arterial e, este resultado estaria acontecendo independentemente da presença do polimorfismo T-786C do gene da eNOS.

Especificamente com relação à pressão arterial, os grupos considerados hipertensos (G2 e G4) receberam a classificação de hipertensão estágio I (leve), segundo a “Sociedade Internacional de Hipertensão/OMS” (WHO, 2004) e também pela SBH (SBH, 2006) e foram estatisticamente diferentes dos grupos normotensos. Essa diferença, na realidade já era esperada, pois ela está coerente com a própria divisão realizada nos grupos o qual discrimina os participantes hipertensos e normotensos.

É interessante notar que apesar do polimorfismo T-786C do gene da eNOS apresentar uma associação positiva com a incidência da hipertensão arterial, haja vista que os fatores genéticos tem sido responsáveis por 25 a 60 % dos casos de hipertensão (MIYAMOTO *et al.*, 1998; SHOJI *et al.*, 2000; WANG e WANG, 2000; SANDRIM *et al.*, 2006) este estudo não apresentou dependência do polimorfismo com a hipertensão arterial.

Uma justificativa para este resultado é a limitação existente no próprio critério de inclusão estabelecido previamente. Por serem indivíduos que possuem os valores de pressão arterial muito próximo à margem que os classificam entre normotensos e hipertensos e, por fazerem uso de medicação anti-hipertensiva, os valores de pressão arterial não se mostraram dependentes do genótipo do eNOS para os indivíduos participantes deste estudo.

Desta forma, o polimorfismo T-786C da eNOS não pode ser considerado como um marcador de hipertensão arterial, especialmente para este estudo, mas devido a

maioria dos participantes hipertensos terem sido diagnosticados como polimórficos, este polimorfismo pode ser considerado como um indicador de hipertensão arterial.

### **3.7 CONCLUSÃO**

Com os resultados deste estudo pode-se concluir que, inicialmente existe uma grande homogeneidade de resultados entre os grupos com relação as variáveis de composição corporal e perfil lipídico. Estes resultados são positivos para este estudo, haja vista que todos os participantes estão com as mesmas condições em termos de composição corporal e perfil lipídico. Isso possibilitou uma ausência de interferência de ambos os fatores nas variáveis de pressão arterial, independentemente da presença do polimorfismo T-786C do gene da eNOS.

Este resultado de ausência de interferência das variáveis de composição corporal e perfil lipídico possibilita verificar a relação entre os valores de pressão arterial e o polimorfismo propriamente dito e, este estudo conclui que o polimorfismo T-786C do gene da eNOS não pode ser considerado como um marcador de hipertensão arterial mas sim, como um dos fatores que podem estar contribuindo para os níveis elevados de pressão arterial.

## CAPÍTULO 4

### *Influência do exercício físico sobre os valores de glicose, perfil lipídico, pressão arterial, composição corporal e óxido nítrico em idosos portadores do polimorfismo T-786C do gene da eNOS<sup>4</sup>*

#### RESUMO

Dentre os fatores que contribuem para a alta incidência da hipertensão arterial, pode-se citar as variáveis de perfil lipídico e glicose (PLG), composição corporal (CC) e a diminuição da concentração de óxido nítrico (NO). Contrapondo-se a esses fatores, o exercício físico regular tem se mostrado benéfico para a normalização dessas variáveis. Desta forma o objetivo deste estudo foi verificar qual a influência que um programa regular de exercício físico exerceria sobre as variáveis de PLG, CC e nas concentrações de NO em indivíduos portadores do polimorfismo T-786C do gene da eNOS, verificando qual a associação que essas variáveis teriam sobre os valores de pressão arterial (PA). Os participantes foram agrupados de acordo com a genotipagem e o nível de PA e, os resultados indicaram que os valores de CC (IMC e %GC) e PLG (colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, triglicérides e glicose) não apresentaram diferenças entre grupos e momentos pré e pós-treinamento físico. Apenas a pressão arterial sistólica e diastólica (pré-treinamento: G1 – 130,0 ± 7 / 85,0 ± 1; G2 – 140,0 ± 1 / 86,2 ± 4; G3 – 122,9 ± 6 / 80,0 ± 4; G4 – 140,9 ± 5 / 87,2 ± 5 e, pós treinamento: G1 – 120,0 ± 1 / 82,5 ± 3; G2 – 131,2 ± 9 / 75,0 ± 9; G3 – 116,6 ± 8 / 75,4 ± 7; G4 – 126,0 ± 9 / 80,5 ± 8 mmHg) e a concentração de NO (pré-treinamento: G1 – 47,56 ± 35; G2 – 21,13 ± 8; G3 – 42,93 ± 15; G4 – 36,37 ± 27 e, pós-treinamento: G1 – 44,58 ± 8; G2 – 35,02 ± 16; G3 – 42,24 ± 18; G4 – 32,78 ± 16µM) dos grupos hipertensos tiveram uma mudança significativa dos valores com o treinamento. As variáveis de CC apresentaram uma interação significativa com os fatores hipertensão e polimorfismo. Com este resultado conclui-se que o programa de exercício físico contribuiu para aumentar a associação entre CC e PA independentemente do polimorfismo T-786C do gene da eNOS e das variáveis de PLG.

**Palavras chave:** Óxido nítrico, exercício físico, perfil lipídico, composição corporal.

---

<sup>4</sup>Estudo desenvolvido no Departamento de Educação Física - UNESP / Rio Claro, Laboratório de Farmacologia e Hemocentro – UNICAMP / Campinas

## 4.1 INTRODUÇÃO

Vários são os fatores que podem estar contribuindo para a alta incidência da hipertensão arterial especialmente para a população idosa (LIBERMAN, 2007). Tanto a obesidade, o perfil lipídico quanto os fatores genéticos podem, isoladamente ou em conjunto, estar comprometendo o sistema de controle da pressão arterial, gerando assim um quadro hipertensivo. A obesidade, além de estar aumentando a resistência periférica, pode também estar alterando o perfil lipídico e, o aumento de LDL-colesterol (LDL-c), por exemplo, pode estar gerando uma série de complicações para este sistema, pois além de estar relacionado ao processo de formação da aterosclerose, o LDL-c possui uma alta correlação com a diminuição da biodisponibilidade de substâncias vasodilatadores, como o óxido nítrico (NO) (OHARA *et al.*, 1993; FEITOSA *et al.*, 2006; GOULART e BENSEÑOR, 2006). Além desses fatores, a influência genética também tem recebido um papel de destaque para o controle da pressão arterial, pois as alterações em genes específicos podem estar comprometendo a expressão e produção de substâncias que auxiliam na manutenção de níveis normais de pressão arterial. Como exemplo pode-se citar o polimorfismo T-786C do gene da eNOS, que em tese, estaria diminuindo a produção de NO das células endoteliais, comprometendo assim o grau de vasodilatação (BILSBOROUGH *et al.*, 2003; ADLAM *et al.*, 2007).

Todos esses fatores contribuem para esta alta incidência de hipertensão arterial e, uma das formas que tem sido apontada pela literatura para minimizar este efeito no sistema cardiovascular é o exercício físico (CLARKSON *et al.*, 1999; KINGWELL, 2000; BRUM *et al.*, 2004; HIGASHI e YOSHIZUMI, 2004; GRAVINA *et al.*, 2007). Além de estar contribuindo para a diminuição do índice de obesidade, o exercício físico estaria atuando na melhora do perfil lipídico, prevenindo a incidência de aterosclerose, aumentando assim o grau de vasodilatação devido o aumento da biodisponibilidade do NO. Este aumento da

biodisponibilidade estaria tendo uma contribuição significativa da superóxido dismutase (SOD), que também é estimulada pelo aumento do *shear stress* proveniente do exercício físico (FUKAI, 2007; JUNG *et al.*, 2007). Um outro fator de grande importância proporcionado pelo exercício físico é o aumentando da expressão de determinados genes responsáveis pela produção de várias substâncias, como por exemplo, o gene da óxido nítrico sintase endotelial. Mesmo em indivíduos portadores do polimorfismo deste gene, por exemplo, o polimorfismo T-786C, o exercício físico tem-se mostrado eficaz no aumento da expressão deste gene, suprimindo a deficiência que o polimorfismo estaria ocasionando (BEST *et al.*, 1998; BRAY, 2000)

Diversos trabalhos reportaram que indivíduos fisicamente ativos, além de reduzirem os valores de composição corporal, possuem um perfil lipídico dentro dos valores considerados normais quando comparados com indivíduos sedentários (LEVINE *et al.*, 1990; DREXLER e HORNIG, 1999; KINGWELL, 2000; ROSENSON, 2004). Esta melhora do perfil lipídico significa principalmente uma diminuição da concentração de LDL-c, e isto estaria contribuindo para o aumento da biodisponibilidade do NO, aumentando assim a concentração de NO que estaria atuando na vasodilatação propriamente dita (YETIK-ANACAK e CATRAVAS, 2006; ZAGO e ZANESCO, 2006).

Além da melhora do perfil lipídico, o exercício físico estaria também auxiliando em uma maior produção de NO, devido ao aumento da expressão do gene da eNOS, em decorrência de um aumento do *shear stress*, provocado pelo aumento do fluxo sanguíneo que ocorre durante o exercício físico. Mesmo em indivíduos que possuem uma deficiência na produção de NO em decorrência de serem portadores do alelo C no polimorfismo T-786C do gene da eNOS, o exercício físico possui um efeito benéfico aumentando a expressão deste gene e, conseqüentemente a produção de NO (FISHER *et al.*,

2001; BOO e JO, 2003; DATA *et al.*, 2003; ROSSI *et al.*, 2003; KOJDA e HAMBRECHT, 2005; DENGEL *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2006).

Desta forma, qual seria a influência de um programa regular de exercício físico sobre as variáveis de composição corporal, perfil lipídico, glicemia e óxido nítrico em indivíduos portadores do polimorfismo T-786C do gene da eNOS ? Será que possíveis alterações nessas variáveis em detrimento do exercício físico teriam uma relação direta com os valores de pressão arterial desses indivíduos ? E por último, qual seria a influência que as variáveis de composição corporal, perfil lipídico e glicemia estariam exercendo sobre as concentração de NO ?

## **4.2 OBJETIVO**

O objetivo do presente estudo foi verificar qual a influência que um programa aeróbio de exercício físico exerceria sobre as variáveis de composição corporal, perfil lipídico, glicemia e concentrações de óxido nítrico em indivíduos portadores do polimorfismo T-786C do gene da eNOS, verificando qual a associação que essas variáveis teriam sobre a pressão arterial desses indivíduos.

Ainda, este estudo buscou analisar qual a interferência que o perfil lipídico e glicêmico e composição corporal estariam exercendo sobre as concentrações do óxido nítrico.

## **4.3 MATERIAIS E MÉTODOS**

Para este estudo foram realizadas as análises de perfil lipídico e glicêmico (CT, LDL-c, HDL-c, GL e TG), composição corporal (IMC e %GC), pressão arterial, análise da concentração de óxido nítrico e avaliação do polimorfismo T-786C do gene da eNOS em 30 participantes de ambos os sexos ( $62,8 \pm 7$  anos de idade).

As análises de PLG, CC, PA e genotipagem foram realizadas seguindo-se os procedimentos padrões de coletas e análises que estão descritas no capítulo anterior (capítulo 3). Para fins deste estudo foram acrescentados as análises de óxido nítrico e o programa de treinamento físico.

Para a análise do Óxido Nítrico foi utilizado o método de determinação indireto, através das dosagens plasmática de nitrito e nitrato (produtos da reação do óxido nítrico com oxigênio), sendo utilizado o *Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit* da *Cayman Chemical* e leitura com comprimento de onda de 540nm em espectrofotômetro *EspectraMax 340* do fabricante *Molecular Devices*.

Todas essas análises foram realizadas antes e após um programa de treinamento físico com exercícios aeróbios, tornando possível a comparação da influência do exercício físico sobre as variáveis de composição corporal, perfil lipídico, glicemia e NO.

O programa de treinamento físico aeróbio foi realizado durante o período de 6 meses, com uma frequência de 3 sessões/semana e 1 hora/sessão. As sessões de exercício começaram e terminaram com aquecimento apropriado e atividades de relaxamento. O programa foi realizado de forma individual e constituído de exercícios em bicicletas (horizontal e vertical), esteiras e caminhadas realizadas de forma aleatória e intercaladas. Inicialmente foi realizado um período de duas semanas de adaptação aos equipamentos, sem nenhuma sobrecarga. Após esta adaptação, as três primeiras sessões (primeira semana) consistiram de 30 minutos de exercício a uma frequência cardíaca correspondente a 50% do  $\dot{V}O_2$  max. Na segunda semana, as três sessões de treinamento subseqüentes, foram realizadas com um aumento na duração da sessão para 40 minutos e mantida a mesma intensidade. Somente após essas duas semanas de atividade, a carga de trabalho foi aumentada para 70% chegando-se à intensidade desejável de 40 minutos a 70% do  $\dot{V}O_2$  max. Estes aumentos na intensidade e duração do treinamento ocorreram somente se os

participantes tivessem completado suas prescrições de exercício sem sinais ou sintomas cardiovasculares ou fadiga excessiva e, foram necessários para que houvesse uma adaptação progressiva à carga de trabalho sugerida por este estudo.

Para o controle da intensidade do exercício foi utilizada a fórmula de KARVONEN descrita a seguir:

$$FCT = F\% (FC_{max} - FC_{rep}) + FC_{rep}$$

Sendo: FCT – frequência cardíaca de treino

F% - porcentagem de trabalho selecionado

FC<sub>max</sub> – frequência cardíaca máxima

FC<sub>rep</sub> – frequência cardíaca de repouso

Para a determinação indireta do  $\dot{V}O_2$  max todos os participantes realizaram o teste de Caminhada de 1 milha preconizado por KLINE e colaboradores (1987) realizado em uma pista de atletismo de 400 metros. O teste consiste em caminhar a distância de 1 milha (1.600m), sem correr, no menor tempo possível. O resultado foi obtido em ml/kg/min através da equação:

$$\dot{V}O_2 \text{ max} = 132,853 - (0,0769 \times PC) - (0,3877 \times idade) + (6,315 \times sexo) - (3,2649 \times T1) - (0,1565 \times FC1-4)$$

Sendo: PC – peso corporal em libras

Idade em anos

Sexo – mulheres = 0 / homens = 1

T1 – tempo para caminhar 1 milha (minutos)

FC1-4 – frequência cardíaca no final do teste

Após 3 meses de treinamento, o teste de caminhada de 1 milha foi realizado novamente, para se verificar as possíveis alterações no  $\dot{V}O_2 \text{ max}$ , permitindo assim a manutenção da intensidade de treino devido aos ajustes realizados na carga de trabalho.

#### **4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para verificar a influência que o programa de exercício físico estaria exercendo sobre as variáveis de composição corporal, perfil lipídico e glicêmico, foi realizado uma ANOVA 2 X 2 X 2 tendo como fatores o polimorfismo T-786C do gene da eNOS (TT e TC+CC), a classificação da pressão arterial (NT e HT) e os momentos pré e pós-treinamento, sendo este último fator considerado como medida repetida.

Ainda, uma análise descritiva e uma análise de correlação de Pearson foi utilizada para se verificar a relação existente entre as variáveis de composição corporal, perfil lipídico e pressão arterial de todos os participantes deste estudo.

#### **4.5 RESULTADOS**

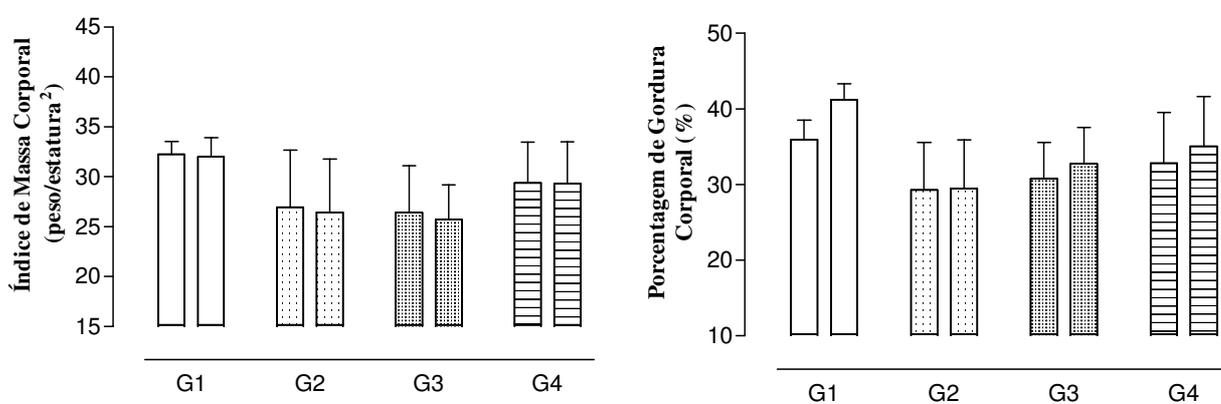
##### **4.5.1 Influência do exercício físico sobre os valores de pressão arterial e composição corporal.**

Especificamente com relação aos valores de CC, pode-se observar que, para o momento pré-treinamento, tanto o IMC (G1 -  $32,2 \pm 1$  / G2 -  $26,9 \pm 5$  / G3 -  $26,4 \pm 4$  / G4 -  $29,3 \pm 4$ ) quanto a GC (G1 -  $35,9 \pm 2$  / G2 -  $29,2 \pm 6$  / G3 -  $30,7 \pm 4$  / G4 -  $32,8 \pm 6$ ) tiveram um comportamento inicial similar em todos os grupos devido a ausência de diferenças estatísticas\*.

---

\* Tabela 4.1: Valores antropométricos e de pressão arterial de 30 voluntários subdivididos em grupos conforme o nível de pressão arterial e genotipagem da eNOS nos momentos pré e pós programa de exercício físico (ver anexo 5)

No momento pós-treinamento pôde ser constatado que o programa de exercício físico não exerceu nenhuma influência sobre os valores de IMC (G1 –  $32,0 \pm 2$  / G2 –  $26,4 \pm 5$  / G3 –  $25,7 \pm 3$  / G4 –  $29,3 \pm 4$ ) e de %GC (G1 –  $41,2 \pm 2$  / G2 –  $29,5 \pm 6$  / G3 –  $32,7 \pm 4$  / G4 –  $35,0 \pm 6$ ), permanecendo os grupos com resultados similares independente do momento e grupo (Figura 4.1).



