

**AVANÇOS EM GENÔMICA PARA O DIAGNÓSTICO E TERAPÊUTICA DE  
LESÕES PARA O ESPORTE: MECANISMOS MOLECULARES DA VARIANTE  
G894T DO GENE ÓXIDO NÍTRICO SINTASE ENDOTELIAL (eNOS) E  
TRANSCRIPTOMA DO ESPORTE.**

***Autor***

*Rodrigo Gonçalves Dias*

***Orientador***

*Carlos Eduardo Negrão*

***Instituição de Vínculo***

*Universidade de São Paulo (USP)*

***Instituição de Desenvolvimento da Pesquisa***

*Instituto do Coração - InCor (HCFMUSP)*

*Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular*

*Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício*

*Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar n° 44*

*CEP. 05403-900 – Cerqueira César – São Paulo/SP*

*Tel – 55 (11)2661 5329/5579*

*e-mail – [diasrg99@yahoo.com.br](mailto:diasrg99@yahoo.com.br)*

## INTRODUÇÃO

### **Genoma, Músculo Esquelético e Óxido Nítrico.**

Estudos em genômica funcional vêm sendo aplicados ao esporte de alto rendimento, uma vez que a compreensão da relação existente entre genoma, transcriptoma e proteoma viria revolucionar o tratamento do sistema músculo esquelético (ME), por oferecer maior precisão no diagnóstico e na conduta terapêutica. No momento da elaboração do racional desta nossa investigação, os poucos estudos com fenótipos ME, demonstravam que a susceptibilidade a lesões e a responsividade à terapêutica adotada, podem variar expressivamente entre indivíduos, como consequência de variantes genéticas específicas (Radak et al., 2012). No entanto, estes estudos de associação em genética são comumente questionados, uma vez que: 1) uma variante genética pode não ser a causa direta do fenótipo avaliado; 2) o mecanismo molecular pelo qual o fenótipo foi alterado não é demonstrado e; 3) Um único gene pode ter de pequena a moderada influência em um fenótipo poligênico. Conscientes desta dificuldade, porém incentivados pela possibilidade de expressiva contribuição num contexto pouco explorado, identificamos na literatura uma molécula com influência no reparo do ME. Encontrase bem documentada a função do óxido nítrico (NO) na regulação da força bem como na ativação das células satélites e, conseqüentemente, na recuperação de lesões do ME (Radak et al., 2012). Em repouso há biodisponibilidade de NO no ME, o que aumenta durante o exercício físico como consequência parcial do shear stress (Joyner & Dietz, 1997). Foi verificado ainda, NO 30% aumentado após lesão causada por consecutivas contrações excêntricas (Radak et al., 1999). Em adição, o NO parece mediar a sensação de dor no ME após lesão (Radak et al., 2012). Hipoteticamente, se as diferenças de susceptibilidade a lesões e posterior reparo do ME em atletas poderia sofrer influência de variações na biodisponibilidade do NO, este fato era desconhecido até a obtenção dos nossos resultados. Identificamos em 8% de uma população voluntária genotipada, a presença em homozigose da variante G894T (rs1799983) do gene da isoforma endotelial da sintase de NO (eNOS). Esta variante resulta na substituição do aminoácido Glu por Asp na posição 298 da enzima eNOS. Sugestivamente, o fato desta substituição acontecer no domínio oxidativo da eNOS, isso poderia afetar sua atividade enzimática ou que

sabe torná-la mais susceptível à clivagem proteolítica. No entanto, estudos utilizando-se de proteína recombinante revelaram não haver diferença na atividade enzimática entre as duas formas protéicas (Hingorani, 2001). Tesauro et al. (2000) demonstraram que o resíduo Asp298 é mais susceptível à clivagem proteolítica, precisamente na posição Asp298-Pro299. Posteriormente, Fairchild et al. (2001) verificaram que o resultado do estudo anterior era um artefato dos métodos de preparação do experimento. Mesmo assim, não pode ser descartada a hipótese de que, *in vivo*, um desconhecido mecanismo de clivagem proteolítica ou um mecanismo de regulação pós-transcricional esteja sendo modulado pelo resíduo Asp298.

No sentido de comprovar a hipótese de que tal variante genética poderia ser funcional, elaboramos um racional representativo à única possibilidade, até o momento, de ser testada *in vivo*. Joyner & Dietz, (1997) demonstraram que parte da vasodilatação muscular durante o exercício é mediada por aumento na biodisponibilidade do NO. Baseado neste contexto, nosso objetivo foi o de testar, a partir do bloqueio da atividade da eNOS no músculo (infusão intra-arterial), se haveria alteração na biodisponibilidade do NO e conseqüentemente na vasodilatação muscular, em indivíduos portadores do alelo 894T. Para a condução deste trabalho, foi necessário compreender em detalhes a relação entre NO, músculo esquelético e reatividade vascular, conforme descrito nos tópicos a seguir. Na seqüência, a partir da comprovação de que o variante G894T do gene eNOS está funcionalmente associada à uma prejudicada vasodilatação muscular em resposta à ativação simpática reflexa induzida pelo exercício, nosso objetivo foi o de investigar a natureza poligênica da relação “adaptações fisiológicas e treinamento físico”. As interações gene-gene e genes-ambiente são passíveis de serem analisadas a partir de plataformas exploratórias com possibilidade de visualização do genoma completo (*genome-wide analysis*). A investigação do transcriptoma responsivo ao treinamento físico por arrays de expressão gênica (Human GeneChip 1.0 ST-Affymetrix) - com possibilidade de visualização de 28.869 transcritos foi conduzida no sentido de identificarmos novos marcadores moleculares e que refletem a plasticidade do músculo esquelético em resposta ao estresse mecânico do exercício físico. Informações estas com aplicação direta ao esporte de alto rendimento.

## **Óxido Nítrico e Sistema Cardiovascular**

O NO, um intermediário gasoso atuante na sinalização de múltiplos processos biológicos, é um radical livre que apresenta um elétron desemparelhado na última camada e uma meia vida de 4 a 8 segundos em meio aquoso oxigenado (Moncada et al., 1989; Kojda & Harrison, 1999). Considerado um gás lábil com livre difusão nas membranas celulares, tal característica confere a esta molécula uma alta atividade biológica (Palmer et al., 1987). O entendimento da complexidade da função endotelial e a dificuldade de se estudar cada um de seus componentes isoladamente vem sendo aos poucos superado. Dentro deste contexto, modelos animais capazes de reproduzir um estado fisiológico alterado foram desenvolvidos, possibilitando, por exemplo, o funcionamento do sistema em condições de baixa ou aumentada biodisponibilidade de NO. Além disso, estudos *in vivo* em humanos, através da infusão intra-arterial de compostos com potencial em modular a função endotélio-dependente ou endotélio-independente, possibilitaram a investigação dos mecanismos moduladores da função vascular, em condições normais e patológicas.