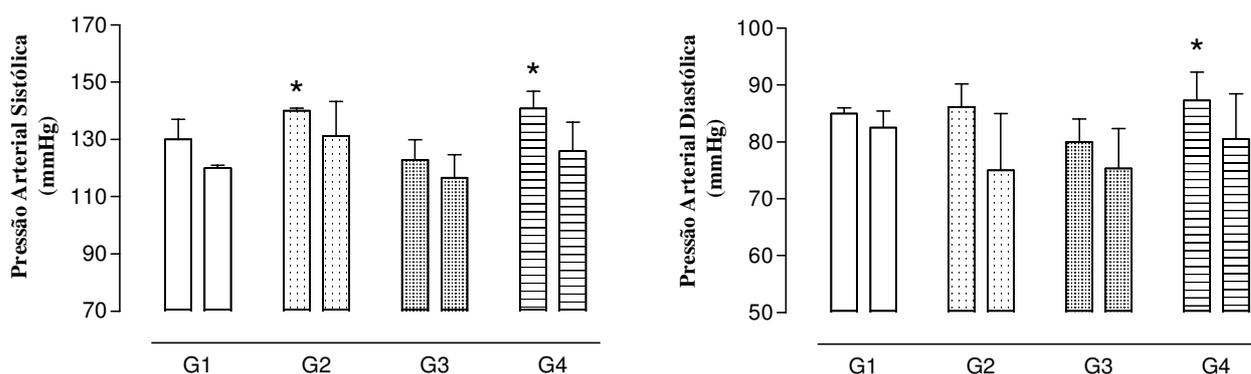
**FIGURA 4.1:** Ilustração gráfica dos valores de composição corporal de 30 voluntários subdivididos em grupos conforme o nível de pressão arterial e genotipagem da eNOS, nos momentos pré (primeira coluna de cada grupo) e pós (segunda coluna de cada grupo) treinamento. G1 – TT/NT; G2 – TT/HT; G3 – TC+CC/NT; G4 – TC+CC/HT. ANOVA não detectou diferença entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

Apesar deste resultado, a ANOVA apontou uma interação significativa para ambos os fatores (hipertensão e polimorfismo) para as variáveis de composição corporal. Esta interação indicou que essas variáveis tiveram um efeito do treinamento físico.

Para os valores de pressão arterial, foram detectadas diferenças estatísticas entre os grupos hipertensos e normotensos no momento pré-treinamento tanto para a PAS (G1 –  $130,0 \pm 7$  / G2 –  $140,0 \pm 1$  / G3 –  $122,9 \pm 6$  / G4 –  $140,9 \pm 5$ ) quanto para a PAD (G1 –  $85,0 \pm 1$  / G2 –  $86,2 \pm 4$  / G3 –  $80,0 \pm 4$  / G4 –  $87,2 \pm 5$ ). É importante ressaltar que esta

diferença nos valores de pressão arterial está de acordo com a própria divisão realizada dos grupos deste estudo\*.

As diferenças encontradas no momento pré-treinamento entre os grupos hipertensos e normotensos não foram mantidas no momento pós-treinamento, não sendo encontrada nenhuma diferença entre os grupos após o programa de exercício físico para a PAS (G1 –  $120,0 \pm 1$  / G2 –  $131,2 \pm 9$  / G3 –  $116,6 \pm 8$  / G4 –  $126,0 \pm 9$ ) e para a PAD (G1 –  $82,5 \pm 3$  / G2 –  $75,0 \pm 9$  / G3 –  $75,4 \pm 7$  / G4 –  $80,5 \pm 8$ ). Este resultado ocorreu em detrimento de uma diminuição dos valores de PAS e PAD dos grupos G2 e G4 (Figura 4.2).



**FIGURA 4.2:** Ilustração gráfica dos valores de pressão arterial de 30 voluntários subdivididos em grupos conforme o nível de pressão arterial e genotipagem da eNOS, nos momentos pré (primeira coluna de cada grupo) e pós (segunda coluna de cada grupo) treinamento. G1 – TT/NT; G2 – TT/HT; G3 – TC+CC/NT; G4 – TC+CC/HT. \*Diferença estatística com relação aos grupos normotensos no momento pré-treinamento ( $p < 0,05$ ).

Apesar desta diferença, a ANOVA não detectou interação significativa quando os fatores hipertensão e polimorfismo foram considerados.

\* Tabela 4.1: Valores antropométricos e de pressão arterial de 30 voluntários subdivididos em grupos conforme o nível de pressão arterial e genotipagem da eNOS nos momentos pré e pós programa de exercício físico (ver anexo 5)

#### 4.5.2 Influência do exercício físico sobre o perfil lipídico e glicêmico.

Especificamente para o momento pré-treinamento, nenhuma diferença estatística foi encontrada com relação às variáveis de CT (G1 – 193,20 ± 66 / G2 – 210,29 ± 31 / G3 – 217,48 ± 58 / G4 – 203,51 ± 41), LDL-c (G1 – 139,78 ± 80 / G2 – 136,35 ± 25 / G3 – 151,87 ± 57 / G4 – 147,30 ± 28), HDL-c (G1 – 42,9 ± 2 / G2 – 43,4 ± 3 / G3 – 54,6 ± 18 / G4 – 49,5 ± 15), TG (G1 – 164,08 ± 4 / G2 – 214,72 ± 81 / G3 – 160,74 ± 83 / G4 – 129,20 ± 66) e NO (G1 – 47,56 ± 35 / G2 – 21,13 ± 8 / G3 – 42,93 ± 15 / G4 – 36,37 ± 27)\*.

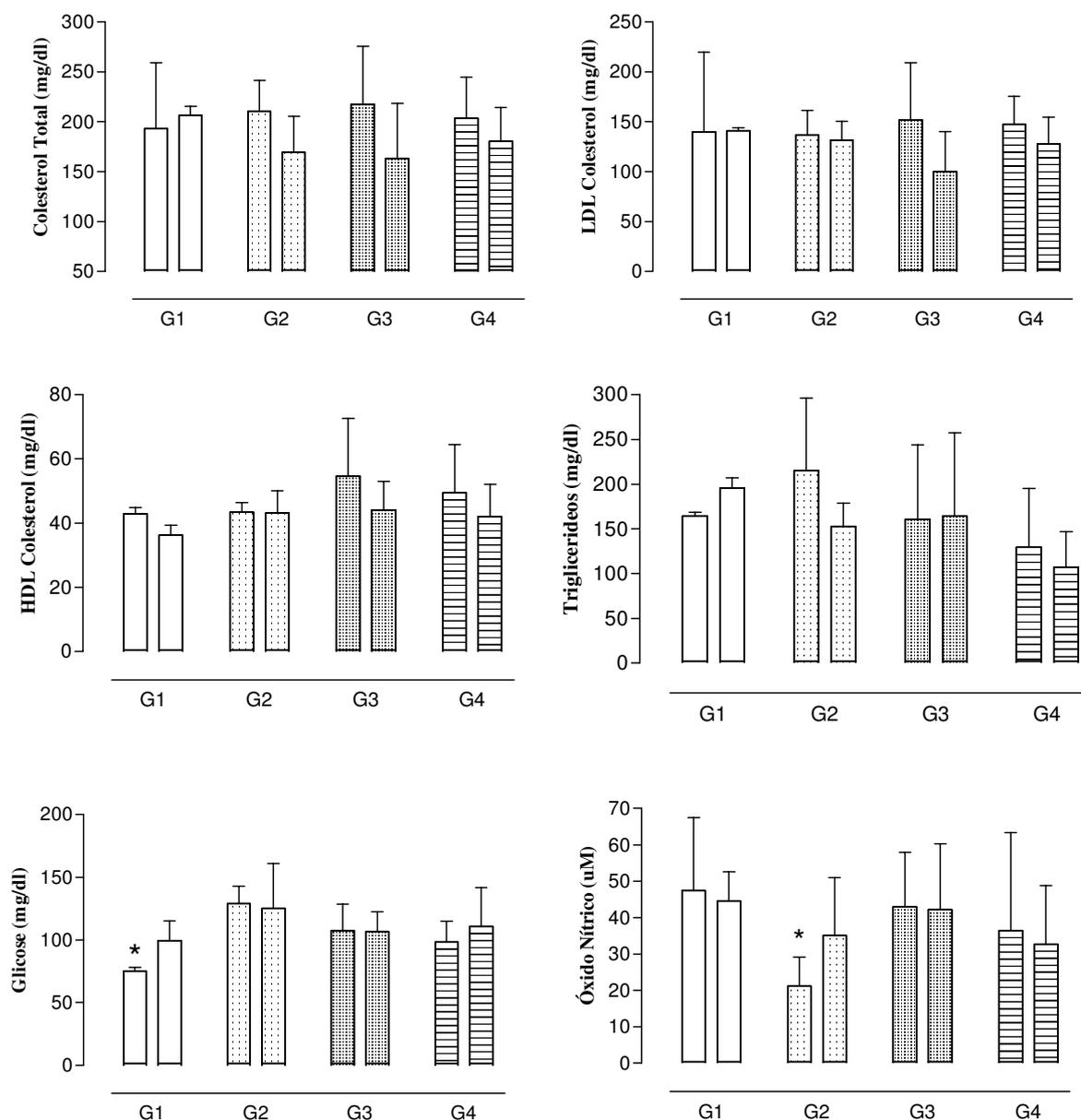
A única variável que apresentou diferenças entre os grupos foi a glicose que apresentou valores inferiores no G1 com relação aos demais grupos (G1 – 75,12 ± 6 / G2 – 129,06 ± 14 / G3 – 107,56 ± 21 / G4 – 98,16 ± 17).

Provavelmente devido a este resultado, a ANOVA apontou para uma interação significativa para os valores de glicose.

No momento pós-treinamento, o programa de exercício físico também não foi suficiente para provocar mudanças significativas nas variáveis de CT (G1 – 206,50 ± 9 / G2 – 169,49 ± 36 / G3 – 163,31 ± 55 / G4 – 180,33 ± 34), LDL-c (G1 – 140,76 ± 3 / G2 – 131,64 ± 19 / G3 – 100,08 ± 40 / G4 – 127,55 ± 27), HDL-c (G1 – 36,3 ± 3 / G2 – 43,0 ± 6 / G3 – 44,1 ± 9 / G4 – 42,1 ± 10), TG (G1 – 195,71 ± 11 / G2 – 152,7 ± 26 / G3 – 164,14 ± 93 / G4 – 107,43 ± 39) e NO (G1 – 44,58 ± 8 / G2 – 35,02 ± 16 / G3 – 42,24 ± 18 / G4 – 32,78 ± 16). Apenas para os valores de glicose (G1 – 99,30 ± 16 / G2 – 125,23 ± 36 / G3 – 106,59 ± 16 / G4 – 110,74 ± 31), no grupo G1, houve um aumento, igualando esses valores aos demais grupos (figura 4.3).

---

\* Tabela 4.2: Valores de glicemia e perfil lipídico de 30 voluntários subdivididos em grupos conforme o nível de pressão arterial e genotipagem da eNOS nos momentos pré e pós programa de exercício físico (ver anexo 5)



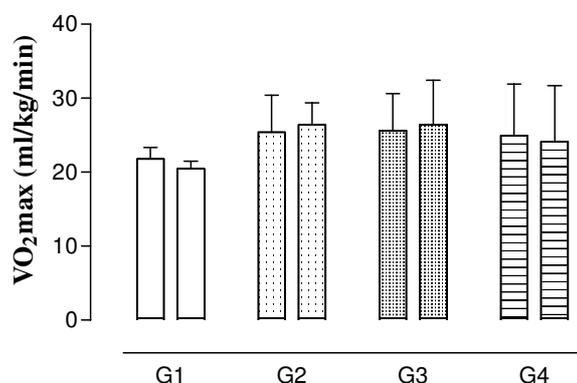
**FIGURA 4.3:** Ilustração gráfica do perfil lipídico e glicêmico de 30 voluntários subdivididos em grupos conforme o nível de pressão arterial e genotipagem da eNOS, nos momentos pré (primeira coluna de cada grupo) e pós (segunda coluna de cada grupo) treinamento. G1 – TT/NT; G2 – TT/HT; G3 – TC+CC/NT; G4 – TC+CC/HT. \*Estatisticamente significante com relação aos demais grupos no momento pré-treinamento ( $p < 0,05$ ).

Mesmo com a ausência de diferenças, pode-se observar uma ligeira diminuição principalmente para os valores de CT e LDL-c na maioria dos grupos, mostrando uma tendência de melhora com o treinamento físico aplicado.

Digno de nota são os valores de NO, que mesmo com a divisão do genótipo da eNOS, os grupos não apresentaram diferenças conforme tem sido preconizado pela literatura.

Em tese, os grupos portadores do polimorfismo da eNOS (G3 e G4) deveriam apresentar valores menores de NO, mas apenas o grupo G2 teve este comportamento. Os níveis iniciais do grupo G2 foram significativamente menores com relação aos demais grupos, mas esta diferença se anula no momento pós-treinamento, apresentando resultados similares para as concentrações de NO nos quatro grupos. Neste caso, pode-se afirmar que o programa de exercício físico provocou um estímulo para aumentar as concentrações de NO especificamente para este grupo.

Como forma de controle da intensidade do programa de exercício físico, o  $\dot{V}O_2$  max foi mensurado e nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos e momentos, indicando que o programa de exercício físico não possuiu intensidade suficiente para provocar alterações no consumo máximo de oxigênio (Figura 4.4).



**FIGURA 4.4:** Ilustração gráfica dos valores de  $VO_2$ max de 30 voluntários subdivididos em grupos conforme o nível de pressão arterial e genotipagem da eNOS, nos momentos pré (primeira coluna de cada grupo) e pós (segunda coluna de cada grupo) treinamento. G1 – TT/NT; G2 – TT/HT; G3 – TC+CC/NT; G4 – TC+CC/HT. ANOVA não detectou diferença entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

Para verificar a relação existente entre as variáveis deste estudo, uma análise de correlação foi realizada considerando-se todas as variáveis independentemente do genótipo e do nível de pressão arterial em que o participante tinha sido classificado inicialmente.

De acordo com a tabela 4.3, as correlações significativas e fortes ocorreram somente entre as variáveis do PLG (CT, LDL, HDL, TG e GL) e entre as de pressão arterial (PAS e PAD). Uma fraca correlação foi encontrada entre HDL e IMC e entre TG e PAD. A

GC apresentou uma moderada correlação com PAS e com o IMC e, uma fraca correlação com a PAD, enquanto que o IMC apresentou uma fraca correlação com a PAD.

**TABELA 4.3:** Análise de correlação entre as variáveis de composição corporal, pressão arterial, perfil lipídico e glicêmico de 30 participantes no momento pré-treinamento.

	LDL	HDL	TG	GL	NO	PAS	PAD	IMC	GC
CT	<b>0,94**</b>	<b>0,55**</b>	<b>0,30*</b>	<b>0,42**</b>	-0,23	-0,11	-0,16	-0,20	0,15
LDL	x	<b>0,43*</b>	<b>0,30*</b>	<b>0,36**</b>	-0,15	-0,15	-0,19	-0,17	-0,24
HDL	x	x	0,01	0,19	-0,04	-0,12	-0,26	<b>-0,30*</b>	0,04
TG	x	x	x	0,26	0,08	0,01	<b>-0,30*</b>	-0,11	-0,30
GL	x	x	x	x	-0,18	-0,04	-0,03	0,07	-0,14
NO	x	x	x	x	x	0,04	0,35	0,03	-0,12
PAS	x	x	x	x	x	x	<b>0,70**</b>	0,24	<b>0,40**</b>
PAD	x	x	x	x	x	x	x	<b>0,32*</b>	<b>0,32*</b>
IMC	x	x	x	x	x	x	x	x	<b>0,53**</b>

CT – colesterol total; LDL – LDL colesterol; HDL – HDL colesterol; TG – triglicérides; GL – glicose; NO – óxido nítrico; PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; IMC – índice de massa corporal; GC – gordura corporal; \*p<0,05; \*\*p<0,01.

A mesma análise de correlação foi realizada para as variáveis de composição corporal, pressão arterial, perfil lipídico e glicêmico no momento pós-treinamento.

De acordo com a tabela 4.4, as únicas variáveis que apresentaram moderada a alta correlação foram entre CT e LDL, PAS e PAD e entre GC e IMC. Este resultado era esperado haja vista que essas variáveis se encontram dentro de uma mesma categoria de PLG, CC e pressão arterial. A análise de correlação também apontou moderadas correlações entre o IMC e as variáveis PAS e PAD e entre o VO<sub>2</sub> e as variáveis PAD, IMC e GC. Por último, uma moderada correlação também foi encontrada entre NO e HDL.

**TABELA 4.4:** Análise de correlação entre as variáveis de composição corporal, pressão arterial, perfil lipídico e glicêmico de 30 participantes no momento pós-treinamento.

	LDL	HDL	TG	GL	NO	PAS	PAD	IMC	GC	VO <sub>2</sub>
CT	<b>0,74**</b>	0,07	0,30	0,29	0,14	-0,01	0,20	0,06	-0,04	-0,22
LDL	1.0	0,74	0,24	0,74	0,13	-0,07	0,02	-0,01	-0,19	-0,22
HDL	x	1.0	-0,28	-0,28	<b>0,40*</b>	-0,17	-0,33	-0,22	0,13	0,28
TG	x	x	1.0	0,20	0,18	-0,11	-0,17	-0,10	-0,31	-0,02
GL	x	x	x	1.0	-0,06	-0,06	0,23	,032	0,06	-0,27
NO	x	x	x	x	1.0	-0,17	-0,11	-0,18	0,13	0,10
PAS	x	x	x	x	x	1.0	<b>0,66**</b>	<b>0,44*</b>	-0,01	-0,21
PAD	x	x	x	x	x	x	1.0	<b>0,65**</b>	0,23	<b>-0,42*</b>
IMC	x	x	x	x	x	x	x	1.0	<b>0,42*</b>	<b>-0,57**</b>
GC	x	x	x	x	x	x	x	x	1.0	<b>-0,40*</b>

CT – colesterol total; LDL – LDL colesterol; HDL – HDL colesterol; TG – triglicérides; GL – glicose; NO – óxido nítrico; PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; IMC – índice de massa corporal; GC – gordura corporal; VO<sub>2</sub> – volume máximo de oxigênio; \*p<0,05; \*\*p<0,01.

## 4.6 DISCUSSÃO

Com objetivo de avaliar a influência de um programa de exercício físico sobre as variáveis de CC, PLG e concentrações de NO em indivíduos portadores do polimorfismo T-786C do gene da eNOS, verificando qual a associação que essas variáveis teriam sobre a pressão arterial de idoso, os resultados foram avaliados separadamente, levando-se em consideração ambos os momentos pré e pós treinamento em todos os grupos formados.

### 4.6.1 Composição Corporal

Analisando inicialmente as variáveis de composição corporal, tanto o IMC quanto a GC não apresentaram diferenças com relação aos grupos tanto no momento pré quanto no pós-treinamento. Mas, apesar da ausência de diferença, foi detectado uma

interação significativa das variáveis de composição corporal com relação aos fatores hipertensão e polimorfismo, identificando um efeito de treinamento.

Este resultado permite afirmar que inicialmente, as variáveis de composição corporal eram independentes dos fatores hipertensão e polimorfismo e, isso significa que no momento pré-treinamento, as variáveis de composição corporal não estariam exercendo nenhuma influência nos resultados. Por outro lado, esta interação indica que o treinamento físico contribuiu para esta relação, mesmo não tendo sido encontrado diferenças no IMC e GC no pós-treinamento.