### **Substrato, Sintases de Óxido Nítrico e Atividade Enzimática**

Caracterizado como “aminoácido metabolicamente versátil” pelo reconhecimento de suas múltiplas funções, a L-arginina é ainda o substrato necessário para a síntese do NO. A disponibilidade deste substrato no interior das células do endotélio vascular é dependente, pelo menos em parte, de sua concentração extracelular e da sua captação para o interior das cavéolas, onde a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) exerce sua função. Baseado na localização da isoforma 1 dos transportadores de aminoácidos catiônicos (CAT-1; gene SLC7A1), nas cavéolas, tal transportador é o principal responsável pelo suprimento de L-arginina para a eNOS e consequente catálise a NO (McDonald et al., 1997). A produção enzimática do NO a partir do aminoácido L-arginina é mediada por uma família de três sintases de óxido nítrico (NOS), codificadas por genes distintos (Marletta, 1994). As isoformas compartilham 50-60% de homologia na seqüência de aminoácidos nos domínios oxidase e redutase (Govers & Rabelink, 2001). Estas isoformas exibem características distintas que refletem suas funções

específicas *in vivo* (Stuehr, 1997). A óxido nítrico sintase endotelial (eNOS ou NOS III; 7q35-36) e a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS ou NOS I; 12q24.2) possuem mecanismo de ativação constitutivo (cNOS). A isoforma induzida (iNOS ou NOS II; 17cen-q12) encontra-se expressa em processos celulares anormais como na insuficiência cardíaca (Ferreiro et al., 2004), induzidas por citocinas e agentes inflamatórios, o que resulta em alto fluxo de NO (Andrew & Mayer, 1999; Wang & Wang, 2000).

A eNOS funciona como um dímero, constituída de dois monômeros idênticos, que por sua vez podem ser divididos funcional e estruturalmente em dois domínios principais: um domínio C-terminal redutase, homólogo ao citocromo P450 e que contém sítios de ligação para NADPH, flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e um domínio N-terminal oxidase, que abstrai um elétron do substrato L-arginina e possui sítios de ligação para o ferro heme, para o co-fator tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) e para a L-arginina (Andrew & Mayer, 1999; Wang & Wang, 2000). A reação de catálise das NOS constitutivas envolve dois estágios de oxidação: a hidroxilação da L-arginina em N<sup>G</sup>-hidroxi-L-arginina seguida da oxidação deste intermediário com utilização de um elétron da NADPH, formando L-citrulina e NO (Albrecht et al., 2003). Esta reação consome 1.5 mol de NADPH e 2 mol de oxigênio por mol de L-citrulina formada (Griffith & Stuehr, 1995). Co-fatores como ferro heme, BH<sub>4</sub> e L-arginina têm sido particularmente estudados, e a baixa biodisponibilidade destes induz ao fenômeno de desacoplamento da eNOS (Harrison, 1997; Vasquez-Vivar et al., 1998). O ferro heme é essencial para a dimerização das 3 isoformas (Klatt et al., 1996); baixas concentrações ou ausência de L-arginina catalisa a redução do oxigênio em superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Mayer et al., 1991; Heinzl et al., 1992) e níveis diminuídos de BH<sub>4</sub> leva à produção simultânea de NO e O<sub>2</sub><sup>-</sup>, produtos que reagem entre si formando peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) (Beckman & Koppenol, 1996). Uma vez verificado que as células endoteliais contêm uma concentração basal da proteína eNOS, o gene da eNOS foi considerado constitutivamente expresso. O mecanismo de ativação da eNOS tem sido descrito como o mais elaborado das três isoformas, refletindo a complexidade do controle fisiológico dos diferentes leitos vasculares (Govers & Rabelink, 2001; Michel & Feron, 1997). O mecanismo clássico de ativação das isoformas constitutivas é dependente do cálcio (Ca<sup>++</sup>), enquanto a iNOS independe da elevação das

concentrações intracelulares de  $\text{Ca}^{++}$ , devido à alta afinidade da ligação da enzima com a calmodulina (Harrison, 1997). O principal mecanismo de ativação da eNOS se dá pela fosforilação do aminoácido serina na posição 1177 (Shiojima & Walsh, 2002) pela enzima Akt kinase (ou proteína kinase B), o que aumenta a sensibilidade da eNOS às concentrações basais de  $\text{Ca}^{++}$ /calmodulina (Fulton et al., 1999). A ativação tônica ou fásica da eNOS em resposta ao fluxo sanguíneo é independente das alterações na concentração do  $\text{Ca}^{++}$  e constitui-se do *shear-stress*. Fulton et al. (1999) e Dimmeler et al. (1999) demonstraram que a troca do resíduo de serina<sup>1177/1179</sup> pelo aminoácido alanina, torna a eNOS resistente à fosforilação e ativação pela enzima Akt, uma via dependente de fosfatidilinositol-3 kinase (PI-3K). Embora a fosforilação do resíduo de serina<sup>1177</sup> desempenhe um papel crucial na ativação enzimática da eNOS, é sabido que sua regulação é dependente do padrão de fosforilação de múltiplos sítios (Mount et al. 2007). A fosforilação do resíduo de serina<sup>633</sup>, localizado no domínio de ligação da flavina mononucleotídeo (FMN), também aumenta a atividade da eNOS e parece ser particularmente importante na manutenção da síntese de NO após a ativação por  $\text{Ca}^{++}$ /calmodulina e fosforilação do resíduo de serina<sup>1177</sup>. Por outro lado, fosforilado pela proteína kinase C (PKC), o resíduo de treonina<sup>495</sup> interfere com o domínio de ligação da calmodulina regulando negativamente a síntese do NO. Embora já se conheça a importância de múltiplos sítios de fosforilação na regulação da atividade da eNOS, os mecanismos de regulação envolvendo kinases e fosfatases ainda não estão totalmente elucidados.

### **Óxido nítrico, Tono Vascular e Vasodilatação Muscular**

Após a verificação de que o NO é sintetizado pelas células endoteliais e que este participa da regulação hemodinâmica cardiovascular, o interesse passou a se concentrar na quantificação de sua participação na homeostasia deste sistema. Estudos *in vivo* demonstraram que a administração intra-arterial de  $\text{N}^G$ -monometil-L-arginina (L-NMMA), um bloqueador inespecífico da atividade das NOS, reduz o fluxo sanguíneo local entre 25% a 50% (Joyner et al., 1997). Embora o tono vascular basal seja o produto das forças constritoras *versus* forças vasodilatadoras, estes resultados demonstram que o NO é, pelo menos em parte, o modulador do fenótipo em questão. Durante condições de estresse mental e exercício é observado,

juntamente com a resposta taquicárdica e aumento da pressão arterial, vasodilatação em leito muscular esquelético como parte das respostas fisiológicas de ajuste do organismo. Foi postulado que parte desta resposta vasodilatadora muscular seria modulada por um componente neural, o que ficou evidente posteriormente pela existência de fibras simpáticas colinérgicas para a musculatura esquelética de algumas espécies de mamíferos com exceção de primatas e humanos. Foi verificado que a estimulação elétrica do nervo simpático provocava vasodilatação em leito muscular, quando a liberação pré-sináptica de noradrenalina era inibida pela infusão intra-arterial de fármacos. No entanto, esta resposta vasodilatadora mostrou-se atenuada quando um antagonista muscarínico foi administrado (Abrahams et al. 1964, Bolme & Fuxe, 1970). Posteriormente, ficou evidente que o NO era, pelo menos em parte, o modulador da resposta vasodilatadora verificada quando fibras simpáticas colinérgicas eram estimuladas (Matsukawa et al., 1993). Paralelamente, Blair et al. (1959) verificaram que, em humanos, a vasodilatação no antebraço durante manobras fisiológicas é também mediada por um componente neural. Durante a aplicação do estresse mental, o fluxo sanguíneo no membro simpatectomizado não se alterava, quando comparado ao fluxo sanguíneo no membro controle. Em adição, a infusão intra-arterial de atropina no membro controle reduzia em aproximadamente 50% o aumento no fluxo sanguíneo. Naquele momento, utilizando-se das evidências indiretas, os autores sugeriram a existência de inervação simpática colinérgica para a musculatura esquelética de humanos. Mimetizando os experimentos em animais, mais tarde os estudos de Dietz et al. (1994) e Dietz et al. (1997) deixaram evidente que parte da resposta vasodilatadora muscular, medida no antebraço, durante o estresse mental ou o exercício é atenuada com a administrado intra-arterial do L-NMMA. Os mecanismos pelos quais a acetilcolina e o NO são sintetizados e liberados durante as reações de defesa do organismo não estão completamente elucidados em humanos. As evidências alcançadas com bloqueios farmacológicos permitem apenas sugerir a existência de fibras simpáticas colinérgicas para a musculatura esquelética. Decorrente de tais limitações, os autores não descartam a possibilidade de que a vasodilatação seja causada por uma combinação entre fatores circulantes e locais. Uma pequena parte das células endoteliais poderia sintetizar e liberar acetilcolina (Milner et al. 1990). Além disso, a ativação de receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos localizados no músculo liso vascular resultaria no relaxamento desse

tecido e, em consequência, vasodilatação. No entanto, Majmudar et al. (1999) verificaram que parte da vasodilatação resultante da ativação dos  $\beta_2$ -adrenoceptores é mediada pelo NO. Embora os autores não expliquem o mecanismo responsável por este fenômeno, aproximadamente 25% da vasodilatação observada no antebraço com a infusão de Ritodrine (agonista seletivo  $\beta_2$ -adrenérgico) foi atenuada quando L-NMMA é co-infundido. Estes resultados sugerem a existência dos  $\beta_2$ -adrenoceptores no endotélio vascular, contribuindo para o aumento da atividade da eNOS. Em adição, o aumento da estimulação mecânica do endotélio vascular resultaria em síntese aumentada de NO, via PI-3K-Akt kinase, com subsequente fosforilação do resíduo de serina<sup>1177</sup>.

### **Polimorfismos da eNOS e Estudos Funcionais da Variante G894T.**

Genotipada e seqüenciada em 1993 por Marsden e colaboradores (GenBank D26607), a eNOS está localizada no cromossomo 7q35-36 e variações na sua seqüência têm sido descritas na região promotora, exons e íntrons (Wang & Wang, 2000). O gene (21-22 kbp) compreende 26 exons e 25 íntrons com 133 kDa. A seqüência polipeptídica gerada contém 1203 aminoácidos (Marsden et al., 1993). Já está descrito na literatura a existência de três polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) na região promotora, porém em localizações de não ligação de fatores de transcrição (Karantzoulis-Fegaras et al., 1999). Dos polimorfismos encontrados nos exons 6 e 7, a substituição da base nitrogenada guanina por timina (G→T), na posição 894 localizada no exon 7, resulta na substituição do aminoácido glutamato (GAG) por aspartato (GAT) na posição 298 da seqüência polipeptídica (Philip et al., 1999). Sugere-se que os polimorfismos localizados na região promotora do gene desempenham influência na transcrição do RNAm, enquanto os polimorfismos localizados em regiões codificadoras podem resultar em alteração de atividade enzimática (Hingorani, 2001). O resíduo 298 está localizado externamente no domínio oxidase da enzima, sítios de ligação para L-arginina ou BH<sub>4</sub>. Estudos enzimáticos utilizando eNOS recombinante mostraram não haver diferença na constante de Michaelis ( $k_m$ ) nem na  $V_{m\acute{a}x}$  entre as duas formas da enzima (Hingorani, 2001). Embora a atividade enzimática pareça não ser afetada pela forma Asp298 da enzima, Tesauro et al. (2000) mostraram que esta variante apresenta maior susceptibilidade à clivagem proteolítica em fragmentos de 100 e 35 KDa



precisamente na posição Asp<sup>298</sup>-Pro<sup>299</sup>, quando comparado à variante Glu298. No entanto, Fairchild et al. (2001) demonstraram que tal susceptibilidade proteolítica ocorria devido a um artefato da preparação do experimento. A inconsistência desses resultados não exclui a possibilidade de que, *in vivo*, um desconhecido mecanismo proteolítico ou até mesmo uma alteração na regulação pós-transcricional possa estar sendo modulada pela variante Asp298 da enzima.

### **Transcriptoma e Exercício Físico.**

O rastreamento dos “genes do exercício físico” tem envolvido, além da identificação de variantes no código de genes específicos, a análise do padrão de expressão gênica, a partir da extração do RNA (transcriptoma) e a quantificação da proteína e/ou atividade enzimática em tecidos específicos (Charchar et al., 2008). Alterações na quantificação do transcrito ou elementos pós-transcricional de um único gene ou de um conjunto deles, reflete a exposição a um determinado fator ambiental. Além disso, tais genes podem encontrar-se mais ou menos expressos como consequência de variantes genéticas com potencial em alterar sua responsividade a fatores nucleares transcricionais. A análise do transcriptoma e a consequente determinação das alterações no padrão de expressão em um conjunto de genes se traduzem em conhecimento necessário uma vez que, a combinação de múltiplas alterações moleculares é responsável em determinar o grau das respostas adaptativas dos diferentes sistemas ao exercício físico. Schmutz et al. (2006) analisaram as alterações no padrão de expressão de 229 genes associados a função muscular. Após uma única sessão de exercício físico, ocorreram alterações na expressão de 23 transcritos. O aumento foi verificado na expressão de genes envolvidos em vias metabólicas glicolíticas e oxidativas (GLUT4, ALDOC, PFKFB3, FABP3, LPL, ECH1, ACADL, CPT1, CYCS, SOD1, SOD3, SLC16A1), contração e arquitetura muscular (MYH4 e TUBA1), miogênese (MYOD1 e MEF2B), regulação do ciclo celular (IGFBP6 e IGF1) e estrutura celular (COL6A1). Após um período de 6 semanas de treinamento em cicloergômetro o padrão de expressão gênica foi alterado. Dentre os 23 genes com expressão aumentada no pré-treinamento, apenas dois deles e mais 11 outros genes mostraram aumento na expressão. Os autores concluem que, principalmente para aqueles genes envolvidos nos processos

metabólicos, a regulação transcricional é modificada dependendo do estado de aptidão física de um indivíduo.

As diferenças de responsividade ao exercício e treinamento físico, podem ser analisadas em nível molecular, uma vez que qualquer resposta fisiológica do organismo está diretamente ligada a alterações de expressão gênica. Parte do crescente interesse pelo método de *microarray* está relacionada à possibilidade de identificação de novos genes candidatos, previamente não associados com o fenótipo em questão. Em adição, a identificação de distintos padrões de expressão gênica entre indivíduos pode fornecer importantes informações que servirão como base para a adoção de terapias individualizadas. A análise completa do padrão de expressão gênica de indivíduos sedentários submetidos ao treinamento físico parece ser uma iniciativa plausível a partir do momento em que múltiplos genes agem em conjunto para induzir as adaptações em diferentes sistemas fisiológicos. Neste estudo, esta análise será conduzida em células leucocitárias no sentido de identificar um transcriptoma responsivo ao treinamento físico, com a possibilidade de identificação de novos marcadores moleculares com potencial em auxiliarem na prevenção e reabilitação de lesões em atletas.