Especificamente para o momento pré-treinamento, vários fatores podem estar justificando a ausência de interferência que os valores de composição corporal estariam exercendo nos valores de pressão arterial com relação ao polimorfismo T-786C do gene da eNOS. Dentre esses fatores destaca-se:

- a) A ausência de diferenças estatísticas entre os grupos;
- b) As variáveis de composição corporal além da ausência de diferenças, não apresentaram nenhuma mudança em termos de classificação, apresentando valores classificados como “sobrepeso” segundo as normas sugeridas pela Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica (ABESO) para todos os grupos e momentos;
- c) Ambos os grupos normotensos (G1 e G3) apresentaram os mesmos índices de obesidade de que os grupos hipertensos (G2 e G4). Desta forma é possível afirmar que as variáveis de composição corporal não estariam influenciando nos valores de pressão arterial;

Com relação ao momento pós-treinamento, nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos. Essa ausência de diferenças, em partes, pode ser explicada pela ausência de diferenças nos resultados de  $\dot{V}O_2$  max. Como todos os grupos não apresentaram diferenças nestes valores, é possível afirmar que o treinamento aplicado não teve intensidade suficiente para provocar melhoras nestas variáveis. Este resultado provavelmente aconteceu devido ao

número de participantes ser reduzido, principalmente nos grupos G1 e G2 e também, por um resultado sub-estimado dos valores de  $\dot{V}O_2 \text{ max}$ . Por ser o teste de  $\dot{V}O_2 \text{ max}$  um teste indireto, existe a possibilidade dos valores estarem sub-estimando os resultados e isso, de certa forma, comprometeu o cálculo para a intensidade durante o treinamento e conseqüentemente os resultados finais deste estudo. Vários autores têm reportado que a intensidade ideal para provocar alterações tanto nas variáveis de CC, PLG e pressão arterial seria de 70% do  $\dot{V}O_2 \text{ max}$  (HAGBERG *et al.*, 2000; KINGWELL, 2000; HIGASHI e YOSHIZUMI, 2004; PESCATELLO *et al.*, 2004). Provavelmente a avaliação aplicada neste estudo não foi capaz de atingir um valor real para a intensidade de treinamento.

Em tese, uma diminuição dos valores de composição corporal proveniente dos estímulos gerados pelo exercício físico estaria refletindo diretamente nos valores de pressão arterial, especialmente se o indivíduo apresentar um quadro hipertensivo (BARCELLOS *et al.*, 2006; GOULART e BENSEÑOR, 2006; NUNES *et al.*, 2006). Desta forma, mesmo não tendo sido detectado alterações nos valores de composição corporal em ambos os momentos, pode-se dizer que o treinamento contribuiu para aumentar a associação entre as variáveis de composição corporal e os fatores hipertensão e polimorfismo em virtude da interação detectada. Isso significa que, provavelmente com um aumento na intensidade do exercício, essas relações ficariam mais fortes e possíveis alterações estariam ocorrendo entre os momentos pré e pós-treinamento.

Este resultado pode ser confirmado pela própria análise de correlação realizada em ambos os momentos. No momento pré-treinamento foi detectado correlações moderadas e altas somente entre as variáveis de uma mesma categoria, ou seja, as variáveis de composição corporal somente tiveram moderadas a altas correlações entre elas mesmas. O mesmo comportamento ocorreu para as variáveis de PLG e pressão arterial. Somente fracas

correlações foram encontradas com o IMC e as variáveis HDL e PAD e da GC com PAS e PAD.

Por outro lado, no momento pós-treinamento, o IMC apresentou moderadas correlações com a PAS e PAD e também do IMC e GC com o  $\dot{V}O_2$  max, confirmando assim que o programa de exercício físico teria a capacidade de aumentar a associação entre composição corporal e pressão arterial. Este resultado está em concordância com alguns estudos que reportaram uma relação proporcional entre os valores de composição corporal e pressão arterial após um programa de exercício físico aeróbio (FRANKLIN *et al.*, 1991; HAGBERG *et al.*, 2000; NUNES *et al.*, 2006).

Desta forma, este resultado além de confirmar a ausência de interferência nos momentos iniciais deste estudo, confirma que o exercício físico possui um efeito benéfico para a relação de composição corporal e pressão arterial independentemente do polimorfismo T-786C do gene da eNOS e de qualquer variável da PLG.

#### **4.6.2 Perfil Lipídico e Glicêmico**

Para as variáveis do PLG, a única variável que apresentou diferenças estatísticas no momento pré-treinamento foi a glicose para o grupo G1. Este resultado não significa que os grupos G2, G3 e G4 estavam com os valores de glicemia elevados. Nesta variável, todos os grupos apresentaram uma classificação de “normal” segundo a SBC (2007) e SBH (2006), anulando qualquer interferência que os níveis glicêmicos estariam exercendo nos valores de pressão arterial nos momentos iniciais deste estudo.

No momento pós-treinamento nenhuma diferença estatística ocorreu, mas pequenas alterações podem ser observadas. Nas variáveis de CT e LDL-c, devido a essas diminuições, ocorreu uma alteração da classificação de acima da média ou limítrofe, para dentro da faixa de normalidade, especialmente para os grupos G2, G3 e G4. Esta redução do

nível de classificação também aconteceu para os níveis de TG para o grupo G2, enquanto que os valores de HDL-c e GL permaneceram sem alterações em suas classificações. Digno de nota foi a interação significativa detectada para os valores de glicemia, mostrando um efeito do treinamento para esta variável. Este resultado ocorreu provavelmente devido ao baixo valor apresentado pelo grupo G1 no momento pré-treinamento, enquanto que para o momento pós-treinamento, este mesmo grupo teve um aumento no resultado de glicose apresentando valores próximos aos valores apresentados pelos demais grupos.

Com este resultado, pode-se afirmar que o programa de exercício físico não foi suficiente para provocar mudanças significativas para as variáveis do PLG, mesmo apresentando indícios para um melhor perfil lipídico desta população.

O benefício do exercício físico sobre o perfil lipídico tem sido reportado por diversos autores, mas este efeito somente estaria ocorrendo com uma atividade física realizada a uma intensidade de moderada a alta (HAGBERG *et al.*, 2000; GUEDES e GONCALVES, 2007; STRANSKA *et al.*, 2007). Como o programa de exercício físico proposto por este estudo provavelmente não atingiu esta intensidade desejada, principalmente devido às limitações na própria avaliação do volume máximo de oxigênio, a ausência de diferenças estaria coerente com a literatura.

Mesmo tendo apresentado uma tendência de melhora no perfil lipídico e algumas alterações em termos de classificação, acredita-se que essas mudanças não exerceram influência nos resultados finais deste estudo, haja vista que a ausência de diferenças e interações entre os grupos em praticamente todas as variáveis permaneceu no momento pós-treinamento. Esta conclusão torna-se possível devido ao fato de nenhum grupo ter apresentado valores diferenciados de PLG em ambos os momentos, mas, apresentaram diferentes respostas com relação à pressão arterial.

Este resultado foi confirmado com a análise de correlação realizada nos momentos pré e pós-treinamento. Em ambos os momentos, as variáveis de PLG foram correlacionadas somente entre elas mesmas e, nenhuma correlação significativa foi encontrada com relação às variáveis de composição corporal e pressão arterial.

Associando a ausência de diferenças estatísticas entre os grupos e momentos à ausência de correlação com as outras variáveis analisadas, este resultado sugere que os valores do PLG não exerceram nenhuma interferência nos valores de pressão arterial independentemente do polimorfismo T-786C do gene da eNOS.

Apesar de nenhuma significância ter sido encontrada, o programa de exercício físico contribuiu para uma melhora no perfil lipídico dos participantes deste estudo, mas esta contribuição não foi suficiente para influenciar as outras variáveis deste estudo.

Para as concentrações de NO no momento pré-treinamento, pode-se observar que ambos os grupos hipertensos (G2 e G4) apresentam valores relativamente inferiores aos grupos normotensos, indicando que existe uma relação entre hipertensão arterial e concentrações de NO. Mas, essa afirmação possui limitações, pois, somente o grupo G2 apresentou diferenças estatísticas com relação aos grupos normotensos.

Na realidade, esperar-se-ia que os grupos portadores do polimorfismo T-786C do gene da eNOS (G3 e G4) apresentassem concentrações menores de NO quando comparados aos grupos não polimórficos e, neste caso, o único grupo que apresentou concentrações menores foi o grupo não portador do polimorfismo T-786C do gene da eNOS. Uma das justificativas para esta ausência de diferenças foi o número de participantes relativamente baixos, especialmente para os grupos G1 e G2. Este número baixo acabou gerando um desvio padrão da média relativamente alto, dificultando desta forma a detecção de diferenças entre os grupos. Além disso, o próprio critério de inclusão dos participantes limitou esses resultados, pois inviabilizou a análise de pessoas com níveis mais elevados de

pressão arterial (estágios II e III de hipertensão arterial) com relação à prevalência do polimorfismo T-786C do gene da eNOS.

Desta forma, este resultado estaria indicando que a hipertensão arterial teria uma relação com as concentrações de NO, mas não com o polimorfismo T-786C do gene da eNOS, e isto estaria acontecendo independentemente das variáveis do PLG e CC no momento pré-treinamento. Este resultado sugere que as concentrações de NO e os valores de pressão arterial não sofreram influência das variáveis de composição corporal e do perfil lipídico independentemente do fator genético.

Após o programa de exercício físico, todos os grupos permaneceram praticamente com os mesmos resultados iniciais e, somente o G2 demonstrou um aumento das concentrações de NO. Esta diferença apresentada pelo grupo G2 provavelmente estaria relacionada à questão da biodisponibilidade do NO ao invés da produção propriamente dita, haja vista que indivíduos não portadores deste polimorfismo não estariam apresentando diminuições na produção de NO. Este resultado sugere que o programa de exercício físico teve intensidade suficiente para elevar as concentrações de NO somente do grupo G2, mas, como este grupo não estaria apresentando problemas na produção do NO, pode-se concluir que o exercício físico estaria contribuindo para aumentar a biodisponibilidade do NO.

Infelizmente este estudo não analisou nenhuma variável relacionada especificamente à biodisponibilidade, mas, existem dois indícios que podem ser utilizados para explicar tais conclusões. Primeiro, a própria genotipagem que suporta a idéia de ausência de problemas na produção de NO e, segundo, o fato dos valores de LDL-c terem apresentado uma tendência de redução. Como o LDL-c está estreitamente relacionado à diminuição da biodisponibilidade do NO, qualquer redução de seus valores podem estar refletindo num aumento das concentrações de NO. Este fato estaria acontecendo para o grupo G2, contribuindo assim para um aumento das concentrações de NO próximo aos valores dos

demais grupos. É importante lembrar que esta conclusão é limitada em virtude do baixo número de participantes deste grupo

Uma outra correlação interessante ocasionada pelo treinamento físico foi entre as variáveis NO e HDL-c. Como o HDL-c possui uma função de transporte do LDL-c para o fígado, removendo-o da circulação, esta correlação assume um aspecto positivo, pois com a diminuição do LDL-c da circulação, a biodisponibilidade do NO estaria aumentada. Desta forma, a correlação entre NO e HDL-c ocasionada pelo exercício físico também possui um aspecto positivo para o sistema de controle da pressão arterial. Ainda, esta correlação também está coerente com o possível aumento das concentrações de NO, no grupo G2, e a tendência de diminuição dos valores de LDL-c.

#### **4.6.3 Pressão Arterial**

Com relação aos valores de pressão arterial, no momento pré-treinamento existia uma diferença entre ambos os grupos hipertensos e normotensos com relação as variáveis de pressão arterial sistólica e diastólica, mas, esta diferença não foi encontrada no momento pós-treinamento. Este resultado foi em detrimento da redução dos valores de PAS e PAD tanto do grupo G2 quando do G4. Este resultado está de acordo com vários estudos que apontam para uma melhora significativa nos níveis pressóricos em resposta ao treinamento físico (NEGRAO *et al.*, 1993; HIGASHI e YOSHIZUMI, 2004; PESCATELLO *et al.*, 2004; FORJAZ *et al.*, 2006; FAGARD e CORNELISSEN, 2007).

Mesmo sem diferenças, a tendência de melhora do perfil lipídico poderia estar contribuindo para explicar este resultado, mas devido à ausência de diferenças, esta afirmação não pode ser realizada. Apenas para o G2 é possível afirmar que a ligeira diminuição dos valores de PLG e o aumento nas concentrações de NO contribuíram para as reduções dos níveis pressóricos, trazendo-os para dentro de uma faixa considerada normal (SBH, 2006).

Desta forma, pode-se concluir que o treinamento físico aplicado neste estudo foi benéfico para reduzir os valores de pressão arterial dos grupos hipertensos, trazendo-os para níveis pressóricos normais e, este resultado estaria tendo uma contribuição dos fatores relacionados à composição corporal.

Uma outra conclusão que esses resultados permitem foi, devido a falta de interação entre hipertensão e polimorfismo, a incidência de hipertensão arterial neste estudo não foi dependente do polimorfismo T-786C do gene da eNOS.

#### **4.7 CONCLUSÃO**

Em termos gerais, com o programa de exercício físico, as únicas variáveis que tiveram uma melhora significativa foram as variáveis de pressão arterial sistólica e diastólica, trazendo um benefício para os grupos que inicialmente foram classificados como hipertensos e, este resultado aconteceu independentemente do polimorfismo T-786C do gene da eNOS.

O exercício físico também contribuiu para melhorar o perfil lipídico dos participantes deste estudo, mas este resultado não refletiu em uma associação com os valores de pressão arterial. Para o PLG a única associação encontrada após o programa de exercício físico foi entre as concentrações de NO e HDL-c. Esta associação estaria contribuindo para um aumento das concentrações de NO e isso poderia estar contribuindo para a redução dos valores de pressão arterial. Mas, devido às limitações deste estudo e a falta de interação entre essas variáveis, a associação entre pressão arterial e perfil lipídico não foi confirmada.

A única associação encontrada foi com relação as variáveis de composição corporal. Neste caso, o exercício físico possuiu um efeito benéfico para aumentar a associação entre as variáveis de composição corporal e pressão arterial independentemente do polimorfismo T-786C do gene da eNOS.

## CAPÍTULO 5

### *Insights on the Interactive Effects of Physical Exercise and Endothelial Nitric Oxide Synthase Genotype on Nitric Oxide Availability and Vascular Control<sup>5</sup>*

#### **ABSTRACT**

Aerobic exercise training (AEX) may influence resting nitric oxide (NO) production, blood flow (BF) and blood pressure (BP). The endothelial nitric oxide synthase (eNOS) -786C allele is associated with reduced eNOS activity. This study investigated the influence of AEX and the T-786C eNOS gene polymorphism on plasma NO metabolites (NO<sub>x</sub>), BF and BP. Thirty-two pre-hypertensive subjects (59±6 yrs) had blood samples collected after a 12 hr overnight fast for NO<sub>x</sub> assays and SOD activity. Genotyping was done by standard PCR methods. Forearm BF (FBF) was measured using venous occlusion plethysmography at rest (FBF-0) and after 1 min of reactive hyperemia (FBF-1) following a 5 min ischemic period. NO<sub>x</sub>, FBF, SOD and BP were measured before and after 6 mo of AEX. BP was similar before and after AEX in both groups. Baseline NO<sub>x</sub> levels were significantly lower in the TC+CC group compared to the TT group (TT – 18.4 ± 4.4 / TC+CC – 15.2 ± 3.1). After AEX, the TC+CC group increased NO<sub>x</sub> levels (TT – 18.1 ± 3.7 / TC+CC – 16.9 ± 3.1), but there was no difference between groups. There was no significance at SOD activity before and after AEX. At baseline, there was a positive correlation between resting NO<sub>x</sub> and FBF-0 (r=0.6) and a negative correlation between DBP and FBF-0 (r=-0.7) in the TT group. After AEX these relationships remained unchanged, however there was a negative correlation between FBF-0 and SBP (r=-0.6). The change in NO<sub>x</sub> was negatively correlated to the change in DBP (r=-0.6) after AEX in the TT group. There was a negative correlation between DBP and FBF-1 (r=-0.8), a positive correlation between the change in NO<sub>x</sub> and the change in FBF-1 (r=0.8) and a negative correlation between the change in NO<sub>x</sub> and the change in DBP (r=-0.7) after AEX in the TC+CC group. The absence of correlation in the TC+CC group at baseline may be explained by the effect of the -786C allele. However, 6 mo of AEX may have normalized the relationships among NO, BP, and BF in -786C allele carriers.

**Key words:** Nitric oxide, physical activity, superoxide dismutase, eNOS polymorphism

---

<sup>5</sup>Estudo desenvolvido no Department of Kinesiology – University of Maryland / College Park – USA, sob a orientação do Prof Dr Michael Brown

## 5.1 INTRODUCTION

Nitric Oxide (NO) produced by NO synthase in endothelial cells (eNOS) has an important function in vascular control and almost every biological system, especially vasodilatation (CHANNON e GUZIK, 2002; RUSH *et al.*, 2005). When eNOS is activated by chemical (acetylcholine, bradikinin, etc.) or mechanical stimuli (shear stress), L-arginine metabolism is increased to form L-citrulline and NO inside of the endothelial cell (MONCADA *et al.*, 1991; MONCADA, 1994; SESSA *et al.*, 1994; COHEN e VANHOUTTE, 1995; HIGASHI *et al.*, 1999). Once NO is formed, it enters the vascular smooth muscle cell and causes an increase in guanylyl cyclase activity. This in turn, increases the calcium pump which decreases the concentration of calcium in vascular muscle cells. Without calcium, the vascular smooth muscle contraction process is interrupted and vasodilatation occurs (MONCADA, 1994; FISHER *et al.*, 2001; WEBB, 2003).

There are two mechanisms that have been suggested to maintain an adequate NO concentration in the vasculature: eNOS activity and NO-scavenging mechanisms (DORIS, 2002; LAUER *et al.*, 2002; ERBS, 2003; RUTHERFORD, 2003; TOUYZ e SCHIFFRIN, 2004; GUZIK *et al.*, 2005; HELTIANU *et al.*, 2005; FUKAI, 2007). The gene that codes for eNOS (NOS3 gene) has been identified as a potential candidate gene for hypertension and as such, eNOS activity may be partly genetically determined. A promoter polymorphism (T-786C) in the NOS3 gene has been reported to alter transcriptional and promoter activity. The C allele has been associated with lower promoter activity and therefore it is likely associated with reduced NO production.

Superoxide anion ( $O_2^-$ ) is produced in endothelial, adventitial, and vascular smooth muscle cells (MOMBOULI e VANHOUTTE, 1999; CHANNON e GUZIK, 2002; TOUYZ, 2004; CAMPO *et al.*, 2005; VANECKOVA *et al.*, 2005; LANDMESSER *et al.*, 2006) and is derived predominantly from NAD(P)H oxidase (TOUYZ e SCHIFFRIN, 2004).

In fact, NAD(P)H oxidase is the primary source of  $O_2^-$  in the vasculature (CHANNON e GUZIK, 2002; HAMILTON *et al.*, 2002; TOUYZ e SCHIFFRIN, 2004; LEE *et al.*, 2005; PARK, 2005; RUSH *et al.*, 2005). Humoral factors and physical factors such as shear stress can stimulate NAD(P)H oxidase activation and induce  $O_2^-$  production (TOUYZ e SCHIFFRIN, 2004; ZALBA *et al.*, 2005).