### **Leucócitos Como Sensores Biológicos do Exercício Físico**

Durante o exercício físico, as diferentes funções exercidas por grupos de células ou tecidos específicos resultam na modulação da expressão de diferentes genes. Esta especificidade justificaria a necessidade de se compreender as respostas moleculares destes tecidos, frente ao estresse fisiológico induzido pelo exercício físico. Em se tratando da investigação de fenótipos poligênicos, soma-se ao desafio da identificação dos genes e variantes genéticas candidatas, a dificuldade de acesso a tecidos relevantes para a análise das possíveis alterações transcricionais ou pós-transcricionais. Por exemplo, no campo da pesquisa genômica em cardiologia, Seo et al. (2006) atentam para o fato de que o seu lento avanço pode ser creditada à dificuldade de acesso a tecidos ditos “informativos”. No entanto, nos últimos anos estudos com humanos têm investigado as bases moleculares das doenças cardiovasculares utilizando-se para isso de amostras de tecido de aorta, ventrículos e átrios. Para as pesquisas envolvendo exercício físico e alterações morfo-funcionais, o maior interesse parece concentrar-se na musculatura

esquelética. Não menos importante que as análises por biópsia do tecido muscular esquelético, são as investigações celulares e moleculares das alterações que ocorrem em células sanguíneas em resposta ao exercício e ao treinamento físico.

O exercício físico tem demonstrado ser um fator regulador das células imunes e de suas funções. Existem evidências de que o estresse induzido pelo exercício evoca o sistema imune com a ativação de vias pró-inflamatórias e antiinflamatórias (Ostrowski et al., 1999), vias estas envolvidas no reparo do músculo esquelético após lesão. Em adição, alterações podem ser observadas em biomarcadores vasoativos como, por exemplo, as catecolaminas, endotelina e angiotensina II. Em termos moleculares, o próprio estresse mecânico causado pela pressão sanguínea aumentada durante o exercício, somada aos efeitos do *shear stress* na parede do vaso, desencadeiam alterações no padrão de expressão gênica em células sanguíneas, fazendo com que estas sejam importantes fontes de informação genômica. Em resumo, leucócitos podem portar informações específicas relacionadas à circulação, servindo como sensores biológicos do ambiente sistêmico. Em adição, estas alterações moleculares em nível transcricional podem ser utilizadas tanto para o diagnóstico e prognóstico de fenótipos músculo esqueléticos, quanto para o monitoramento do grau e resposta a intervenções específicas, como é o caso do esporte de alto rendimento. Neste estudo propõe-se a análise do padrão de expressão gênica de células leucocitárias de indivíduos sedentários saudáveis, atentando para as possíveis alterações neste padrão de expressão em resposta ao treinamento físico.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Este estudo teve como objetivo caracterizar a influência da variante G894T do gene da eNOS no fenótipo de vasodilatação muscular endotélio-dependente e uma assinatura molecular do treinamento físico representativa do genoma completo.

### **Objetivos Específicos**

Testar a hipótese de que:

- 1) O fluxo sanguíneo basal e/ou a vasodilatação muscular reflexa induzida pelo exercício estariam diminuídos em indivíduos portadores do alelo T894, quando comparado a indivíduos com pelo menos um alelo G894 do gene da eNOS;
- 2) A menor resposta vasodilatadora reflexa verificada nos indivíduos com genótipo TT seria, pelo menos em parte, mediada por uma biodisponibilidade reduzida do óxido nítrico e/ou um tônus simpático vasoconstritor aumentado;
- 3) como sensores biológicos do ambiente sistêmico, leucócitos podem portar um transcriptoma responsivo ao treinamento físico.

## MÉTODOS

### Casuísticas

Duzentos e oitenta e sete indivíduos, pacientes do ambulatório do Instituto do Coração – InCor (HCFMUSP) de São Paulo, foram convidados a integrar o proposto estudo. Todos foram submetidos à coleta de sangue para subsequente extração e armazenamento do DNA, além de análises clínicas e laboratoriais para a certificação do estado e condição fisiológica. Após genotipagem para o polimorfismo G894T do gene da eNOS, os 287 indivíduos foram subdivididos obedecendo a presença dos alelos G e T, ou seja, entre os genótipos GG (n=147; *wild-type*), GT (n=115) e TT (n=25). Na seqüência, foi realizada uma cuidadosa seleção determinada pelos critérios de inclusão e exclusão estabelecidos pelo estudo. Presença de sintomas e doenças cardiovasculares e metabólicas, uso de fármacos com potencial em afetar a função endotelial e fatores de risco como diabetes, dislipidemia, hipertensão arterial e tabagismo foram utilizados como fatores de exclusão, enquanto índice de massa corporal (IMC) < 27 e inatividade física por pelo menos 6 meses foram utilizados como fatores de inclusão dos indivíduos na investigação. Do total, 15 indivíduos GG, 9 indivíduos GT e 9 indivíduos TT obedeceram os critérios de seleção e concordaram com os procedimentos do estudo.

A partir de um banco de dados de 317 indivíduos pertencentes ao efetivo em processo de formação pela Polícia Militar do Estado de São Paulo, do sexo masculino, na faixa etária entre 18 e 31 anos, 13 foram selecionados e seus respectivos RNAs utilizados para análise do transcriptoma. Este banco de dados é composto de indivíduos saudáveis (ECG repouso e glicemia de jejum normais – laudo do Hospital da Polícia Militar – HPM). Em adição, obrigatoriamente não engajados em atividade física regular (3 a 4x/semana) nos últimos 6 meses; não usuários em uso de fumo e ECG de esforço normal (avaliação ergoespirométrica realizada no início do protocolo de estudo). Os protocolos de pesquisa foram aprovados no mérito científico pela Comissão Científica e de Ética do Instituto do Coração recebendo, posteriormente, parecer positivo da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolo Pesquisa nº 109/05) e (Protocolo de Pesquisa nº 0714/10). Todos os indivíduos

envolvidos no estudo foram informados sobre os procedimentos que seriam utilizados na investigação e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

## **Métodos e Procedimentos**

### **Coleta Sangüínea, Extração do DNA e RNA e Genotipagem**

As amostras de sangue periférico (8 mL) foram coletadas em tubos contendo EDTA como agente anticoagulante. Para isso, uma solução de EDTA a 5,4 mM foi preparada e adicionada ao sangue total. Após a homogeneização do sangue, o DNA genômico foi extraído do sangue total seguindo os procedimentos padrões (Pereira et al., 2007). O material genômico foi armazenado a -70°C e utilizado posteriormente para a genotipagem. A genotipagem foi realizada utilizando-se a técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), onde o DNA genômico é submetido a uma reação de cadeia da polimerase (PCR) com os *primers* correspondentes à região alvo de amplificação. Posteriormente ao PCR, as amostras foram submetidas à digestão enzimática por enzima de restrição para a detecção do alelo mutante. A variante estudada, localizada no exon 7, consiste na troca do nucleotídeo guanina (G) por timina (T) na posição 894 do cDNA da eNOS. Tal mutação resulta na alteração do aminoácido glutamato (Glu) por aspartato (Asp) no codon 298 da enzima recebendo, portanto, a denominação “Glu298Asp”. Os genótipos GG, GT e TT foram identificados por reação em cadeia da polimerase (PCR) seguidos por RFLP (Miyamoto et al., 1998). Resumidamente, os primers para PCR foram construídos para a amplificação de um fragmento de 248-pb, contendo a posição 894 do gene (sense and antisense primers; 5'-AAGGCAGGAGACAGTGGATGGA-3' e 5'-CCCAGTCAATCCCTTTGGTGCTCA-3', respectivamente). A mutação *missense*, resultante da presença do nucleotídeo T na posição 894, é reconhecida pela enzima de restrição *Mbol* gerando, portanto, dois fragmentos de 158-pb e 90-pb de comprimento. O produto da digestão foi posteriormente analisado em gel de agarose a 2%. Uma nova genotipagem randomizada com 150 amostras foi realizada posteriormente por outro técnico e nenhuma misgenotipagem foi detectada.