In the cardiovascular system, reactive oxygen species (ROS) such as  $O_2^-$  may play a pathophysiological role in cardiovascular dysfunction associated with conditions such as hypertension, diabetes and atherosclerosis (TOUYZ e SCHIFFRIN, 2004; ZALBA *et al.*, 2005; LANDMESSER *et al.*, 2006). Increased ROS production can leads to endothelial dysfunction and increased contractility, which are a major processes that contribute to vascular damage in cardiovascular disease (LOUNSBURY *et al.*, 2000; TOUYZ e SCHIFFRIN, 2004; RUSH *et al.*, 2005). When produced in excess, a significant amount of  $O_2^-$  reacts with NO to produce the harmful ROS peroxynitrite ( $ONOO^-$ ), which decreases NO bioavailability (DARLEY-USMAR *et al.*, 1995).

Aerobic Exercise Training (AEX) is a major stimulus to correct endothelial dysfunction. The vascular shear stress induced by AEX has been reported to influence cardiovascular control in two major ways. First, shear stress can increase eNOS expression and produce more NO, thereby potentially increasing its availability. Second, AEX can increase extracellular superoxide dismutase (ecSOD) production. ecSOD has an important function in the cardiovascular system because it has the capacity to react with  $O_2^-$  thereby potentially increasing NO availability.

Regular physical activity can improve endothelial NO mediated vasomotor function and reduce blood pressure in the majority of hypertensive undergoing exercise training. It is thought that an important mechanism for this is the increase in NO bioavailability (RUSH *et al.*, 2005). Nevertheless, responses to exercise interventions are

highly variable among individuals, and research has indicated that the response to exercise may be mediated, in parts, by variation in genes. The purpose of this study was investigate the influence of the physical exercise and the NOS3 T-786C gene polymorphism on circulating levels of NO metabolites (NOx), SOD activity, blood flow and blood pressure.

## **5.2 RESEARCH DESIGN AND METHODS**

### **5.2.1 Subjects**

This study was approved by the University of Maryland Institutional Review Board and all subjects provided written informed consent at the beginning of their first laboratory visit. Thirty two healthy, sedentary, pre-hypertensive subjects between 50 and 75 years of age were recruited from the College Park and surrounding area and underwent a telephone interview to assess their initial eligibility. Subjects had to be nondiabetic, nonsmoking, sedentary free of cardiovascular disease and were required to have a BMI of  $<37\text{kg/m}^2$ . Women were required to be  $> 2$  years postmenopausal and were required to maintain there hormone replacement therapy, either on or not on, for the duration of the study.

### **5.2.2 Screening**

Subjects' medical histories were reviewed on their first laboratory visit to ensure that they met study inclusion criteria. Hypertensive subjects using one antihypertensive medication were tapered off the medication before participating in the study. A 12-hr overnight fasting blood sample was drawn for plasma lipoprotein lipid analysis. Fasting plasma glucose level was determined and those with fasting blood glucose of  $>126\text{mg/dl}$  were excluded from the study. Subjects that qualified on the basis of these tests underwent a physical examination and a physician-supervised modified Bruce maximal

treadmill test to screen for cardiovascular disease as previously described (WEISS *et al.*, 2004).

### **5.2.3 Dietary Stabilization**

All qualified subjects underwent a dietary stabilization phase with a Registered Dietitian where they were instructed on how to maintain the American Heart Association (AHA) step 1 diet. Subjects were required to adhere to this diet specially because salt intake control and be weight stable for > 3 wk before undergoing baseline testing. During AEX all subjects was required to complete food frequency checklists every two months to monitor dietary intake and to ensure continued compliance with the AHA step 1 diet.

### **5.2.4 Baseline Testing**

At the completion of the dietary stabilization phase, all qualified subjects completed baseline testing that consisted of measurement of maximal oxygen consumption ( $\dot{V}O_2 \text{ max}$ ), forearm blood flow, and blood pressure.  $\dot{V}O_2 \text{ max}$  was determined during a graded exercise test to exhaustion using an online indirect calorimetry system composed of a breathing valve (model 2300, Hans Rudolph, Inc., Kansas City, Missouri), which is connected to a mixing chamber (Rayfield Equipment, Waitsfield, Vermont), medical gas analyzer (model 1100, Perkin Elmer, Inc., Danbury, Connecticut), and ventilation measurement module (VMM-400, Interface Associates, Aliso Viejo, California) interfaced to a microcomputer for online calculations using custom software. The highest  $VO_2$  achieved during the test was designated  $\dot{V}O_2 \text{ max}$ . Blood pressure, heart rate, and ECG were monitored and the test was stopped when the subject could not longer continue. The  $\dot{V}O_2 \text{ max}$  values were used to determine the exercise prescription for each subject for the

training intervention of the study. Casual BP was measured after 15 min of seated quiet rest on three separate days according to the JNC VII guidelines (CHOBANIAN *et al.*, 2003). The average of the three separately recorded BP measurements was used as the outcome variable in data analysis. Blood samples were drawn after a 12-hr overnight fast and placed in a tube with heparin. Blood samples were centrifuged at 2,000rpm at 4°C for 20 minutes. Supernatant plasma was transferred to micro tubes and stored at -80°C for later analysis of NO<sub>x</sub> concentration and SOD3 activity. All tests were done before and after 6 months of AEX.

### **5.2.5 Forearm Blood Flow**

All studies were conducted between 7:00 and 9:00 a.m. after an overnight fast of 12h. Subject assumed the supine position for 15 min. After the 15-min rest period, forearm blood flow (FBF) was measured in the subject's nondominant forearm using venous occlusion plethysmography and a mercury-filled silastic strain gauge placed around the widest part of the forearm. These resting FBF-measurement were made by a small cuff placed around the wrist and a large cuff placed around the upper arm. The arm cuff was inflating to 55mmHg using an automatic rapid cuff inflator. FBF was measured before (FBF-0) and after 1 (FBF-1), 2 (FBF-2) and 3 (FBF-3) minute of reactive hyperemia following a 5 min ischemic period. It has been shown that tissues appear to recover from hypoxia within 3 min and that peak blood flow occurs at approximately 1 min. In addition, resting heart rate and blood pressure were recorded simultaneously in the contra lateral arm. Forearm vascular resistance was calculated as the mean BP divided by the FBF. In order to muscle FBF, the wrist cuff was inflated to 200 mmHg to remove hand blood flow from the FBF measurement. To create arm ischemia, the arm cuff was inflated to 50 mmHg above each subjects resting systolic blood pressure and maintained for 5 minutes. Following the 5 minutes of arm

ischemia the wrist cuff was again inflated and the arm cuff was inflated each minute for three minutes of reactive hyperemia.

### **5.2.6 Aerobic Exercise Training**

All subjects underwent 6 months of supervised aerobic exercise training (AEX) 3 times/wk. Exercise sessions started and concluded with appropriate warm-up and cool-down activities. Initial training sessions consisted of 20 min of exercise at 50%  $\dot{V}O_2$  max. Following Hagberg's recommendations (2000), training duration was increased by 5 min every week until 40 min of exercise at 50%  $\dot{V}O_2$  max. Training intensity was then increased by 5%  $\dot{V}O_2$  max every week until an intensity of 70%  $\dot{V}O_2$  max was achieved. Heart rate monitors were used to monitor exercise intensity and to ensure that the subjects trained at the appropriate heart rate. Only subjects who completed >75% of training sessions at the prescribed duration, intensity and frequency were included in the final data analysis. After 3 months of physical training the  $\dot{V}O_2$  max test was evaluated for the training intensity adjustment.

### **5.2.7 Genetic Analysis**

Each subject's DNA was isolated from leukocytes in a blood sample using PureGene Kit (Gentra System, Minneapolis, MN) and was typed at the NOS3 T-786C using polymerase chain reaction amplification with flanking primers F:5'-CACCCAGGCC CACCCCAACT-3' and R:5'-GCCGCAGGTCGACAGAGAGACT -3'. DNA was denatured for 5 minutes at 95°C by 35 cycles of denaturation (30s, 95 °C), annealing (15s, 54 °C), and extension (30s, 72 °C). The amplicon was digested overnight at 37 °C using 5µM of MspI

followed by electrophoresis for 4 hours in a gel composed of 2% agarose. The T allele yields a fragment of 415bp, and the C allele yields fragments of 370bp and 45bp.

### **5.2.8 NO Assay**

Plasma was ultra filtered and NO<sub>x</sub> was analyzed by modification of the Greiss Assay as previous reported (BROWN *et al.*, 2000; WEISS *et al.*, 2004). For all assays, samples were run in duplicate, and the mean of duplicates was used to represent the sample value for the respective analysis. When results or a coefficient of variation for duplicate measures of a sample were discrepant, the sample was reassessed in a subsequent assay.

### **5.2.9 SOD Activity**

Samples for plasma SOD activity analysis were drawn into heparinized tubes and the blood was centrifuged at 3000 rpm for 20 minutes at 4°C. Plasma SOD levels was measured using a commercially available assay kit (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI), which measures total SOD activity. Baseline and final samples was assayed in duplicate, and the mean of duplicates was used to represent the sample value for the respective analysis.

## **5.3 STATISTICAL ANALYSIS**

Based on the reported C allele frequency, the C allele carriers were grouped into a combined TC+CC genotype group and compared with the TT genotype group. Descriptive statistics were calculated for the both genotype groups (TT and TC+CC) and an one-way ANOVA was performed to assess potential differences with NOS3 genotype as the independent variables and BMI, blood pressure,  $\dot{V}O_2$  max, NO<sub>x</sub> and SOD activity as the dependent variables. A two-way ANOVA, with the genotype and physical training as an independent variable and FBF and BMI as a dependent variable was performed to assess

differences in hemodynamic responses during reactive hyperemia. A correlation analysis was performed to assess potential interactive and main effects between the dependent variables at rest (baseline) and at 1, 2, and 3 min during reactive hyperemia. Additional dependent variables were the blood pressure and  $\dot{V}O_2 \text{ max}$ . The data was analyzed using SPSS 13.0 program. All results are presented as means  $\pm$  SE. A value of  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## 5.4 RESULTS

Thirty-two subjects were divided into two groups based upon their genotype for the T-786C polymorphism (TT, TC, CC). Subjects were categorized into a combined TC+CC genotype group (n = 12) and compared to the TT genotype group (n = 20). The C allele is considered to have deleterious cardiovascular effects, with CC and TC genotype group demonstrating similar responses that are different than the group with TT genotype (NAKAYAMA *et al.*, 1999; ROSSI *et al.*, 2003). Thus, it appears appropriate from a mechanistic perspective to group the C allele carriers into a combined TC+CC genotype group. The subject characteristic of the NOS3 T-786C genotype groups,  $\dot{V}O_2 \text{ max}$ , NOx levels and SOD activity are summarized in Table 5.1.

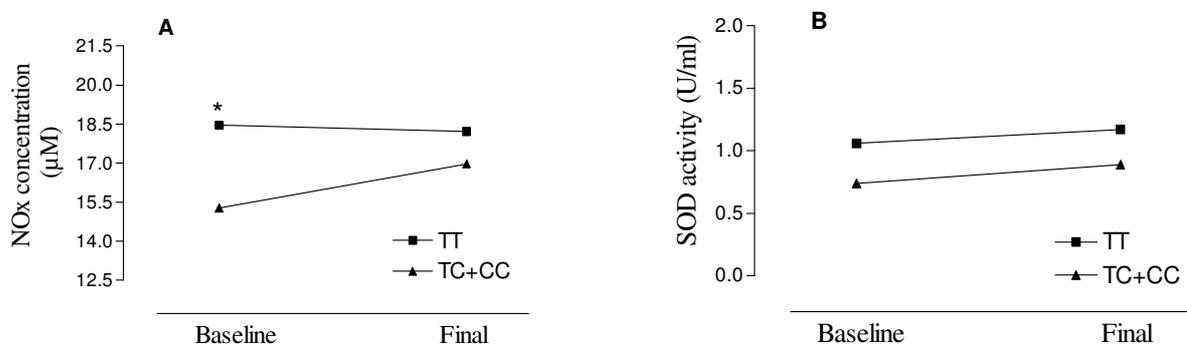
At baseline, there were no statistical differences in SBP, DBP and SOD activity between TT and TC+CC groups. Though, the TC+CC group had an average SOD activity that was approximately 30% lower than the TT group, this difference did not achieve statistical significance. Plasma NOx levels were significantly different ( $p < 0.03$ ) between the TC+CC and TT genotype groups at baseline

**TABLE 5.1:** Subject characteristics for the genotype groups before and after 6 month of AEX

	TT (n=20)		TC+CC (n=12)	
	Baseline	Final	Baseline	Final
Age (years-old)	60.2 ± 6.7	-	59.0 ± 7.1	-
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.9 ± 3.6	19.5 ± 12.0 <sup>a</sup>	29.5 ± 3.1	26.0 ± 8.7 <sup>b</sup>
SBP (mmHg)	130.6 ± 9.9	131.1 ± 12.8	133.0 ± 18.2	130.1 ± 13.4
DBP (mmHg)	85.8 ± 6.6	85.9 ± 6.1	88.0 ± 9.6	86.7 ± 9.4
VO <sub>2</sub> max (ml.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	26.1 ± 5.4	28.4 ± 7.1 <sup>a</sup>	25.2 ± 5.4	29.0 ± 5.7 <sup>a</sup>
NOx (µM)	18.4 ± 4.4	18.1 ± 3.7	15.2 ± 3.1 <sup>b</sup>	16.9 ± 3.1
SOD (U/ml)	1.06 ± 0.8	1.17 ± 1.0	0.74 ± 0.3	0.89 ± 0.3

BMI, body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; VO<sub>2</sub>max, maximal oxygen consumption; NOx, nitric oxide metabolite; SOD, superoxide dismutase. Values are means ± SE. <sup>a</sup>Statistical difference between baseline and final test. <sup>b</sup>Statistical difference between genotype groups (p<0.05).

After AEX, BMI was lower in both groups. However only the TT group was exhibited statistically different changes. VO<sub>2</sub> max was significantly increased in both groups after AEX. In the TC+CC group plasma NOx increased with AEX, but this increase was not statistically significant (Figure 5.1). After AEX, there were no significant differences between groups.

**FIGURE 5.1:** Plasma NOx concentration and SOD activity before and after 6 mo of AEX in the genotype groups.

The table 5.2 summarizes the interactive effects between eNOS T-786C genotype and physical activity level on hemodynamic variable at baseline and during reactive hyperemia before and after AEX.

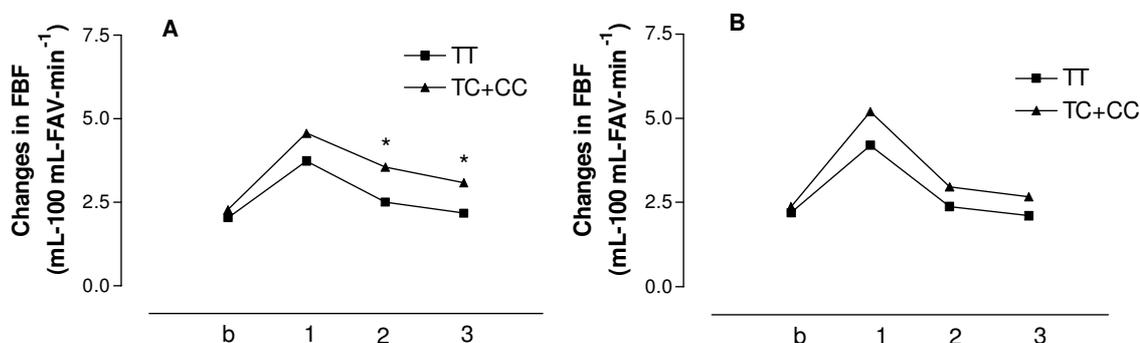
**TABLE 5.2:** Interactive effect of NOS3 gene polymorphism and AEX on FBF

	TT		TC+CC	
	Baseline	Final	Baseline	Final
FBF-0 (mL/100 mL/FAV/min <sup>-1</sup> )	2.04 ± 0.6	2.20 ± 1.0	2.28 ± 0.8	2.36 ± 0.8
FBF-1min (peak) (mL/100 mL/FAV/min <sup>-1</sup> )	3.74 ± 1.5	4.20 ± 2.0	4.57 ± 1.1	5.19 ± 2.8
FBF-2min (mL/100 mL/FAV/min <sup>-1</sup> )	2.51 ± 0.9	2.38 ± 1.0	3.56 ± 1.1*	2.96 ± 1.9
FBF-3min (mL/100 mL/FAV/min <sup>-1</sup> )	2.18 ± 0.8	2.11 ± 0.9	3.09 ± 1.1*	2.67 ± 1.5
FVR-b (μ)	54.1 ± 19.3	55.4 ± 32.4	50.4 ± 27.2	45.1 ± 19.5
FVR-1 (peak) min (μ)	30.9 ± 11.6	31.3 ± 25.5	22.3 ± 6.5	21.0 ± 7.2
FVR-2 min (μ)	45.0 ± 17.9	49.0 ± 23.8	29.9 ± 11.6	38.3 ± 14.0
FVR-3 min (μ)	48.3 ± 16.3	58.3 ± 35.7	35.4 ± 16.9	43.2 ± 19.9

FBF, forearm blood flow (baseline and after 1, 2 and 3 min of reactive hyperemia); FRV, forearm vascular resistance (baseline and after 1, 2 and 3 min of reactive hyperemia).

\* Statistical differences between groups (p<0.05)

There were significant differences between genotype groups in FBF at the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> minutes of reactive hyperemia at baseline. At both time-point, the TC+CC group had greater FBF values compared to the TT genotype group. After AEX no statistical differences was found between groups (Figure 5.2).



**FIGURE 5.2:** Main effect of the FBF at baseline (FBF-0) and during the 3 minutes of reactive hyperemia in NOS3 T-786C genotype groups baseline, before (panel A) and after (panel B) 6 months of AEX.

The correlation analysis showed a positive correlation between resting plasma NOx and FBF-0 ( $r = 0.6$ ;  $p < 0.05$ ) and a negative correlation between DBP and FBF-0 ( $r = -0.7$ ;  $p < 0.05$ ) only in the TT group at baseline (table 3). After AEX these relationships remained unchanged, however there was also a negative correlation between FBF-0 and SBP ( $r = -0.6$ ;  $p < 0.05$ ). The change in NOx was negatively correlated to the change in DBP ( $r = -0.6$ ;  $p < 0.05$ ) only in the TT group. No significant correlations were found among the variables at baseline in the TC+CC group. There was a negative correlation between DBP and FBF-1 ( $r = -0.8$ ;  $p < 0.05$ ), a positive correlation between the change in NOx and the change in FBF-1 ( $r = 0.8$ ;  $p < 0.05$ ) and a negative correlation between the change in NOx and the change in DBP ( $r = -0.7$ ;  $p < 0.05$ ) with AEX in the TC+CC group. All correlations are summarized in table 5.3

**TABLE 5.3:** Correlation analysis among NOx, BP, and BF in both groups before (baseline) and after (final) 6 month of physical training

	r	p
<b>TT GROUP</b>		
<b>Baseline</b>		
NOx - FBF-0	0.6	0.05
DBP - FBF-0	-0.7	0.05
<b>Final</b>		
NOx - FBF-0	0.6	0.05
DBP - FBF-0	-0.7	0.05
SBP - FBF-0	-0.6	0.05
<b>Changes with AEX</b>		
NOx change vs. DBP change	-0.6	0.05
<b>TC+CC GROUP</b>		
<b>Baseline</b>		
no correlation	-	-
<b>Final</b>		
DBP - FBF-1	-0.8	0.05
<b>Changes with AEX</b>		
NOx change vs. FBF-1 change	0.8	0.05
NOx change vs. DBP change	-0.7	0.05

## 5.5. DISCUSSION

The present study was designed to assess the potential interactive effects between the T-786C NOS3 gene polymorphism and 6 mo of aerobic exercise training on the hemodynamic response.