A extração do RNA total foi feita a partir leucócitos de sangue periférico isolados com o reagente TRIzol (Invitrogen®, USA), conforme descrito a seguir. O

procedimento se inicia com a separação da fração mononuclear. O sangue total é homogeneizado e misturado a um volume de solução fisiológica na concentração 1:1. Em um tubo Falcon de 15 ml, será adicionado 3 ml de Ficoll e a solução soro/sangue será adicionada suavemente sobre o Ficoll com o cuidado para não misturar. O sistema será submetido a centrifugação em temperatura ambiente a 3000 rpm por 30 minutos. Após a centrifugação, o sistema bifásico passará a possuir quatro fases: hemácias, Ficoll, fração mononuclear e plasma. A camada de Ficoll e a fração mononuclear serão colhidas juntas e submetidas à lavagem com soro duas vezes. O pellet contendo a fração mononuclear será re-suspendida em 1ml de TRIzol®. Para extração do RNA, as células serão lisadas no TRIzol® através de pipetagem repetitiva. A amostra será incubada por 5 minutos a temperatura ambiente e em seguida será adicionado 0,2 ml de clorofórmio. Os tubos serão agitados vigorosamente na mão por 15 segundos e serão incubados por 2 a 3 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, as amostras serão submetidas a centrifugação a no máximo 12.000 rpm a 4°C por 15 minutos. Após a centrifugação, a mistura separa-se em uma camada vermelha, a fase fenol clorofórmio, uma interfase e uma fase superior aquosa incolor. O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa. Essa fase será transferida para um tubo limpo e o RNA será precipitado misturando-se 0,5 ml de isopropanol. As amostras serão incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos e submetidas a centrifugação a no máximo 11.500 rpm a 4°C por 10 min. O sobrenadante será descartado e o pellet será lavado uma vez com 1 ml de etanol 75% gelado. A amostra será misturada em vórtex e centrifugada a no máximo 9000 rpm a 4°C por 5 min. Ao final do procedimento, o RNA será seco invertendo-se o tubo sobre papel filtro por 30 minutos e será dissolvido em água ultrapura livre de RNase.

### **Fluxo Sanguíneo Muscular**

O fluxo sanguíneo muscular (mL de sangue/min/100 mL de tecido) foi avaliado pela técnica de pletismografia de oclusão venosa no antebraço. O antebraço avaliado era sempre o correspondente ao braço não dominante. Um manguito neonatal era posicionado na região do pulso e um outro manguito na região do braço, aproximadamente 4 cm acima da fossa cubital. Durante o exame, o fluxo sanguíneo era totalmente obstruído para a região da mão mediante a uma

insuflação supra-sistólica do manguito posicionado na região do pulso. O manguito posicionado na região do braço era inflado e desinflado a uma pressão de 50 mmHg em ciclos de 8 segundos. Quando inflado, o retorno venoso era impedido e o aumento no perímetro do antebraço detectado por um tubo silástico preenchido com mercúrio. O aumento na tensão no tubo silástico refletia o aumento do volume do antebraço e, conseqüentemente, a vasodilatação. A condutância vascular no antebraço foi calculada como  $(\text{fluxo sangüíneo no antebraço})/(\text{pressão arterial média}) \times 100$  e o resultado expresso em “unidades” (Negrão et al., 2001; Tombetta et al., 2003).

### **Pressão Arterial e Frequência Cardíaca**

A pressão arterial foi monitorada de forma não invasiva e intermitente, utilizando-se um manguito automático e oscilométrico (Dixtal, DX 2710; Brazil, Manaus), posicionado na perna. A frequência cardíaca foi monitorada continuamente através de registro eletrocardiográfico.

Durante o estudo invasivo, a pressão arterial foi monitorada de forma direta através de um transdutor de pressão com sensor hemodinâmico (Edwards Lifesciences LLC; Irvine, CA 92614-5686 USA), conectado a um cateter específico para punção arterial (Arrow RA-04220). O sinal da onda de pulso foi registrado em um computador (GATEWAY 2000 4 DX2-50V), através do programa AT/CODAS, numa frequência de 500Hz. A frequência cardíaca foi obtida continuamente através do registro da onda de pulso da pressão intra-arterial (Negrão et al., 2001; Tombetta et al., 2003).

### **Exercício de *Handgrip***

O exercício de *handgrip* foi realizado por apreensão da mão, utilizando-se de um dinamômetro. O exercício foi sempre realizado com o braço dominante. Após a obtenção da máxima contração voluntária (MCV; média de 3 tentativas) foi calculado um valor correspondente a 30% do máximo (Tombetta et al., 2003). Este valor foi posteriormente utilizado durante os três minutos do exercício isométrico.

### **Punção Arterial e Infusão de Drogas**



Para a infusão das drogas foi realizada a punção da artéria braquial sempre no membro superior não dominante. A punção foi realizada após ampla assepsia com Riodeine (Polivinil Pirroliona Iodo/PVP- 10% de iodo ativo/Rioquímica®) e proteção da área manipulada com instrumentação esterilizada. Previamente à introdução do cateter, a região a ser puncionada era anestesiada utilizando-se lidocaina 2%. O cateter específico para punção arterial (Arrow RA-04220) era, então, introduzido e conectado a um cateter de dupla via e, subseqüentemente, conectado a um equipo transdutor de pressão com sensor hemodinâmico (Edwards Lifesciences LLC; Irvine, CA 92614-5686 USA). Solução fisiológica e drogas foram administradas utilizando-se uma bomba de infusão contínua, conectada a uma das vias do cateter de dupla via.

### **Atividade Nervosa Simpática Muscular**

A atividade nervosa simpática muscular (ANSM) foi avaliada diretamente utilizando-se a técnica de microneurografia. Esta consiste na implantação de um micro eletrodo de tungstênio no nervo fibular (via pós-ganglionar) do indivíduo estudado. Após a impactação do nervo e captação do sinal nervoso, os disparos eram registrados por um polígrafo e o resultado apresentado por disparos ocorridos por minuto (Negrão et al., 2001; Trombetta et al., 2003).

### **Protocolos Experimentais**

A padronização da preparação dos pacientes a partir do dia que antecede o exame foi determinada no sentido de minimizar a possibilidade de condições que pudessem vir a interferir na realização e nos resultados do estudo. Todos os pacientes avaliados no Protocolo I e os que retornaram para o Protocolo II foram avaliados no período da manhã e foram instruídos a preceder da seguinte forma:

» ***Dia que antecede o exame:*** não ingerir alimentos gordurosos durante a noite e não ingerir líquido em alta quantidade. Não realizar qualquer atividade física de média ou alta intensidade.

» ***Manhã do exame:*** não ingerir líquido em alta quantidade; Não ingerir produtos que contenham cafeína em sua composição; Não ingerir manteiga,

margarina, requeijão ou qualquer outro produto que contenha alto teor de gordura em sua composição; Não realizar qualquer atividade física de média ou alta intensidade.