As expected,  $\dot{V}O_2$  max was significant greater ( $p<0.04$ ) in both groups and the decreased BMI values after AEX showed that the intervention had sufficient intensity to elicit significant improvements in aerobic capacity and body composition.

There were no significant differences in SBP and DBP before and after AEX. Hagberg and colleagues (2000) indicated that exercise training can decrease blood pressure in approximately 75% in individuals with hypertension and the moderate intensity training appears to be as, if not more, beneficial as higher intensity training for reduce BP. Higashi and colleagues (1999) also indicated the benefit effect of the regular aerobic exercise in blood pressure in hypertensive patients. Ours results had just pre-hypertensive participants and because that it was not expected huge differences in BP between groups, before and after AEX.

The T-786C polymorphism has potentially important function at the cardiovascular control because is related with potentially affects NOS3 gene expression levels (WANG e WANG, 2000). In our study the NOx values were statistically lower in the TC+CC group compared with the TT group at baseline. So, our results are in congruence with previous findings which show that the TC+CC genotype individuals had a reduction in NO concentration (NAKAYAMA *et al.*, 1999; ROSSI *et al.*, 2003; METZGER *et al.*, 2005; TAVERNA *et al.*, 2005; DENGEL *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2006). For example Nakayama and colleagues (1999) found that individuals with a C allele had 50% decreased promoter activity compared with individuals without a C allele, which is consistent with the concept

that the C allele is associated with reduced NO concentration. So, these results agree with the report that the C allele is associated with reduced NOS3 transcriptional and promoter activity.

After AEX there was no change in NOx values at the TT group. One possible explanation for this result may be that this value is enough to keep the normal blood pressure and the cardiovascular control. In the TC+CC group the NOx level increased but no statistical difference was found. This result suggests that the AEX did not increase NO concentration, but the AEX is being able to increase the response of NOx concentration in the TC+CC NOS3 polymorphism carrier. These results are in agreement with some studies (SESSA *et al.*, 1994; KINGWELL, 2000; HIGASHI e YOSHIZUMI, 2004).

Growing evidence has been accumulating to indicate that chronic exercise enhances antioxidant defense system in human vessels by increase in ec-SOD (CAMPO *et al.*, 2005; GUZIK *et al.*, 2005; OHTA *et al.*, 2005; VANECKOVA *et al.*, 2005; FUKAI, 2007).

The SOD activity levels were consistently, but not statistically lower, in the TC+CC genotype group compared to the TT genotype group. In addition, in both groups there were no differences between baseline and final test. One possible explanation for this result may be the small sample size and the absence of the SOD polymorphism evaluation. So, the absence of changes in SOD activity may suggest that antioxidant capacity is not impaired in these pre-hypertensive subjects. In this case, data collection is continuing in order to increase sample sizes.

The FBF was lower in TT group just after 2 and 3 minutes of reactive hyperemia at baseline. This result showed that the TT group returned to the baseline levels faster than the TC+CC groups.

Reactive hyperemia in peripheral arteries has been shown to be mediated largely by release of NO (HIGASHI *et al.*, 1999). Thereby, the lower NOx level in TC+CC

group and the difference in the FBF after 2 and 3 minutes of reactive hyperemia between groups at baseline in our results are in agreement with other studies (DATA *et al.*, 2003). Besides, there are a lot of substances that can be related with the vascular response such as potassium, oxygen, carbon dioxide and adenosine (KORAMAZ *et al.*, 2006; FROBERT *et al.*, 2007; JUEL *et al.*, 2007; MARSHALL, 2007).

The absence of correlation in the TC+CC group at baseline may be explained by the effect of the -786C allele. However, 6 months of AEX may have normalized the relationships among NO, BP, and BF in -786C allele carriers.

After AEX the TT group reported to have “normal” vasomotor and cardiovascular function and it had less effect of AEX on the FBF. However, the TC+CC group decreased these values and had the same response of the TT group after AEX. So, the capacity to restore homeostasis more quickly in the TC+CC group after AEX may indicate the favorable response of the physical training, and thus, the AEX may have to improve the peripheral vascular function response. This agrees with the previous finding which showed the beneficial effect of aerobic physical training on the blood flow in different NOS3 genotype groups (HIGASHI *et al.*, 1999; KINGWELL, 2000; DATA *et al.*, 2003).

It has been shown that the increased blood flow by physical activity may enhance NO release in vascular endothelium (HIGASHI *et al.*, 1999). But, our result did not show differences in NO<sub>x</sub> levels before and after AEX.

## **5.6 CONCLUSION**

Thereby, the present study found an interactive effect between physical activity level and the NOS3 T-786C gene polymorphism and it suggests that increased regular physical activity enhanced the response of NO<sub>x</sub> in the cardiovascular control and it improved the relationship among BP and FBF.

## **S**íntese dos Resultados e Conclusões

Com objetivo geral de verificar o efeito de um programa de exercício físico regular na concentração e na biodisponibilidade do óxido nítrico em portadores do polimorfismo T-786C do gene da eNOS e, verificar qual o efeito destas variáveis na pressão arterial, este estudo foi dividido em capítulos que abrangiam objetivos específicos propostos inicialmente.

Desta forma, o primeiro estudo experimental (capítulo 3) buscou verificar qual a influência que os valores de composição corporal, perfil lipídico e glicemia estariam exercendo sobre os níveis de pressão arterial em indivíduos portadores do polimorfismo T-786C do gene da eNOS. Devido a grande homogeneidade da população analisada, os resultados deste estudo mostraram que os valores do perfil lipídico e composição corporal não exerceram interferência nos valores de pressão arterial independentemente da presença do polimorfismo T-786C do gene da eNOS.

O capítulo 4 teve como objetivo verificar qual a influência que um programa aeróbio de exercício físico exerceria sobre as variáveis do perfil lipídico, composição corporal e concentrações de óxido nítrico em indivíduos portadores do polimorfismo T-786C do gene da eNOS, verificando qual a associação que essas variáveis teriam sobre a pressão arterial desses indivíduos. Os resultados deste estudo mostraram que, no momento inicial

(pré-treinamento) da mesma forma que no capítulo 3, as variáveis do perfil lipídico e composição não exerceram nenhuma influência nos resultados de pressão arterial. No momento pós-treinamento pôde-se verificar que somente as variáveis de pressão arterial tiveram uma redução significativa de seus valores e, esta redução pode ter recebido uma pequena influência das variáveis de composição corporal. Mais uma vez este resultado ocorreu independentemente do polimorfismo T-786C do gene da eNOS.

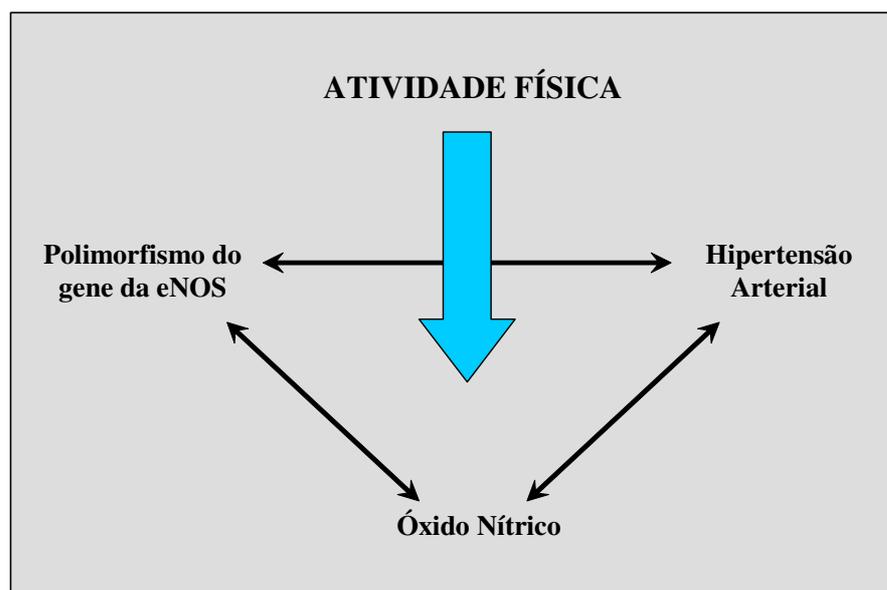
O último estudo experimental (capítulo 5) teve como objetivo verificar a influência que o exercício físico e o polimorfismo T-786C do gene da eNOS estariam exercendo nas concentrações de óxido nítrico, na atividade da superóxido dismutase, no fluxo sanguíneo e na pressão arterial. Estes resultados mostraram que as concentrações de NO, no momento pré-treinamento foram menores no grupo portador do polimorfismo do gene da eNOS (TC+CC) quando comparado ao grupo não portador (TT) mas, o treinamento físico aplicado foi suficiente para elevar as concentrações de NO do grupo TC+CC igualando-o aos valores do grupo TT, aumentando a resposta do NO para o sistema cardiovascular. O mesmo comportamento foi observado para as variáveis de fluxo sanguíneo. Para os valores da superóxido dismutase, as ausências de diferenças entre os grupos e momentos indicam que o fator biodisponibilidade não está sendo um fator limitante para este estudo.

Em termos gerais, o foco principal deste estudo foi analisar a relação existente entre o polimorfismo T-786C do gene da eNOS, as concentrações de NO e a hipertensão arterial, associando o papel do exercício físico nesta relação.

Antes de analisar a relação dessas variáveis entre si, este estudo analisou qual a interferência que as variáveis do perfil lipídico e composição corporal poderiam estar exercendo nesta relação. Os resultados mostraram que, no momento pré treinamento, todas essas variáveis se mostraram independentes das relações entre os três fatores. Este dado foi extremamente positivo, haja vista que todos os participantes estavam com as mesmas

condições nos momentos iniciais deste estudo. Com o programa de exercício físico somente as variáveis de composição corporal estariam exercendo uma contribuindo para as relações entre o polimorfismo, NO e hipertensão arterial. Este resultado pode ser concluído principalmente devido às correlações apresentadas entre as variáveis de composição corporal, pressão arterial e  $\dot{V}O_2$  max .

Com relação às associações que este estudo buscou analisar (figura 6), diversos autores têm mostrado que indivíduos portadores do polimorfismo T-786C do gene da eNOS estariam apresentando uma maior incidência de hipertensão arterial em detrimento de uma diminuição das concentrações de NO (MIYAMOTO *et al.*, 1998; SHOJI *et al.*, 2000; WANG e WANG, 2000; SANDRIM, 2006). Neste caso, os fatores genéticos, especificamente o polimorfismo T-786C tem sido responsável por uma redução da atividade promotora da eNOS em aproximadamente 50% e também por 25 a 60% dos casos de hipertensão arterial. Ainda, nesses indivíduos hipertensos a produção de NO é diminuída abaixo das condições basais (MIYAMOTO *et al.*, 1998; SANDRIM, 2006).



**FIGURA 6:** Ilustração da influência do exercício físico nas relações entre o polimorfismo T-786C do gene da eNOS, concentrações de óxido nítrico e hipertensão arterial

Devido às limitações impostas pelo critério de inclusão dos participantes neste estudo, os resultados encontrados divergem um pouco dos resultados apresentados pela literatura. Ambos os capítulos 3 e 4 concluíram que os valores de pressão arterial e as concentrações de NO foram independentes do polimorfismo T-786C do gene da eNOS. O único resultado que estaria corroborando com os resultados da literatura seria a tendência de indivíduos hipertensos apresentarem concentrações menores de NO. Por outro lado, o capítulo 5 apresenta que as concentrações do NO foram dependentes do polimorfismo T-786C, mas foram independentes dos valores de pressão arterial. Certamente essa diferença ocorreu devido ao critério de inclusão dos participantes que na tentativa de homogeneizar a amostra, esses critérios acabaram limitando os resultados, pois indivíduos com diagnóstico de hipertensão arterial estágios 2 ou superior foram excluídos do estudo. Um outro fator limitante deste estudo foi a influência que a medicação exerceu no diagnóstico inicial dos participantes e nos resultados finais deste estudo.

Desta forma, pode-se concluir que o polimorfismo T-786C do gene da eNOS não pode ser considerado como um marcador, mas sim, como um indicador de hipertensão arterial. Este resultado está de acordo com Sandrim e colaboradores (2006) que também concluíram que o genótipo da eNOS não é considerado um marcador para o risco de desenvolvimento da hipertensão arterial, mas certamente pode ajudar em um melhor entendimento das bases moleculares da hipertensão arterial.

Um outro resultado encontrado que contribui para tal conclusão é a resposta do fluxo sanguíneo entre os participantes de cada grupo. O grupo TT, por apresentar uma concentração mais elevada de NO, apresentou uma resposta mais rápida comparada a resposta do grupo TC+CC. Este resultado pode indicar que esses indivíduos possuíam uma menor disfunção endotelial devido ao fato de conseguirem voltar aos valores basais de fluxo

sanguíneo mais rapidamente e isso, certamente, contribui para o controle da pressão arterial. De acordo com Pereira e colaboradores (2006) o NO está envolvido em 3 mecanismos fundamentais para a regulação do fluxo sanguíneo e da pressão arterial: (a) controle do tônus vascular de repouso; (b) adaptação do fluxo sanguíneo de repouso para a demanda metabólica tecidual e; (c) adaptação do diâmetro vascular para o volume do fluxo sanguíneo. Desta forma, como um dos estudos apresentou que os indivíduos TT tinham valores de NO maiores do que os TC+CC e, em outro estudo indivíduos normotensos apresentaram valores maiores de NO, pode-se concluir que o polimorfismo T-786C do gene da eNOS e as concentrações de NO podem ser considerados como indicadores de hipertensão arterial.

No momento pós-treinamento físico, o capítulo 4 mostrou que apenas o grupo G2 apresentou um ligeiro aumento nas concentrações de NO em virtude do treinamento aplicado enquanto que todos os outros grupos permaneceram com praticamente os mesmos valores de NO. É importante salientar que este resultado possui limitações devido ao número de participantes, especialmente no G2, mas no geral, o programa de exercício físico não foi suficiente para provocar tais alterações. Uma das justificativas para este resultado pode ser a ausência de diferenças nos valores de  $\dot{V}O_2 \text{ max}$ , mostrando que o treinamento não atingiu intensidades ideais para que ocorressem tais mudanças.

Por outro lado, no capítulo 5 os indivíduos portadores do polimorfismo T-786C do gene da eNOS que apresentavam uma diminuição das concentrações de NO, aumentaram essas concentração após o programa de exercício físico. Este resultado ocorreu juntamente com um aumento nos valores de  $\dot{V}O_2 \text{ max}$  que indicam que o treinamento físico foi suficiente para provocar mudanças fisiológicas. Este resultado está de acordo com Roberts e colaboradores (1999) que relataram que o exercício físico possui a capacidade de aumentar a atividade da eNOS em 40% devido ao aumento do *shear stress*. Corroborando com esses resultados Sandrim (2006) também relatou que o *shear stress*, proveniente do exercício físico

estaria aumentando a expressão do gene da eNOS independente da presença do polimorfismo T-786C, mas este efeito seria mais significativo aos indivíduos portadores do alelo C, pois eles possuem uma atividade 30% menor deste gene.

Associando todos os estudos realizados em cada capítulo conclui-se que tanto o polimorfismo do gene da eNOS (T-786C) quanto as concentrações de NO podem ser considerados como indicadores de hipertensão arterial e que um programa de exercício físico com intensidades mais elevadas (aproximadamente 70% do  $\dot{V}O_2$  max ) é capaz de contribuir para o sistema de controle da pressão arterial pois proporciona intensidade suficiente para diminuir os valores de pressão arterial de indivíduos hipertensos independentemente do polimorfismo T-786C do gene da eNOS e, elevar as concentrações de NO em indivíduos polimórficos.

## **R**eferências Bibliográficas

ACSM, A. C. O. S. M.-. Manual do ACSM para testes de esforço e prescrição do exercício: Revinter. 2000. 314 p.

ADLAM, D., J. K. BENDALL, J. P. DE BONO, N. J. ALP, J. KHOO, T. NICOLI, *et al.* Relationships between nitric oxide-mediated endothelial function, eNOS coupling and blood pressure revealed by eNOS-GTP cyclohydrolase 1 double transgenic mice. Exp Physiol, v.92, n.1, Jan, p.119-26. 2007.

BABAL, P., O. PECHANOVA, I. BERNATOVA e S. STVRTINA. Chronic inhibition of NO synthesis produces myocardial fibrosis and arterial media hyperplasia. Histol Histopathol, v.12, n.3, Jul, p.623-9. 1997.

BARCELLOS, M. T., F. FUCHS e S. C. FUCHS. Indicadores antropométricos preditores da incidência de hipertensão. Hipertensão, v.9, n.2, p.56-59. 2006.

BARROS, R. C., L. G. BONAGAMBA, R. OKAMOTO-CANESIN, M. DE OLIVEIRA, L. G. BRANCO e B. H. MACHADO. Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. Auton Neurosci, v.97, n.2, May 31, p.110-5. 2002.

BAYLIS, C., B. MITRUKA e A. DENG. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. J Clin Invest, v.90, n.1, Jul, p.278-81. 1992.

BEST, P. J., P. B. BERGER, V. M. MILLER e A. LERMAN. The effect of estrogen replacement therapy on plasma nitric oxide and endothelin-1 levels in postmenopausal women. Ann Intern Med, v.128, n.4, Feb 15, p.285-8. 1998.

BILSBOROUGH, W., D. J. GREEN, C. D. MAMOTTE, F. M. VAN BOCKXMEER, G. J. O'DRISCOLL e R. R. TAYLOR. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism, homocysteine, cholesterol and vascular endothelial function. Atherosclerosis, v.169, n.1, Jul, p.131-8. 2003.

BOLAD, I. e P. DELAFONTAINE. Endothelial dysfunction: its role in hypertensive coronary disease. Curr Opin Cardiol, v.20, n.4, Jul, p.270-4. 2005.