### **Protocolo I**

Trinta e três indivíduos (15 GG, 9 GT e 9 TT; ver “Casuística” para detalhes da amostra populacional) foram avaliados. A preparação do paciente para a realização do protocolo experimental procedia da seguinte forma: Os eletrodos para a obtenção do sinal eletrocardiográfico eram colocados e o indivíduo posicionado em uma maca na posição supina; O membro superior não dominante era posicionado em extensão lateral e os acessórios do conjunto de pletismografia eram posicionados para a obtenção das curvas de fluxo sanguíneo no antebraço. Na seqüência, um manguito era posicionado e ajustado à perna para o registro do comportamento da pressão arterial. Após quinze minutos decorridos da instrumentação, dava-se início ao protocolo experimental.

O protocolo I está esquematizado na Figura 2. As variáveis fluxo sanguíneo no antebraço, pressão arterial e frequência cardíaca eram registradas no período basal (3 min.) e durante o exercício de *handgrip* a 30% da máxima contração voluntária (3 min.).

### **Protocolo II**

Quinze indivíduos (8 GG e 7 TT; ver “Casuística” para detalhes da amostra populacional) foram reavaliados. A preparação para a realização do protocolo experimental procedia da seguinte forma: Os eletrodos para a obtenção do sinal eletrocardiográfico eram colocados e o indivíduo posicionado em uma maca na posição supina; O membro superior não dominante era posicionado em extensão lateral e, após assepsia e anestesia subcutânea do local, era então realizada a punção da artéria braquial. Posteriormente à punção e conexão do cateter e do equipo transdutor de pressão, os acessórios do conjunto de pletismografia eram posicionados para a obtenção das curvas de fluxo sanguíneo no antebraço. Na seqüência, a perna era posicionada para a microneurografia. Caso a tentativa de aquisição de um sinal nervoso passível de análise excedesse 60 minutos, o exame era iniciado sem o registro do nervo. Após vinte minutos decorridos da

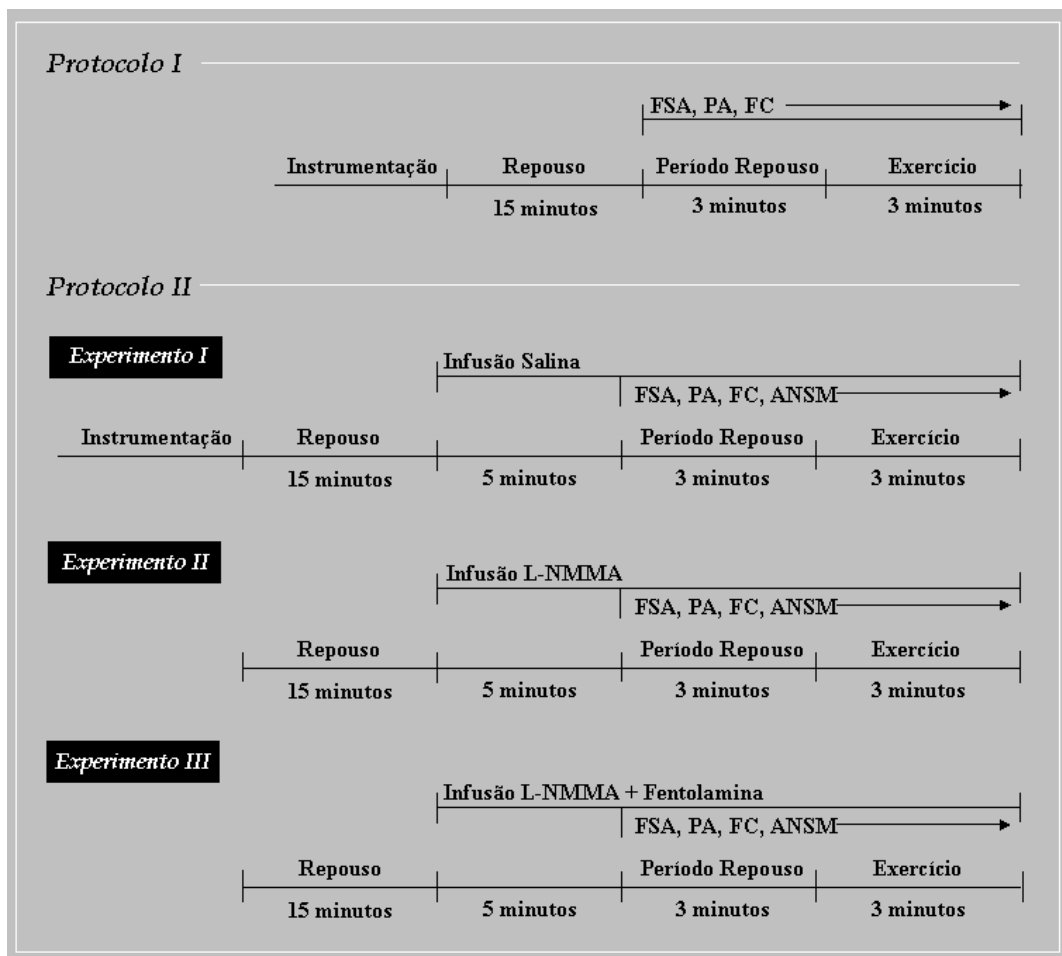


Figura 2 – Protocolos experimentais. FSA, fluxo sanguíneo no antebraço; PA, pressão arterial; FC, frequência cardíaca; ANSM, atividade nervosa simpática muscular.

instrumentação, dava-se início à seqüência experimental. O Protocolo II com suas respectivas seqüências de administração das drogas está esquematizado na Figura 2.

No Experimento I a infusão de solução fisiológica (NaCl a 0,9%; Baxter Hospitalar LTDA; São Paulo/Brasil) a 0,5 ml/min foi realizada como condição controle (Dietz et al., 1997; Negrão et al., 2000). Antes do início do registro das variáveis, foi realizada uma pré-infusão (5 min.). Na seqüência o registro foi feito no período basal (3 min.) e durante o exercício de handgrip a 30% da máxima contração voluntária (3 min.), totalizando 11 minutos de infusão.

No Experimento II o inibidor não-seletivo  $N^G$ - monometil-L-arginina (L-NMMA) (Clinalfa AG, Laufelfingen, Switzerland) foi administrado para o bloqueio local das óxido nítrico sintases (4 mg/min.; 0,5 ml/min.) (Dietz et al., 1994; Dyke et al., 1995;

Dietz et al., 1997; Joyner & Dietz, 1997; Joyner e Dietz, 2003). Se a diferença na resposta vasodilatadora reflexa entre os genótipos fosse consequência de alterações na biodisponibilidade do NO, a administração intra-arterial do L-NMMA iria abolir a diferença entre os genótipos GG e TT. Antes do início do registro das variáveis, foi realizada uma pré-infusão (5 min.) para saturação do antebraço. Na seqüência o registro foi feito no período basal (3 min.) e durante o exercício de handgrip a 30% da máxima contração voluntária (3 min.), totalizando 11 minutos de infusão.

No Experimento III, em associação com o L-NMMA (4 mg/min.; 0,5 ml/min.), o bloqueador seletivo fentolamina (Regitine<sup>®</sup>, Ciba Pharmaceutical Co., Summit, NJ, USA) foi administrado para o bloqueio local dos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos pós-sinápticos (100  $\mu$ g/min.; 0,5 ml/min.) (Dietz et al., 1997; Joyner & Dietz, 1997; Joyner e Dietz, 2003). Se a prejudicada resposta vasodilatadora reflexa observada no genótipo TT fosse consequência de uma atividade nervosa simpática aumentada, o duplo bloqueio iria abolir a diferença entre os genótipos. Antes do início do registro das variáveis, foi realizada uma pré-infusão (5 min.) para saturação do antebraço. Na seqüência o registro foi feito no período basal (3 min.) e durante o exercício de handgrip a 30% da máxima contração voluntária (3 min.), totalizando 11 minutos de infusão.