- BOO, Y. C. e H. JO. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. Am J Physiol Cell Physiol, v.285, n.3, Sep, p.C499-508. 2003.
- BRAY, M. S. Genomics, genes, and environmental interaction: the role of exercise. J Appl Physiol, v.88, n.2, Feb, p.788-92. 2000.
- BREDT, D. S., P. M. HWANG, C. E. GLATT, C. LOWENSTEIN, R. R. REED e S. H. SNYDER. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. Nature, v.351, n.6329, Jun 27, p.714-8. 1991.
- BROWN, M. D., R. V. HOGIKYAN, D. R. DENGEL e M. A. SUPIANO. Sodium-sensitive hypertension is not associated with higher sympathetic nervous system activity in older hypertensive humans. Am J Hypertens, v.13, n.8, Aug, p.873-83. 2000.
- BRUM, P. C., C. L. M. FORJAZ, T. TINUCCI e C. E. NEGRAO. Adaptações agudas e crônicas do exercício físico no sistema cardiovascular. Revista Paulista de Educação Física, v.18, ago, p.21-31. 2004.
- CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. e A. S. HAIBARA. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. Rev Bras Hipertens, v.8, p.30-40. 2001.
- CAMPO, S., A. M. SARDO, G. M. CAMPO, A. D'ASCOLA, A. AVENOSO, M. CASTALDO, *et al.* Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) gene mutations screening in a sample of Mediterranean population. Mutat Res, v.578, n.1-2, Oct 15, p.143-8. 2005.
- CHANNON, K. M. e T. J. GUZIK. Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. J Physiol Pharmacol, v.53, n.4 Pt 1, Dec, p.515-24. 2002.
- CHOBANIAN, A. V., G. L. BAKRIS, H. R. BLACK, W. C. CUSHMAN, L. A. GREEN, J. L. IZZO, JR., *et al.* Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. Hypertension, v.42, n.6, Dec, p.1206-52. 2003.
- CLARKSON, P., H. E. MONTGOMERY, M. J. MULLEN, A. E. DONALD, A. J. POWE, T. BULL, *et al.* Exercise training enhances endothelial function in young men. J Am Coll Cardiol, v.33, n.5, Apr, p.1379-85. 1999.
- CLAUDINO, M. A., F. B. PRIVIERO, C. E. TEIXEIRA, G. DE NUCCI, E. ANTUNES e A. ZANESCO. Improvement in relaxation response in corpus cavernosum from trained rats. Urology, v.63, n.5, May, p.1004-8. 2004.
- COGOLLUDO, A., F. PEREZ-VIZCAINO e J. TAMARGO. New insights in the pharmacological therapy of arterial hypertension. Curr Opin Nephrol Hypertens, v.14, n.5, Sep, p.423-7. 2005.
- COHEN, R. A. e P. M. VANHOUTTE. Endothelium-Dependent Hyperpolarization : Beyond Nitric Oxide and Cyclic GMP. Circulation, v.92, p.3337-3349. 1995.

CRYSTAL, G. J., X. ZHOU, S. ALAM, A. PIOTROWSKI e G. HU. Lack of role for nitric oxide in cholinergic modulation of myocardial contractility in vivo. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.281, n.1, Jul, p.H198-206. 2001.

CURI, R. Entendendo a gordura - os ácidos graxos. São Paulo: Manole. 2002. 360 p.

DARLEY-USMAR, V., H. WISEMAN e B. HALLIWELL. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. FEBS Lett, v.369, n.2-3, Aug 7, p.131-5. 1995.

DATA, S. A., M. H. ROLTSCH, B. HAND, R. E. FERRELL, J. J. PARK e M. D. BROWN. eNOS T-786C genotype, physical activity, and peak forearm blood flow in females. Med Sci Sports Exerc, v.35, n.12, Dec, p.1991-7. 2003.

DELP, M. D., R. M. MCALLISTER e M. H. LAUGHLIN. Exercise training alters endothelium-dependent vasoreactivity of rat abdominal aorta. J Appl Physiol, v.75, n.3, Sep, p.1354-63. 1993.

DENGEL, D. R., M. D. BROWN, R. E. FERRELL, T. H. REYNOLDS e M. A. SUPIANO. A preliminary study on T-786C endothelial nitric oxide synthase gene and renal hemodynamic and blood pressure responses to dietary sodium. Physiol Res, Aug 22. 2006.

DEVLIN, A. M., M. J. BROSNAN, D. GRAHAM, J. J. MORTON, A. R. MCPHADEN, M. MCINTYRE, *et al.* Vascular smooth muscle cell polyploidy and cardiomyocyte hypertrophy due to chronic NOS inhibition in vivo. Am J Physiol, v.274, n.1 Pt 2, Jan, p.H52-9. 1998.

DOMINICZAK, A. F. e D. F. BOHR. Nitric oxide and its putative role in hypertension. Hypertension, v.25, n.6, Jun, p.1202-11. 1995.

DÓREA, E. L. e P. A. LOTUFO. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica. Hipertensão, v.7, n.3, p.86-89. 2004.

DORIS, P. A. Hypertension genetics, single nucleotide polymorphisms, and the common disease:common variant hypothesis. Hypertension, v.39, n.2 Pt 2, Feb, p.323-31. 2002.

DREXLER, H. e B. HORNIG. Endothelial dysfunction in human disease. J Mol Cell Cardiol, v.31, n.1, Jan, p.51-60. 1999.

ERBS, S., BAITHER, Y., LINKE, A., ADAMS, V., SHU, Y., LENK, K., GIELEN, S., DILZ, R., SCHULER, G., HAMBRECHT, R. Promoter but not exon 7 polymorphism of endothelial nitric oxide synthase affects training-induced correction of endothelial dysfunction. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.23, n.10, Oct 1, p.1814-9. 2003.

FAGARD, R. H. e V. A. CORNELISSEN. Effect of exercise on blood pressure control in hypertensive patients. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, v.14, n.1, Feb, p.12-7. 2007.

FEITOSA, D. B. L. A. M., G. B. PARENTE e M. A. MOTA-GOMES. Hipertensão mascarada em paciente com síndrome metabólica e doença coronária. Hipertensão, v.9, n.3, p.96-99. 2006.

- FERNANDES, L. G., V. R. ANTUNES, L. G. BONAGAMBA e B. H. MACHADO. Pressor response to chemoreflex activation in awake rats: role of vasopressin and adrenal medulla. Physiol Behav, v.84, n.1, Jan 31, p.39-44. 2005.
- FISHER, A. B., S. CHIEN, A. I. BARAKAT e R. M. NEREM. Endothelial cellular response to altered shear stress. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.281, p.L529-L533. 2001.
- FLEMING, I. e R. BUSSE. NO: the primary EDRF. J Mol Cell Cardiol, v.31, n.1, Jan, p.5-14. 1999.
- FORJAZ, C. L. M., C. G. C. JUNIOR, E. A. ARAÚJO, L. A. R. COSTA, L. TEIXEIRA e R. S. GOMIDES. Exercício físico e hipertensão arterial: riscos e benefícios. Hipertensão, v.9, n.3, p.104-112. 2006.
- FRANKLIN, B. A., S. GORDON e G. C. TIMMIS. Exercise prescription for hypertensive patients. Ann Med, v.23, n.3, Aug, p.279-87. 1991.
- FROBERT, O., P. HOLMAGER, K. M. JENSEN, E. B. SCHMIDT e U. SIMONSEN. Effect of acute changes in oxygen tension on flow-mediated dilation. Relation to cardiovascular risk. Scand Cardiovasc J, Jun 11, p.1-10. 2007.
- FUKAI, T. Extracellular SOD inactivation in high-volume hypertension: role of hydrogen peroxide. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.27, n.3, Mar, p.442-4. 2007.
- FURCHGOTT, R. F. e J. V. ZAWADZKI. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature, v.288, n.5789, Nov 27, p.373-6. 1980.
- GARDINER, S. M., A. M. COMPTON, P. A. KEMP e T. BENNETT. Regional and cardiac haemodynamic effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester in conscious, Long Evans rats. Br J Pharmacol, v.101, n.3, Nov, p.625-31. 1990.
- GAVA, N. S., A. S. VERAS-SILVA, C. E. NEGRAO e E. M. KRIEGER. Low-intensity exercise training attenuates cardiac beta-adrenergic tone during exercise in spontaneously hypertensive rats. Hypertension, v.26, n.6 Pt 2, Dec, p.1129-33. 1995.
- GEBBER, G. L. e D. W. SNYDER. Hypothalamic control of baroreceptor reflexes. Am J Physiol, v.218, n.1, Jan, p.124-31. 1970.
- GOULART, A. C. e I. J. M. BENSEÑOR. Obesidade e Hipertensão. Hipertensão, v.9, n.1, p.27-30. 2006.
- GRASSI, G., G. SERAVALLE, D. A. CALHOUN e G. MANCIA. Physical training and baroreceptor control of sympathetic nerve activity in humans. Hypertension, v.23, n.3, Mar, p.294-301. 1994.
- GRAVINA, C. F., S. M. GRESPAN e J. L. BORGES. Tratamento não-medicamentoso da hipertensão no idoso. Rev Bras Hipertens, v.14, n.1, p.33-36. 2007.

- GRIFFIN, K. L., M. H. LAUGHLIN e J. L. PARKER. Exercise training improves endothelium-mediated vasorelaxation after chronic coronary occlusion. J Appl Physiol, v.87, n.5, Nov, p.1948-56. 1999.
- GROBE, A. C., S. M. WELLS, E. BENAVIDEZ, P. OISHI, A. AZAKIE, J. R. FINEMAN, *et al.* Increased oxidative stress in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension: role of NADPH oxidase and endothelial NO synthase. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.290, n.6, Jun, p.L1069-77. 2006.
- GUEDES, D. P. e L. A. GONCALVES. [Impact of the habitual physical activity on lipid profile in adults]. Arq Bras Endocrinol Metabol, v.51, n.1, Feb, p.72-8. 2007.
- GUYTON, A. C. e J. E. HALL. Textbook of Medical Physiology. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1996. 1148 p.
- GUZIK, T. J., R. OLSZANECKI, J. SADOWSKI, B. KAPELAK, P. RUDZINSKI, A. JOPEK, *et al.* Superoxide dismutase activity and expression in human venous and arterial bypass graft vessels. J Physiol Pharmacol, v.56, n.2, Jun, p.313-23. 2005.
- HAGBERG, J. M., J. J. PARK e M. D. BROWN. The role of exercise training in the treatment of hypertension: an update. Sports Med, v.30, n.3, Sep, p.193-206. 2000.
- HAMET, P., Z. PAUSOVA, V. ADARICHEV, K. ADARICHEVA e J. TREMBLAY. Hypertension: genes and environment. J Hypertens, v.16, n.4, Apr, p.397-418. 1998.
- HAMILTON, C. A., M. J. BROSNAN, S. AL-BENNA, G. BERG e A. F. DOMINICZAK. NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels. Hypertension, v.40, n.5, Nov, p.755-62. 2002.
- HEISS, C., T. LAUER, A. DEJAM, P. KLEINBONGARD, S. HAMADA, T. RASSAF, *et al.* Plasma nitroso compounds are decreased in patients with endothelial dysfunction. J Am Coll Cardiol, v.47, n.3, Feb 7, p.573-9. 2006.
- HEITZER, T., S. YLA-HERTTUALA, J. LUOMA, S. KURZ, T. MUNZEL, H. JUST, *et al.* Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia. Role of oxidized LDL. Circulation, v.93, n.7, Apr 1, p.1346-53. 1996.
- HELTIANU, C., G. COSTACHE, A. GAFENCU, M. DIACONU, M. BODEANU, C. CRISTEA, *et al.* Relationship of eNOS gene variants to diseases that have in common an endothelial cell dysfunction. J Cell Mol Med, v.9, n.1, Jan-Mar, p.135-42. 2005.
- HIGASHI, Y., S. SASAKI, N. SASAKI, K. NAKAGAWA, T. UEDA, A. YOSHIMIZU, *et al.* Daily aerobic exercise improves reactive hyperemia in patients with essential hypertension. Hypertension, v.33, n.1 Pt 2, Jan, p.591-7. 1999.
- HIGASHI, Y. e M. YOSHIZUMI. Exercise and endothelial function: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. Pharmacol Ther, v.102, n.1, Apr, p.87-96. 2004.

HOBBS, A. J., A. HIGGS e S. MONCADA. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v.39, p.191-220. 1999.

HOBBS, A. J. e S. MONCADA. Antiplatelet properties of a novel, non-NO-based soluble guanylate cyclase activator, BAY 41-2272. Vascular Pharmacology, v.40, n.3, p.149-154. 2003.

IBGE. Pesquisa sobre o padrão de vida brasileiro: [www.ibge.gov.br/imprensa/noticias/ppv11.html](http://www.ibge.gov.br/imprensa/noticias/ppv11.html). setembro 2004.

IGNARRO, L. J., R. E. BYRNS, G. M. BUGA, K. S. WOOD e G. CHAUDHURI. Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. J Pharmacol Exp Ther, v.244, n.1, Jan, p.181-9. 1988.

IRIGOYEN, M. C., F. M. CONSOLIM-COLOMBO e E. M. KRIEGER. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. Rev Bras Hipertens, v.8, n.1, p.55-62. 2001.

IRIGOYEN, M. C., KRIEGER, E.M., CONSOLIM-COLOMBO, F.M. Controle fisiológico da pressão arterial pelo sistema nervoso. Hipertensão, v.8, n.1, p.6-10. 2005.

JONES, L. C. e A. D. HINGORANI. Genetic regulation of endothelial function. Heart, v.91, n.10, Oct, p.1275-7. 2005.

JUEL, C., S. OLSEN, R. L. RENTSCH, J. GONZALEZ-ALONSO e J. B. ROSENMEIER. K<sup>+</sup> as a vasodilator in resting human muscle: implications for exercise hyperaemia. Acta Physiol (Oxf), v.190, n.4, Aug, p.311-8. 2007.

JUNG, O., S. L. MARKLUND, H. GEIGER, T. PEDRAZZINI, R. BUSSE e R. P. BRANDES. Extracellular superoxide dismutase is a major determinant of nitric oxide bioavailability: in vivo and ex vivo evidence from ecSOD-deficient mice. Circ Res, v.93, n.7, Oct 3, p.622-9. 2003.

JUNG, O., S. L. MARKLUND, N. XIA, R. BUSSE e R. P. BRANDES. Inactivation of extracellular superoxide dismutase contributes to the development of high-volume hypertension. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.27, n.3, Mar, p.470-7. 2007.

KALS, J., P. KAMPUS, M. KALS, K. ZILMER, T. KULLISAAR, R. TEESALU, *et al.* Impact of oxidative stress on arterial elasticity in patients with atherosclerosis. Am J Hypertens, v.19, n.9, Sep, p.902-8. 2006.

KELLY, R. A., J. L. BALLIGAND e T. W. SMITH. Nitric oxide and cardiac function. Circ Res, v.79, n.3, Sep, p.363-80. 1996.

KENNEY, M. J. e D. R. SEALS. Postexercise hypotension. Key features, mechanisms, and clinical significance. Hypertension, v.22, n.5, Nov, p.653-64. 1993.

- KIM, I. J., J. BAE, S. W. LIM, D. H. CHA, H. J. CHO, S. KIM, *et al.* Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (-786T>C, 4a4b, 894G>T) in Korean patients with coronary artery disease. Thromb Res, Jul 12. 2006.
- KINGWELL, B. A. Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease. Faseb J, v.14, n.12, Sep, p.1685-96. 2000.
- KINGWELL, B. A., B. SHERRARD, G. L. JENNINGS e A. M. DART. Four weeks of cycle training increases basal production of nitric oxide from the forearm. Am J Physiol, v.272, n.3 Pt 2, Mar, p.H1070-7. 1997.
- KLABUNDE, R. E., R. C. RITGER e M. C. HELGREN. Cardiovascular actions of inhibitors of endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) formation/release in anesthetized dogs. Eur J Pharmacol, v.199, n.1, Jun 18, p.51-9. 1991.
- KLEINBONGARD, P., A. DEJAM, T. LAUER, T. JAX, S. KERBER, P. GHARINI, *et al.* Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans. Free Radic Biol Med, v.40, n.2, Jan 15, p.295-302. 2006.
- KLINE, G. M., J. P. PORCARI, R. HINTERMEISTER, P. S. FREEDSON, A. WARD, R. F. MCCARRON, *et al.* Estimation of VO<sub>2</sub>max from a one-mile track walk, gender, age, and body weight. Med Sci Sports Exerc, v.19, n.3, Jun, p.253-9. 1987.
- KOJDA, G. e R. HAMBRECHT. Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? Cardiovasc Res, v.67, n.2, Aug 1, p.187-97. 2005.
- KORAMAZ, I., M. OZKAN, G. ALTUN, K. Y. GUVEN, M. KADIOGLU DUMAN, N. I. KALYONCU, *et al.* Effects of papaverine and carbon dioxide alone or in combination on the blood flow of internal thoracic artery. J Thorac Cardiovasc Surg, v.132, n.5, Nov, p.1126-30. 2006.
- KRIEGER, E. M. Neurogenic Hypertension in the Rat. Circ Res, v.15, Dec, p.511-21. 1964.
- KURU, O., U. K. SENTURK, N. DEMIR, A. YESILKAYA, G. ERGULER e M. ERKILIC. Effect of exercise on blood pressure in rats with chronic NOS inhibition. Eur J Appl Physiol, v.87, n.2, Jun, p.134-40. 2002.
- LANDMESSER, U., D. G. HARRISON e H. DREXLER. Oxidant stress-a major cause of reduced endothelial nitric oxide availability in cardiovascular disease. Eur J Clin Pharmacol, v.62 Suppl 1, Feb, p.13-9. 2006.
- LAUER, T., P. KLEINBONGARD e M. KELM. Indexes of NO bioavailability in human blood. News Physiol Sci, v.17, Dec, p.251-5. 2002.
- LEE, S., J. L. KUK, L. E. DAVIDSON, R. HUDSON, K. KILPATRICK, T. E. GRAHAM, *et al.* Exercise without weight loss is an effective strategy for obesity reduction in obese individuals with and without Type 2 diabetes. J Appl Physiol, v.99, n.3, Sep, p.1220-5. 2005.

- LEHNINGER, H. Princípios da Bioquímica. Sao Paulo: Sarvier. 2002. 975 p.
- LEVINE, B., J. KALMAN, L. MAYER, H. M. FILLIT e M. PACKER. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. N Engl J Med, v.323, n.4, Jul 26, p.236-41. 1990.
- LIBERMAN, A. Aspectos epidemiológicos e o impacto clínico da hipertensão no indivíduo idoso. Rev Bras Hipertens, v.14, n.1, p.17-20. 2007.
- LOUNSBURY, K. M., Q. HU e R. C. ZIEGELSTEIN. Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature. Free Radic Biol Med, v.28, n.9, May 1, p.1362-9. 2000.
- LUVARA, G., M. E. PUEYO, M. PHILIPPE, C. MANDET, F. SAVOIE, D. HENRION, *et al.* Chronic blockade of NO synthase activity induces a proinflammatory phenotype in the arterial wall: prevention by angiotensin II antagonism. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.18, n.9, Sep, p.1408-16. 1998.
- MACHADO, B. H., H. MAUAD e M. L. GLASS. Transient changes in blood pressure during spontaneous deep breaths in rats with sinoaortic deafferentation. J Appl Physiol, v.72, n.3, Mar, p.920-4. 1992.
- MARSHALL, J. M. The roles of adenosine and related substances in exercise hyperaemia. J Physiol, v.583, n.Pt 3, Sep 15, p.835-45. 2007.
- MCARDLE, W. D., F. I. KATCH e V. L. KATCH. Fisiologia do Exercício. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2003. 1113 p.
- METZGER, I. F., D. C. SOUZA-COSTA, A. S. MARRONI, S. NAGASSAKI, Z. DESTA, D. A. FLOCKHART, *et al.* Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes associated with circulating concentrations of nitric oxide products in healthy men. Pharmacogenet Genomics, v.15, n.8, Aug, p.565-70. 2005.
- MIYAMOTO, Y., Y. SAITO, N. KAJIYAMA, M. YOSHIMURA, Y. SHIMASAKI, M. NAKAYAMA, *et al.* Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. Hypertension, v.32, n.1, Jul, p.3-8. 1998.
- MOMBOULI, J. V. e P. M. VANHOUTTE. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. J Mol Cell Cardiol, v.31, n.1, Jan, p.61-74. 1999.
- MONCADA, S. Nitric oxide. J Hypertens Suppl, v.12, n.10, Dec, p.S35-9. 1994.
- MONCADA, S. Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. Ann N Y Acad Sci, v.811, Apr 15, p.60-7; discussion 67-9. 1997.
- MONCADA, S. e E. A. HIGGS. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. Br J Pharmacol, v.147 Suppl 1, Jan, p.S193-201. 2006.
- MONCADA, S., R. M. PALMER e E. A. HIGGS. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev, v.43, n.2, Jun, p.109-42. 1991.

- MONTEIRO, M. F. e D. C. S. FILHO. Exercício físico e o controle da pressão arterial. Revista Brasileira de Medicina do Esporte, v.10, n.6, p.513-6. 2004.
- MORENO, H., JR., K. METZE, A. C. BENTO, E. ANTUNES, R. ZATZ e G. DE NUCCI. Chronic nitric oxide inhibition as a model of hypertensive heart muscle disease. Basic Res Cardiol, v.91, n.3, May-Jun, p.248-55. 1996.
- MORO, M. A., R. J. RUSSEL, S. CELLEK, I. LIZASOAIN, Y. SU, V. M. DARLEY-USMAR, *et al.* cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.4, Feb 20, p.1480-5. 1996.
- MURAD, F., U. FORSTERMANN, M. NAKANE, J. POLLOCK, R. TRACEY, T. MATSUMOTO, *et al.* The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system for intracellular and intercellular communication. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res, v.28, p.101-9. 1993.
- MURAD, F., U. FORSTERMANN, M. NAKANE, H. SCHMIDT, J. POLLOCK, H. SHENG, *et al.* The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction pathway in vascular smooth muscle preparations and other tissues. Jpn J Pharmacol, v.58 Suppl 2, p.150P-157P. 1992.
- NAGASSAKI, S., I. F. METZGER, D. C. SOUZA-COSTA, A. S. MARRONI, J. A. UZUELLI e J. E. TANUS-SANTOS. eNOS genotype is without effect on circulating nitrite/nitrate level in healthy male population. Thromb Res, v.115, n.5, p.375-9. 2005.
- NAKAYAMA, M., H. YASUE, M. YOSHIMURA, Y. SHIMASAKI, K. KUGIYAMA, H. OGAWA, *et al.* 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, Jun 8, p.2864-70. 1999.
- NAPOLI, C., F. DE NIGRIS, S. WILLIAMS-IGNARRO, O. PIGNALOSA, V. SICA e L. J. IGNARRO. Nitric oxide and atherosclerosis: an update. Nitric Oxide, v.15, n.4, Dec, p.265-79. 2006.
- NEGRAO, C. E., M. C. IRIGOYEN, E. D. MOREIRA, P. C. BRUM, P. M. FREIRE e E. M. KRIEGER. Effect of exercise training on RSNA, baroreflex control, and blood pressure responsiveness. Am J Physiol, v.265, n.2 Pt 2, Aug, p.R365-70. 1993.
- NUNES, A. P., A. C. RIOS, G. A. CUNHA, A. C. BARRETTO e C. E. NEGRAO. [The effects of nonsupervised exercise program, via internet, on blood pressure and body composition in normotensive and prehypertensive individuals]. Arq Bras Cardiol, v.86, n.4, Apr, p.289-96. 2006.
- OHARA, Y., T. E. PETERSON e D. G. HARRISON. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. J Clin Invest, v.91, n.6, Jun, p.2546-51. 1993.
- OHTA, M., H. NANRI, Y. MATSUSHIMA, Y. SATO e M. IKEDA. Blood pressure-lowering effects of lifestyle modification: possible involvement of nitric oxide bioavailability. Hypertens Res, v.28, n.10, Oct, p.779-86. 2005.

- PALMER, R. M. J., D. S. ASHTON e S. MONCADA. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature, v.333, n.6174, p.664-666. 1988.
- PALMER, R. M. J., A. G. FERRIGE e S. MONCADA. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature, v.327, n.6122, p.524-526. 1987.
- PARK, J. Y., FERRELL, R. E., PARK, J. J., HAGBERG, J. M., PHARES, D. A., JONES, J. M., BROWN, M. D. NADPH oxidase p22phox gene variants are associated with systemic oxidative stress biomarker responses to exercise training. J Appl Physiol, v.99, n.5, Nov, p.1905-11. 2005.
- PARTHASARATHY, S., D. STEINBERG e J. L. WITZTUM. The role of oxidized low-density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. Annu Rev Med, v.43, p.219-25. 1992.
- PEREIRA, A. C., A. C. SPOSITO, G. F. MOTA, R. S. CUNHA, F. L. HERKENHOFF, J. G. MILL, *et al.* Endothelial nitric oxide synthase gene variant modulates the relationship between serum cholesterol levels and blood pressure in the general population: new evidence for a direct effect of lipids in arterial blood pressure. Atherosclerosis, v.184, n.1, Jan, p.193-200. 2006.
- PERROTTI, T. C., J. C. FILHO, C. A. UEHARA, C. M. A. FILHO e R. D. MIRANDA. Tratamento farmacológico da hipertensão no idoso. Rev Bras Hipertens, v.14, n.1, p.37-41. 2007.
- PESCATELLO, L. S., B. A. FRANKLIN, R. FAGARD, W. B. FARQUHAR, G. A. KELLEY e C. A. RAY. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension. Med Sci Sports Exerc, v.36, n.3, Mar, p.533-53. 2004.
- RIADO, S. R., A. ZANESCO, L. A. BARKER, I. M. DE LUCA, E. ANTUNES e G. DE NUCCI. Long-term nitric oxide inhibition and chronotropic responses in rat isolated right atria. Hypertension, v.34, n.4 Pt 2, Oct, p.802-7. 1999.
- RIBEIRO, M. O., E. ANTUNES, G. NUCCI, S. M. LOVIZOLO e R. ZATZ. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. Hypertension, v.20, n.3, p.298-303. 1992.
- RICHARD, V., A. BERDEAUX, C. D. LA ROCHELLE e J. F. GIUDICELLI. Regional coronary haemodynamic effects of two inhibitors of nitric oxide synthesis in anaesthetized, open-chest dogs. Br J Pharmacol, v.104, n.1, Sep, p.59-64. 1991.
- ROBERTS, C. K., R. J. BARNARD, A. JASMAN e T. W. BALON. Acute exercise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle. Am J Physiol, v.277, n.2 Pt 1, Aug, p.E390-4. 1999.
- RODRIGUES, C. I. S., R. D'AVILA, E. M. M. GUERRA, R. A. M. CADAVAL e F. A. ALMEIDA. Hipertensão resistente em paciente com rim hipotrófico. Hipertensão, v.10, n.1, p.11-15. 2007.

- ROSENSON, R. S. Statins in atherosclerosis: lipid-lowering agents with antioxidant capabilities. Atherosclerosis, v.173, n.1, Mar, p.1-12. 2004.
- ROSSELLI, M., B. IMTHURN, P. J. KELLER, E. K. JACKSON e R. K. DUBEY. Circulating Nitric Oxide (Nitrite/Nitrate) Levels in Postmenopausal Women Substituted With 17 $\beta$ -Estradiol and Norethisterone Acetate - A Two-Year Follow-up Study. Hypertension, v.25, p.848-853. 1995.
- ROSSI, G. P., S. TADDEI, A. VIRDIS, M. CAVALLIN, L. GHIADONI, S. FAVILLA, *et al.* The T-786C and Glu298Asp polymorphisms of the endothelial nitric oxide gene affect the forearm blood flow responses of Caucasian hypertensive patients. J Am Coll Cardiol, v.41, n.6, Mar 19, p.938-45. 2003.
- RUSH, J. W., S. G. DENNISS e D. A. GRAHAM. Vascular nitric oxide and oxidative stress: determinants of endothelial adaptations to cardiovascular disease and to physical activity. Can J Appl Physiol, v.30, n.4, Aug, p.442-74. 2005.
- RUTHERFORD, P. A. Genetic influences in human hypertension. Journal of Hypertension, v.21, n.1, JAN, p.19-22. 2003.
- SAKURAI, K. e T. SAWAMURA. Stress and vascular responses: endothelial dysfunction via lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1: close relationships with oxidative stress. J Pharmacol Sci, v.91, n.3, Mar, p.182-6. 2003.
- SANDRIM, V. C. Influence of T-786C polymorphism on the promoter activity of eNOS. Clin Chim Acta, v.367, n.1-2, May, p.208. 2006.
- SANDRIM, V. C., E. B. COELHO, F. NOBRE, G. M. ARADO, V. L. LANCHOTE e J. E. TANUS-SANTOS. Susceptible and protective eNOS haplotypes in hypertensive black and white subjects. Atherosclerosis, v.186, n.2, Jun, p.428-32. 2006.
- SBC, S. B. D. C. Biblioteca Virtual - Cartilha do Coração: <http://prevencao.cardiol.br/cartilha/>. junho / 2007.
- SBEM. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia: <http://www.endocrino.org.br>. 04/2006 2006.
- SBH, S. B. D. H.-. I Diretriz Brasileira de Diagnostico e Tratamento da Síndrome Metabólica. Hipertensão, v.7, n.4, p.130-159. 2004.
- SBH, S. B. D. H.-. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. Hipertensão, v.9, n.4, p.121-156. 2006.
- SCHULZ, R. e C. R. TRIGGLE. Role of NO in vascular smooth muscle and cardiac muscle function. Trends Pharmacol Sci, v.15, n.7, Jul, p.255-9. 1994.
- SCOTT-BURDEN, T. e P. M. VANHOUTTE. The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. Circulation, v.87, n.5, p.51-5, suppl 5. 1993.

- SESSA, W. C., K. PRITCHARD, N. SEYEDI, J. WANG e T. H. HINTZE. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. Circ Res, v.74, n.2, Feb, p.349-53. 1994.
- SHEN, W., M. LUNDBORG, J. WANG, J. M. STEWART, X. XU, M. OCHOA, *et al.* Role of EDRF in the regulation of regional blood flow and vascular resistance at rest and during exercise in conscious dogs. J Appl Physiol, v.77, n.1, Jul, p.165-72. 1994.
- SHOJI, M., S. TSUTAYA, R. SAITO, H. TAKAMATU e M. YASUJIMA. Positive association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with hypertension in northern Japan. Life Sci, v.66, n.26, May 19, p.2557-62. 2000.
- SIASOS, G., D. TOUSOULIS, C. ANTONIADES, E. STEFANADI e C. STEFANADIS. L-Arginine, the substrate for NO synthesis: An alternative treatment for premature atherosclerosis? Int J Cardiol, Jul 20. 2006.
- STRANSKA, Z., M. MATOULEK, P. FABIN, Z. VILIKUS e S. SVACINA. [Regular aerobic physical activity improves the lipid profile in persons with excessive body weight]. Vnitr Lek, v.53, n.4, Apr, p.404-7. 2007.
- TANGUREK, B., N. OZER, N. SAYAR, S. TERZI, H. YILMAZ, S. U. DAYI, *et al.* The relationship between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (T-786 C) and coronary artery disease in the Turkish population. Heart Vessels, v.21, n.5, Sep, p.285-90. 2006.
- TANUS-SANTOS, J. E., M. DESAI e D. A. FLOCKHART. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. Pharmacogenetics, v.11, n.8, Nov, p.719-25. 2001.
- TAVERNA, M. J., F. ELGRABLY, H. SELMI, J. L. SELAM e G. SLAMA. The T-786C and C774T endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms independently affect the onset pattern of severe diabetic retinopathy. Nitric Oxide, v.13, n.1, Aug, p.88-92. 2005.
- TIBIRICA, E. Fisiopatologia em Medicina Cardiovascular. Rio de Janeiro: Revinter. 2001
- TIPTON, C. M., R. D. MATTHES e T. G. BEDFORD. Influence of training on the blood pressure changes during lower body negative pressure in rats. Med Sci Sports Exerc, v.14, n.1, p.81-90. 1982.
- TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? Hypertension, v.44, n.3, Sep, p.248-52. 2004.
- TOUYZ, R. M. e E. L. SCHIFFRIN. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. Histochem Cell Biol, v.122, n.4, Oct, p.339-52. 2004.
- ULLRICH, V. e M. BACHSCHMID. Superoxide as a messenger of endothelial function. Biochem Biophys Res Commun, v.278, n.1, Nov 11, p.1-8. 2000.

- VANECKOVA, I., H. J. KRAMER, J. NOVOTNA, L. KAZDOVA, M. OPOCENSKY, M. BADER, *et al.* Roles of nitric oxide and oxidative stress in the regulation of blood pressure and renal function in prehypertensive Ren-2 transgenic rats. Kidney Blood Press Res, v.28, n.2, p.117-26. 2005.
- VANHOUTTE, P. M. Endothelial control of vasomotor function: from health to coronary disease. Circ J, v.67, n.7, Jul, p.572-5. 2003.
- VIARO, F., F. NOBRE e P. R. EVORA. Expression of nitric oxide synthases in the pathophysiology of cardiovascular diseases. Arq Bras Cardiol, v.74, n.4, Apr, p.380-93. 2000.
- WANG, W., S. WANG, L. YAN, P. MADARA, A. DEL PILAR CINTRON, R. A. WESLEY, *et al.* Superoxide production and reactive oxygen species signaling by endothelial nitric-oxide synthase. J Biol Chem, v.275, n.22, Jun 2, p.16899-903. 2000.
- WANG, X. L. e J. WANG. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. Mol Genet Metab, v.70, n.4, Aug, p.241-51. 2000.
- WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. Adv Physiol Educ, v.27, n.1-4, Dec, p.201-6. 2003.
- WEISS, E. P., J. J. PARK, J. A. MCKENZIE, J. Y. PARK, O. KULAPUTANA, M. D. BROWN, *et al.* Plasma nitrate/nitrite response to an oral glucose load and the effect of endurance training. Metabolism, v.53, n.5, May, p.673-9. 2004.
- WHO, W. H. O.-. The Atlas of Heart Disease and Stroke. 05/2006 2004.
- YANAGISAWA, M., H. KURIHARA, S. KIMURA, K. GOTO e T. MASAKI. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca<sup>2+</sup> channels. J Hypertens Suppl, v.6, n.4, Dec, p.S188-91. 1988.
- YETIK-ANACAK, G. e J. D. CATRAVAS. Nitric oxide and the endothelium: History and impact on cardiovascular disease. Vascul Pharmacol, v.45, n.5, Nov, p.268-76. 2006.
- YOSHIMURA, M., M. NAKAYAMA, Y. SHIMASAKI, H. OGAWA, K. KUGIYAMA, S. NAKAMURA, *et al.* A T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene and coronary arterial vasomotility. Am J Cardiol, v.85, n.6, Mar 15, p.710-4. 2000.
- ZAGO, A. S. e A. ZANESCO. Nitric oxide, cardiovascular disease and physical exercise. Arq Bras Cardiol, v.87, n.6, Dec, p.e264-70. 2006.
- ZALBA, G., G. SAN JOSE, M. U. MORENO, A. FORTUNO e J. DIEZ. NADPH oxidase-mediated oxidative stress: genetic studies of the p22(phox) gene in hypertension. Antioxid Redox Signal, v.7, n.9-10, Sep-Oct, p.1327-36. 2005.

ZANESCO, A. e E. ANTUNES. Celulas endoteliais. In: H. F. Carvalho e C. B. C. Buzato (Ed.). Celula: Uma abordagem multidisciplinas. Barueri: Manole, 2005. Celulas endoteliais, p.450

ZATZ, R. e C. BAYLIS. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. Hypertension, v.32, n.6, Dec, p.958-64. 1998.

# **A**NEXO I

*Termo de Consentimento Livre e Esclarecido*

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Projeto:** Avaliação gênica da sintase do óxido nítrico endotelial (enos) em adultos de meia idade e idosos hipertensos submetidos ao treinamento físico: efeito na pressão arterial

**Objetivo:** Identificar e verificar se as variações polimórficas comuns no gene da eNOS estariam relacionadas ao quadro hipertensivo em indivíduos adultos de meia idade e idosos e, se o exercício físico aeróbico teria efeito benéfico sobre a pressão arterial destes voluntários, relacionando tais efeitos com o polimorfismo do gene da eNOS.

**Procedimentos e avaliações:** As análises que serão realizadas são: entrevista com o responsável do projeto, avaliações médicas (eletrocardiograma de repouso e de esforço) e composição corporal, mensuração de pressão arterial e coletas de sangue (10ml) para análise genética da eNOS e níveis basais de Óxido Nítrico. Alguns participantes serão submetidos também a um programa de atividades físicas supervisionadas no período de 6 meses (3 sessões por semana / 60 minutos de duração cada sessão).

**Riscos:** Todos os riscos serão minimizados pois todo os materiais utilizados para as coletas sanguíneas serão descartáveis e profissionais especializados serão convidados para a realização dos ECGs (médicos) e coletas sanguíneas (enfermeiras). Durante as sessões se atividade física, a intensidade do exercício será controlada por um profissional de Educação Física.

**Benefícios:** Aos participantes do programa de atividade física há uma perspectiva de melhora no quadro funcional geral, devido ao próprio efeito da atividade física além de melhorarem seu quadro hipertensivo. Aos demais participantes, o benefício está no conhecimentos dos resultados das avaliações, mas que sua participação é extremamente importante para fins acadêmicos.

**Confidencialidade:** Todas as informações obtidas no estudo serão confidenciais e, o nome do participante não será divulgado em momento algum. Apenas terão acesso a esses dados o pesquisador responsável e o próprio participante. Ainda, toda e qualquer informação será utilizada para fins acadêmicos exclusivos deste projeto.

**Liberdade para interromper a participação:** Eu entendo que a qualquer momento posso pedir para interromper a minha participação na realização do experimento. Eu também entendo que, se assim desejar, o responsável pelo estudo irá fornecer os resultados dessa participação em oportunidade posterior.

**Esclarecimento:** Declaro que todas as informações foram esclarecidas por este termo ou em conversa com o responsável e que estou ciente de todos os procedimentos que serão realizados. Assim, concordo em participar do estudo em questão.

**Nome:** \_\_\_\_\_ **Assinatura:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_\_\_

PROFª Dra. ANGELINA ZANESCO – ORIENTADORA DO ESTUDO  
**Laboratório de Atividade Física e Saúde**  
 Depto de Educação Física – IB – UNESP/RC - Av. 24-A, 1515, Bela Vista / Rio Claro, SP  
 e-mail: [aszago@yahoo.com.br](mailto:aszago@yahoo.com.br) Fone: 3526-4308 / 9758-1059

\_\_\_\_\_  
**Anderson Saranz Zago**  
 Responsável pelo Estudo

\_\_\_\_\_  
**Clarice Yoshiko Sibuya**  
 Responsável Técnico

# **A**NEXO 2

*Aprovação do Comitê de Ética*



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Câmpus de Rio Claro  
Seção Técnica Acadêmica  
Comitê de Ética em Pesquisa



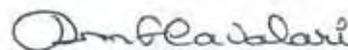
Rio Claro, 07 de abril de 2005.