As drogas foram manipuladas em meio esterilizado e a diluição realizada utilizando-se solução fisiológica (NaCl a 0,9%; Baxter Hospitalar LTDA; São Paulo/Brasil).

### **Ensaio por *Microarray***

Os experimentos de “microarray” foram realizados utilizando a plataforma Affymetrix (Genechip Human Gene 1.0 Array Kit) para a análise de expressão de 28.869 genes de acordo com instruções do fabricante. Este sistema baseia-se na preparação de moléculas de cRNA marcados com biotina através do método de amplificação linear. A partir do RNA é realizado uma transcrição reversa para obtenção de moléculas de cDNA. O cDNA sintetizado serve de molde para a reação de transcrição “in vitro” para a produção de cRNA, ocorrendo uma amplificação linear de aproximadamente 1000 – 5000 vezes a quantidade de RNA mensageiro inicial. Em cada amostra inicial são adicionados RNAs mensageiros bacterianos que

servem como controles da síntese de cDNA e da transcrição *in vitro*. Além disto, estes RNAs controles são utilizados no monitoramento quantitativo e na estimativa da sensibilidade da hibridização uma vez que encontram-se representados nas lâminas utilizadas. Após a hibridização, as lâminas são lavadas para retirada das moléculas não hibridizadas, e em seguida é realizada a marcação com o conjugado Cy5 – streptavidina. Após lavagem, as lâminas são analisadas no Gene Pix Array Scanner. A obtenção dos dados refere-se à análise de imagem de cada lâmina para a extração dos valores de intensidade fluorescente em cada *spot*, os quais são medidas indiretas da abundância de transcritos de RNA dos genes representados pelas sondas. Para a normatização dos valores de expressão gênica foi utilizada regressão não-paramétrica denominada LOWESS. Esta estabiliza a relação entre o logaritmo da razão de intensidades e a média do logaritmo das intensidades em cada array. Na seqüência, a significância entre genes diferentemente expressos entre os dois momentos que compreendem a estudo, pré- e pós-treinamento físico foi analisada utilizando-se da técnica de análise de variância (ANOVA) para dados de *microarray*.

### **Avaliação da Capacidade Funcional Cardiorrespiratória**

A avaliação da capacidade cardiorrespiratória foi realizada no início e após 18 semanas de treinamento físico de predominância aeróbia. Todos os voluntários foram submetidos a teste ergoespirométrico, com um protocolo de rampa, em esteira ergométrica (Quinton Instruments Company, Seattle, Washington). O teste ergoespirométrico foi precedido de um eletrocardiograma de repouso, com o registro de doze derivações simultâneas, realizado em ambiente com ar condicionado e temperatura controlada (21°C), pelo menos duas horas após uma refeição leve. A avaliação foi realizada em um sistema computadorizado (Sensor Medics, modelo Vmax 229, Buena Vista, CA, USA), para medida direta do consumo de oxigênio (VO<sub>2</sub>) pico, antes de iniciar o protocolo de treinamento e ao final deste período. Após posicionamento na esteira, os examinados são acoplados a uma válvula com transdutor de volume, ao mesmo tempo em que é realizada preensão nasal por meio de prendedor apropriado, para que os gases expirados sejam coletados continuamente por intermédio da referida válvula. A ventilação (VE), fração expirada de oxigênio (O<sub>2</sub>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) são medidas a cada ciclo respiratório

através de sensores. A partir das análises da VE e das concentrações dos gases expirados, são calculados o  $VO_2$  e a produção de dióxido de carbono. A determinação do  $VO_2$  pico foi feita considerando-se o  $VO_2$  obtido no pico do exercício, quando o paciente se encontra em exaustão e não mais consegue manter o ritmo da corrida imposto pela esteira.

### **Determinação do Limiar Anaeróbio e Ponto de Compensação Respiratória**

Além da determinação da capacidade funcional máxima, são determinados o limiar anaeróbio (LA) e o ponto de compensação respiratória (PCR) que são utilizados para a prescrição individualizada da intensidade de treinamento físico. O LA é considerado no minuto em que o paciente apresentar os valores de equivalente ventilatório de oxigênio ( $VE/VO_2$ ) e pressão parcial de oxigênio no final da expiração ( $PetO_2$ ) mais baixos, antes destes valores iniciarem um aumento progressivo, além do incremento não linear do valor de razão de troca respiratória (RER). O PCR é considerado no minuto em que o paciente apresentar os valores de equivalente ventilatório de gás carbônico ( $VE/VCO_2$ ) mais baixos, antes de iniciarem um aumento progressivo, além dos valores de pressão parcial de gás carbônico no final da expiração ( $PetCO_2$ ) mais altos, antes de começarem a diminuir.<sup>23</sup> Todos foram encorajados a realizar o exercício progressivo máximo até que sintomas como dispnéia, fadiga intensa ou dor muscular os tornarem inábeis para a continuação do teste. O esforço também foi interrompido na presença de arritmias complexas ou sinais de isquemia miocárdica. O período de recuperação foi de quatro minutos, numa velocidade de duas milhas por hora, com a esteira a zero grau de inclinação. A pressão arterial e a frequência cardíaca foram monitoradas durante todo o teste ergoespirométrico. A pressão arterial foi aferida pelo método auscultatório, utilizando-se um esfigmomanômetro de coluna de mercúrio. As aferições foram realizadas no repouso e a cada dois minutos de exercício e no primeiro, segundo e quarto minutos da recuperação. A frequência cardíaca foi continuamente monitorada pelo sinal eletrocardiográfico e registrada ao final de cada minuto do exercício e recuperação.

### **Protocolo de Treinamento Físico**

O treinamento físico foi realizado em pista de atletismo no Centro de Formação de Soldados “Coronel Eduardo Assumpção”, situado na Av. Dr. Felipe Pinel, 2859 – Pirituba – São Paulo/SP. O período de treinamento físico foi de 18 semanas (4,5 meses), com três sessões semanais de duração de 60 a 90 minutos. Cada sessão de treinamento consistirá em:

- Aquecimento: caminhada por cinco minutos;
- Alongamento: priorizando os membros inferiores, que são mantidos na posição de alongamento por 15 segundos, com duração total de cinco minutos;
- Exercícios de resistência muscular localizada: exercícios de caráter técnico/educativo para corrida, somados aos exercícios militares de rotina como flexão de tronco ou exercício abdominal, flexão de braços e barra fixa, com duração de dez a 15 minutos;
- Corrida: de 60 minutos de corrida com frequência cardíaca correspondente à zona alvo de treinamento físico. O controle da intensidade de treinamento foi individual e realizado com a utilização de frequencímetro cardíaco;
- Alongamentos finais: priorizando os membros inferiores que são mantidos na posição de alongamento por 20 segundos, com duração de cinco a dez minutos;

O treinamento físico de corrida foi aplicado em grupo, porém respeitando a faixa intermediária das frequências cardíacas correspondentes aos limiares ventilatórios individuais, determinados por teste cardiopulmonar. Na Fase I (1ª à 9ª semana) o treinamento físico foi de caráter progressivo em relação ao volume (tempo de corrida para cada sessão, em minutos). Cada sessão foi iniciada com 30 minutos de duração, progredindo até 60 minutos na oitava semana. (progressão de aproximadamente 10% a cada semana). Nesta fase, o treinamento físico de corrida foi conduzido numa intensidade correspondente ao Limiar Anaeróbio (LA) e monitorado por frequência cardíaca (monitor cardíaco marca Polar, modelo A1). Na Fase II (9ª a 10ª ou 20ª. semana), o volume da corrida foi mantido em 60 minutos, mas com uma progressão da intensidade do treinamento físico. Nesta fase a frequência cardíaca de treinamento corresponde ao ponto de compensação respiratório (PCR). Nesta Fase II, em uma ou duas sessões de treinamento físico

realizado por semana, a frequência cardíaca pode ultrapassar a frequência cardíaca correspondente ao PCR.