Ofício CEP 057/2005

Prezado Senhor,

Informo que em reunião realizada em **05.04.2005**, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Rio Claro (CEP-IB-UNESP), aprovou o projeto de pesquisa intitulado *Avaliação gênica da sintaxe do óxido nítrico endotelial (enos) em adultos de meia idade e idosos hipertensos submetidos ao treinamento físico: efeito na pressão arterial, sob sua responsabilidade, protocolo 3925, datado de 10/08/2004* e, tendo como orientadora a Profa. Dra. Angelina Zanesco.

Atenciosamente,



Profa. Dra. **Rosa Maria Feiteiro Cavalari**  
Coordenadora do Comitê

Ilmo. Sr.  
**ANDERSON SARANZ ZAGO**  
Av. P-13, Particular 273 B. Vila Paulista  
13506-825 Rio Claro SP

# **A**NEXO 3

*Descrição Metodológica - PCR*

## **PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ANÁLISE DE PCR**

O diagnóstico genético dos participantes foi realizado através da seguinte padronização das reações:

*a) Preparação da reação para o PCR (MIX do PCR):* 1 microlitros ( $\mu\text{l}$ ) de DNA, a uma concentração de  $300\text{ng}/\mu\text{l}$ , foi adicionado a um MIX composto de  $38,8\mu\text{l}$  de água deionizada /  $5\mu\text{l}$  tampão (buffer 10x) /  $2\mu\text{l}$  Cloreto de magnésio (50 mM) /  $1\mu\text{l}$  de dNTP (10mM) /  $1\mu\text{l}$  de Primer NOS-R ( $10\text{pm}/\mu\text{l}$ ) /  $1\mu\text{l}$  de Primer NOS-F ( $10\text{pm}/\mu\text{l}$ ) /  $0,2\mu\text{l}$  de Taq DNA. O volume final desta reação é de  $50\mu\text{l}$  ( $1\mu\text{l}$  de DNA +  $49\mu\text{l}$  do MIX do PCR);

*b) Reação de PCR:* Cada amostra ( $1\mu\text{l}$  de DNA +  $49\mu\text{l}$  de MIX) é submetida, na máquina de PCR, a uma desnaturação por 2 minutos a  $96^{\circ}\text{C}$ , seguido de 35 ciclos de desnaturação (30s,  $96^{\circ}\text{C}$ ), anelamento (30s,  $65^{\circ}\text{C}$ ), extensão (60s,  $72^{\circ}\text{C}$ ) e após os 35 ciclos um período de estabilização por 5 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ ;

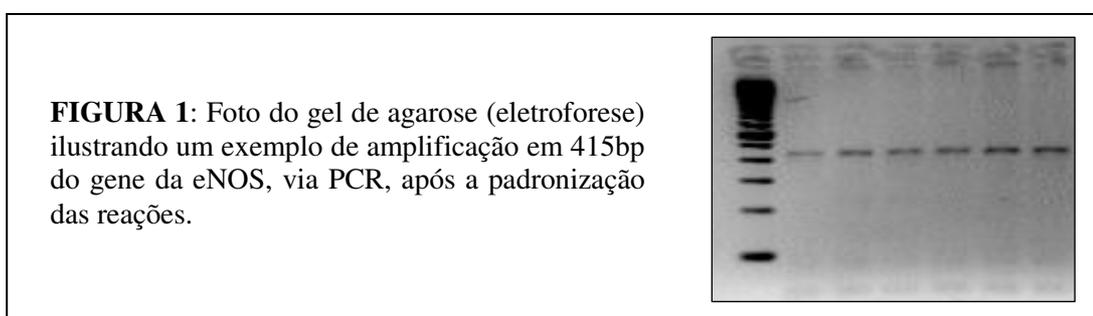
*c) Digestão do produto de PCR:* Após a amplificação da amostra de DNA através da técnica de PCR,  $10\mu\text{l}$  do produto de PCR é adicionado a um novo MIX de digestão, composto por  $3,35\mu\text{l}$  de água deionizada /  $1,5\mu\text{l}$  tampão da enzima MSPI /  $0,15\mu\text{l}$  da enzima MSPI. O volume total desta reação é de  $15\mu\text{l}$  ( $10\mu\text{l}$  do MIX do PCR +  $5\mu\text{l}$  do MIX de digestão). Esta reação deve ficar a uma temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  por pelo menos 12 horas;

*d) Eletroforese:* Para o diagnóstico genético dos participantes, cada amostra, após a digestão, foi submetida a técnica de eletroforese com um gel de agarose a uma concentração de 2 %.

Para se chegar a estes valores de concentrações e conseqüentemente a uma otimização do diagnóstico do polimorfismo do gene da eNOS via análise de PCR, vários testes foram necessários a fim de se buscar esta padronização ideal para as reações utilizadas.

O primeiro passo para se chegar a esta padronização foi manter todas as amostras de DNA a uma concentração de aproximadamente 300ng/ $\mu$ l, realizado no HEMOCENTRO / UNICAMP através do aparelho NanoDrop. Após esta padronização os procedimentos “a” e “b” (descritos anteriormente) foram realizados.

Antes de prosseguir para a etapa “c”, as amostras eram testadas para se verificar se ocorreu a amplificação do DNA, via PCR (etapas a e b). Este teste foi feito através da técnica de eletroforese em um gel a 2% de agarose. Nesta etapa, todas as amostras deveriam amplificar apenas uma banda de 415bp (Figura 1).



Caso esta amplificação não ocorra (nenhuma banda aparecer) ou ocorra a formação de bandas inespecíficas, significa que alguma alteração no procedimento “a” e/ou no “b” devem ser feitas. Assim vários testes foram realizados antes de se chegar às concentrações citadas anteriormente. Na etapa “a” os testes foram realizados alterando as concentrações de água deionizada (38,6; 38,8; 39 $\mu$ l), primer NOS-R e NOS-F (0,8; 1; 1,2 $\mu$ l), enzima Taq DNA (0,1; 0,2; 0,3 $\mu$ l) e do volume final de 50 $\mu$ l da reação de PCR com as variações de volume de DNA (0,8; 1; 1,2 e 1,4 $\mu$ l) e de MIX (49,2; 49; 48,8; 48,6 $\mu$ l). Todos

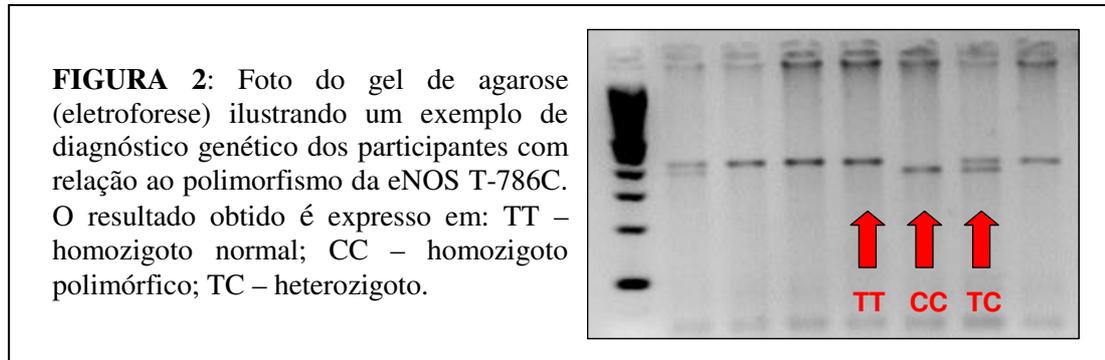
esses testes foram realizados concomitantes aos testes da etapa “b” especificamente para a temperatura de anelamento que variou de 50 a 68°C.

Assim, um MIX de PCR, com uma determinada concentração, foi testado com várias temperaturas de anelamento e vice-versa, uma determinada temperatura de anelamento foi testada com várias concentrações de MIX de PCR. Após todos esses testes serem realizados, a padronização que melhor amplificou a banda no gel de agarose (figura 1) foi a descrita nos procedimentos “a” e “b”.

Após as reações de PCR estarem padronizadas e o produto de PCR estar amplificado (Figura 1), a digestão do produto de PCR deveria ser realizada. Assim, novos testes foram necessários para a digestão deste produto para que se obtenha o diagnóstico do gene da eNOS. Esses testes foram realizados alterando-se as concentrações de água deionizada (3,2; 3,35µl), da enzima MSPi (0,3; 0,15µl) e do volume final de 15µl alterando as concentrações de MIX de digestão (3 a 5µl) e do produto de PCR (10 a 12µl). A melhor concentração foi a descrita no procedimento “c”.

Após a padronização desta etapa de digestão e do produto de PCR estar amplificado e digerido, as amostras foram novamente submetidas um gel de agarose a 2%. Com este procedimento foi possível o diagnóstico genético para o polimorfismo do gene da eNOS, pois o procedimento de digestão tem por objetivo separar as bandas, discriminando os indivíduos homocigotos e heterocigotos.

A figura 2 apresenta uma fotografia de um procedimento de diagnóstico genético realizado com gel de agarose, que exemplifica o diagnóstico de alguns participantes, indicando a presença ou não do polimorfismo do gene da eNOS (T-786C) de acordo com a presença ou não do alelo C.



Assim, de acordo com a figura 4, pode-se observar (indicado pelas setas) que por meio da técnica de PCR é possível diagnosticar os participantes como normal (TT) e como portador do polimorfismo da a eNOS T-786C em virtude da presença do alelo C (TC e CC).

# **A**NEXO 4

*Valores normativos das variáveis de Composição Corporal e do  
Perfil Lipídico e Glicêmico*

**VALORES NORMATIVOS DO PERFIL LIPÍDICO E GLICÊMICO***Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC, 2006)*

	<b>DESEJÁVEIS</b>	<b>LIMÍTROFES</b>	<b>AUMENTADOS</b>
<b>Colesterol total</b>	Abaixo de 200	200 - 239	Acima de 240
<b>LDL colesterol</b>	Abaixo de 130	130 - 159	Acima de 160
<b>HDL colesterol</b>	Acima de 40	-	-
<b>Triglicérides</b>	Abaixo de 200	-	Acima de 200
<b>Glicose</b>	Abaixo 110	-	-

*Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM, 2006) e Sociedade Brasileira de Hipertensão (SBH, 2004).*

	<b>DESEJÁVEIS</b>
<b>Colesterol total</b>	Abaixo de 200
<b>LDL colesterol</b>	Abaixo de 130
<b>HDL colesterol</b>	Acima de 40 (homens) e 45 (mulheres)
<b>Triglicérides</b>	Abaixo de 150
<b>Glicose</b>	Abaixo 110

**VALORES NORMATIVOS PARA A PRESSÃO ARTERIAL***Sociedade Brasileira de Hipertensão (SBH, 2006)*

<b>CLASSIFICAÇÃO</b>	<b>Pressão Arterial Sistólica (mmHg)</b>	<b>Pressão Arterial Diastólica (mmHg)</b>
<b>Ótima</b>	< 120	< 80
<b>Normal</b>	< 130	< 85
<b>Limítrofe</b>	130 – 139	85 – 89
<b>Hipertensão estágio 1</b>	140 – 159	90 – 99
<b>Hipertensão estágio 2</b>	160 – 179	100 – 109
<b>Hipertensão estágio 3</b>	≥ 180	> 110
<b>Hipertensão Sistólica Isolada</b>	≥ 140	< 90

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

**VALORES NORMATIVOS PARA A COMPOSIÇÃO CORPORAL – Índice de Massa Corporal***Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBH, 2006)*

<b>CLASSIFICAÇÃO</b>	<b>Índice de Massa Corporal</b>
<b>Normal</b>	Menor do que 25
<b>Pesado</b>	25 a 30
<b>Obesidade</b>	30 a 40
<b>Obesidade Mórbida</b>	Maior do que 40

*Organização Mundial de Saúde*

<b>CLASSIFICAÇÃO</b>	<b>Índice de Massa Corporal</b>
<b>Baixo</b>	< 18,5
<b>Aceitável ou Ideal</b>	18,5 a 24,9
<b>Obesidade Leve ou Acima da Média</b>	25,0 a 29,9
<b>Obesidade Moderada</b>	30,0 a 39,9
<b>Obesidade Severa</b>	≥ 40,0

---

**VALORES NORMATIVOS PARA A COMPOSIÇÃO CORPORAL – Porcentagem de Gordura Corporal***Organização Mundial de Saúde*

<b>OBESIDADE</b>	<b>Mulheres</b>	<b>Homens</b>
<b>Leve</b>	25 – 30 %	15 – 20 %
<b>Moderada</b>	30 – 35 %	20 – 25 %
<b>Elevada</b>	35 – 40 %	25 – 30 %
<b>Mórbida</b>	> 40 %	> 30 %

---

# **A**NEXO 5

*Tabelas com os resultados dos Capítulos 3 e 4*

## CAPÍTULO 3

**TABELA 3.3:** Valores antropométricos e pressão arterial de 142 voluntários subdivididos conforme o nível de pressão arterial e genotipagem da eNOS.

	G1 (n=19)	G2 (n=27)	G3 (n=38)	G4 (n=58)
	TT/NT	TT /HT	TC+CC /NT	TC+ CC/HT
Idade (anos)	61,6 ± 9	61,0 ± 8	59,0 ± 7	62,2 ± 7
IMC (peso/estatura <sup>2</sup> )	25,9 ± 3	28,0 ± 5	25,9 ± 4	29,1 ± 5*
GC (%)	30,8 ± 6	33,9 ± 6	31,2 ± 5	33,0 ± 7
PAS (mmHg)	122,8 ± 8	142,9 ± 6*	123,1 ± 8	141,4 ± 7*
PAD (mmHg)	80,7 ± 3	90,5 ± 5	79,0 ± 4	91,4 ± 6

Os dados representam as médias ± desvio padrão da média. \*Diferença estatística com relação aos grupos normotensos ( $p < 0,05$ ). IMC – Índice de massa corporal; GC – Gordura corporal; PAS – Pressão arterial sistólica; PAD – Pressão arterial diastólica; TT/NT – não polimórfico e normotenso; TT/HT – não polimórfico e hipertenso; TC+CC/NT – polimórfico e normotenso; TC+CC/HT – polimórfico e hipertenso.

**TABELA 3.4:** Perfil lipídico e glicêmico de 142 voluntários subdivididos em grupos conforme o nível de pressão arterial e genotipagem da eNOS.

	G1 (n=19)	G2 (n=27)	G3 (n=38)	G4 (n=58)
	TT / NT	TT / HT	TC + CC / NT	TC + CC / HT
CT (mg/dL)	216,7 ± 46	197,97 ± 49	216,94 ± 49	212,03 ± 43
LDL (mg/dL)	155,56 ± 43	129,74 ± 45*	154,65 ± 45	147,60 ± 42
HDL (mg/dL)	47,72 ± 10	46,53 ± 12	48,43 ± 14	46,24 ± 12
TG (mg/dL)	151,45 ± 61	150,19 ± 87	139,92 ± 66	152,29 ± 70
GL (mg/dL)	91,95 ± 16	94,59 ± 21	100,07 ± 28	102,93 ± 22

Os dados representam as médias ± desvio padrão da média. \*Diferença estatística com relação aos grupos G1, G3 e G4. CT – colesterol total; LDL – LDL colesterol; HDL – HDL colesterol; TG – triglicérides; GL – glicose; TT/NT – não polimórfico e normotenso; TT/HT – não polimórfico e hipertenso; TC+CC/NT – polimórfico e normotenso; TC+CC/HT – polimórfico e hipertenso.

## CAPÍTULO 4

**TABELA 4.1:** Valores antropométricos e de pressão arterial de 30 voluntários subdivididos em grupos conforme o nível de pressão arterial e genotipagem da eNOS nos momentos pré e pós programa de exercício físico.

	G1 (n=3)		G2 (n=4)		G3 (n=12)		G4 (n=11)	
	TT/NT		TT/HT		TC+CC/NT		TC+CC/HT	
	pré	pos	Pré	pos	pré	pos	pré	pos
IMC (peso/est <sup>2</sup> )	32,2 ± 1	32,0 ± 2	26,9 ± 5	26,4 ± 5	26,4 ± 4	25,7 ± 3	29,3 ± 4	29,3 ± 4
GC (%)	35,9 ± 2	41,2 ± 2	29,2 ± 6	29,5 ± 6	30,7 ± 4	32,7 ± 4	32,8 ± 6	35,0 ± 6
PAS (mmHg)	130,0 ± 7	120,0 ± 1	140,0 ± 1*	131,2 ± 9	122,9 ± 6	116,6 ± 8	140,9 ± 5*	126 ± 9
PAD (mmHg)	85,0 ± 1	82,5 ± 3	86,2 ± 4	75,0 ± 9	80,0 ± 4	75,4 ± 7	87,2 ± 5*	80,5 ± 8

Os dados representam as médias ± desvio padrão da média nos momentos pré-treinamento e pós-Treinamento.

\*Diferenças estatísticas com relação aos grupos normotensos G1 e G3 (p<0,05). IMC – Índice de massa corporal; GC – Gordura corporal; PAS – Pressão arterial sistólica; PAD – Pressão arterial diastólica; TT/NT – não polimórfico e normotenso; TT/HT – não polimórfico e hipertenso; TC+CC/NT – polimórfico e normotenso; TC+CC/HT – polimórfico e hipertenso.

**TABELA 4.2:** Valores de glicemia e perfil lipídico de 30 voluntários subdivididos em grupos conforme o nível de pressão arterial e genotipagem da eNOS nos momentos pré e pós programa de exercício físico.

	G1 (n=3)		G2 (n=4)		G3 (n=12)		G4 (n=11)	
	TT/NT		TT/HT		TC+CC/NT		TC+CC/HT	
	Pré	pos	pré	pos	pré	pos	pré	pos
CT (mg/dL)	193,20 ± 66	206,50 ± 9	210,29 ± 31	169,49 ± 36	217,48 ± 58	163,31 ± 55	203,51 ± 41	180,33 ± 34
LDL-c (mg/dL)	139,78 ± 80	140,76 ± 3	136,35 ± 25	131,64 ± 19	151,87 ± 57	100,08 ± 40	147,30 ± 28	127,55 ± 27
HDL-c (mg/dL)	42,9 ± 2	36,3 ± 3	43,4 ± 3	43,0 ± 6	54,6 ± 18	44,1 ± 9	49,5 ± 15	42,1 ± 10
TG (mg/dL)	164,08 ± 4	195,71 ± 11	214,72 ± 81	152,70 ± 26	160,74 ± 83	164,14 ± 93	129,20 ± 66	107,43 ± 39
GL (mg/dL)	75,12 ± 6*	99,30 ± 16	129,06 ± 14	125,23 ± 36	107,56 ± 21	106,59 ± 16	98,16 ± 17	110,74 ± 31
NO (µM)	47,56 ± 35	44,58 ± 8	21,13 ± 8*	35,02 ± 16	42,93 ± 15	42,24 ± 18	36,37 ± 27	32,78 ± 16

Os dados representam as médias ± desvio padrão da média. \*Diferença estatística com relação aos demais grupos no momento pré-treinamento (p,0,05). CT – colesterol total; LDL – LDL colesterol; HDL – HDL colesterol; TG – triglicérides; GL – glicose; NO – óxido nítrico; TT/NT – não polimórfico e normotenso; TT/HT – não polimórfico e hipertenso; TC+CC/NT – polimórfico e normotenso; TC+CC/HT – polimórfico e hipertenso.

# Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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