### **Análise Estatística**

Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM. Para as características demográficas, parâmetros metabólicos e mensurações basais de fluxo sanguíneo no antebraço, pressão arterial média, condutância vascular no antebraço e atividade nervosa simpática muscular, foi utilizado *one-way* ANOVA. Para as respostas ao exercício de *handgrip*, fluxo sanguíneo no antebraço, pressão arterial média, condutância vascular no antebraço e atividade nervosa simpática muscular, foi utilizado *two-way* ANOVA. Quando foi encontrada interação utilizou-se o teste de Scheffé's *post-hoc*. Valores de probabilidade  $<0.05$  foram considerados significantes.

Para os dados de microarray, após a sumarização e normalização dos dados por RMA (*Robust Multchip Analysis*), a diferença de expressão foi detectada em *dChip* (*p* valor menor ou igual a 0.05 e um *fold change* de 1.1 (10%)).



## **RESULTADOS**

### **Distribuição dos Alelos**

As frequências alélica e genotípica dos duzentos e oitenta e sete indivíduos genotipados para o polimorfismo G894T do gene da eNOS estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e são similares à distribuição verificada num estudo prévio realizado com a população brasileira (Pereira et al. 2005). A frequência encontrada para os alelos G e T foi de 71.3% e 28.7%, respectivamente. A frequência encontrada para os genótipos GG, GT e TT foi de 51.2%, 40.1% e 8.7%, respectivamente.

### **Medidas Basais**

Na Tabela 1 estão representadas por genótipo as características demográficas e metabólicas dos trinta e três indivíduos avaliados no estudo. Idade, gênero, peso, altura e índice de massa corporal foram similares entre os indivíduos codificados como GG, GT e TT. Da mesma maneira, glicemia, colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, VLDL-colesterol e triacilglicerol foram similares entre os genótipos.

As variáveis hemodinâmicas e neurovasculares basais estão apresentadas na Tabela 2. Entre os genótipos GG, GT e TT não houve diferença nos valores de frequência cardíaca, pressão arterial média, fluxo sanguíneo no antebraço e condutância vascular no antebraço.

Tabela 1 – Variáveis demográficas e metabólicas em 33 indivíduos codificados como GG, GT e TT para o gene da eNOS.

	GG	GT	TT	<i>p</i>
<i>n</i>	15	9	9	
Idade, anos	43 ± 3	41 ± 3	40 ± 4	0.76
Sexo, M/F	3/12	3/6	3/6	0.71
Peso, kg	60.2 ± 1.5	68.0 ± 2.4	61.6 ± 3.9	0.08
Altura, cm	162 ± 0.02	170 ± 0.03	161 ± 0.03	0.10
IMC, kg/m <sup>2</sup>	22.9 ± 0.3	23.7 ± 1.0	23.5 ± 0.9	0.63
Tabagismo, <i>n</i>	0	0	0	0.88
Glicose, mg/dL	92 ± 2	92 ± 4	84 ± 3	0.11
Colesterol Total, mg/dL	193 ± 10	177 ± 10	193 ± 7	0.48
LDL-colesterol, mg/dL	123 ± 8	121 ± 9	128 ± 6	0.86
HDL-colesterol, mg/dL	50 ± 3	41 ± 2	47 ± 3	0.13
VLDL-colesterol, mg/dL	20 ± 3	17 ± 3	17 ± 3	0.67
Triacilglicerol, mg/dL	87 ± 7	87 ± 13	84 ± 13	0.97

Valores apresentados como média ± EPM. M, masculino; F, feminino; IMC, índice de massa corporal. One-way ANOVA.

Tabela 2 - Valores basais e alterações absolutas da frequência cardíaca, pressão arterial média, fluxo sanguíneo no antebraço e condutância vascular no antebraço durante o exercício moderado de *handgrip* a 30% da máxima contração voluntária em 33 indivíduos codificados como GG, GT e TT para o gene da eNOS.

		<b>Variáveis hemodinâmicas</b>			
		<b>Basal</b>	<b>Exercício</b>		
			<b>1 min</b>	<b>2 min</b>	<b>3 min</b>
<b>FC, bpm</b>	GG	69±2	3±1‡	6±1‡	10±1‡
	GT	69±4	4±1	7±2	11±1
	TT	63±3	4±1	8±2	12±1
<b>PAM, mmHg</b>	GG	91±3	3±1	8±2‡	15±2‡
	GT	94±2	1±1	8±2	12±2
	TT	95±3	3±1	9±2	14±2
		<b>Variáveis neurovasculares</b>			
		<b>Basal</b>	<b>Exercício</b>		
			<b>1 min</b>	<b>2 min</b>	<b>3 min</b>
<b>FSA, mL.min<sup>-1</sup>.100 mL<sup>-1</sup></b>	GG	1.81±0.09	0.32±0.06	0.54±0.07♦	0.87±0.08♦
	GT	1.80±0.23	0.48±0.17	0.66±0.21♦	0.89±0.24♦
	TT	1.79±0.17	0.02±0.02	0.14±0.05†	0.31±0.12†
<b>CVA, unidades</b>	GG	2.03±0.12	0.29±0.09	0.41±0.10♦	0.57±0.09♦
	GT	1.90±0.24	0.46±0.16	0.52±0.20♦	0.64±0.21♦
	TT	1.89±0.17	-0.03±0.03	-0.02±0.08†	0.07±0.14†

FC= frequência cardíaca; PAM= pressão arterial média; FSA= fluxo sanguíneo no antebraço; CVA= condutância vascular no antebraço. Valores apresentados como média ± EPM. ♦ diferente do basal; † diferente dos genótipos GG e GT; ‡ ambos os

genótipos diferente do basal. *Two-way ANOVA* seguido de *Scheffé's post-hoc*.  $P < 0.05$

### **Respostas Hemodinâmicas e Neurovasculares Durante o Exercício**

O comportamento das variáveis hemodinâmicas e neurovasculares em resposta ao exercício estão apresentados na Tabela 2. Durante o exercício isométrico, a frequência cardíaca aumentou progressivamente e de forma significativa entre os genótipos GG, GT e TT, não havendo diferença entre eles. Este mesmo resultado foi observado na pressão arterial média. Durante o exercício isométrico, a pressão arterial média aumentou progressivamente e de forma semelhante entre os genótipos. As respostas reflexas de fluxo sanguíneo no antebraço e condutância vascular no antebraço ao exercício dos indivíduos com genótipo GG, GT e TT estão representadas na Figura 3. Durante o exercício isométrico o fluxo sanguíneo no antebraço contralateral aumentou progressivamente e de forma significativa nos

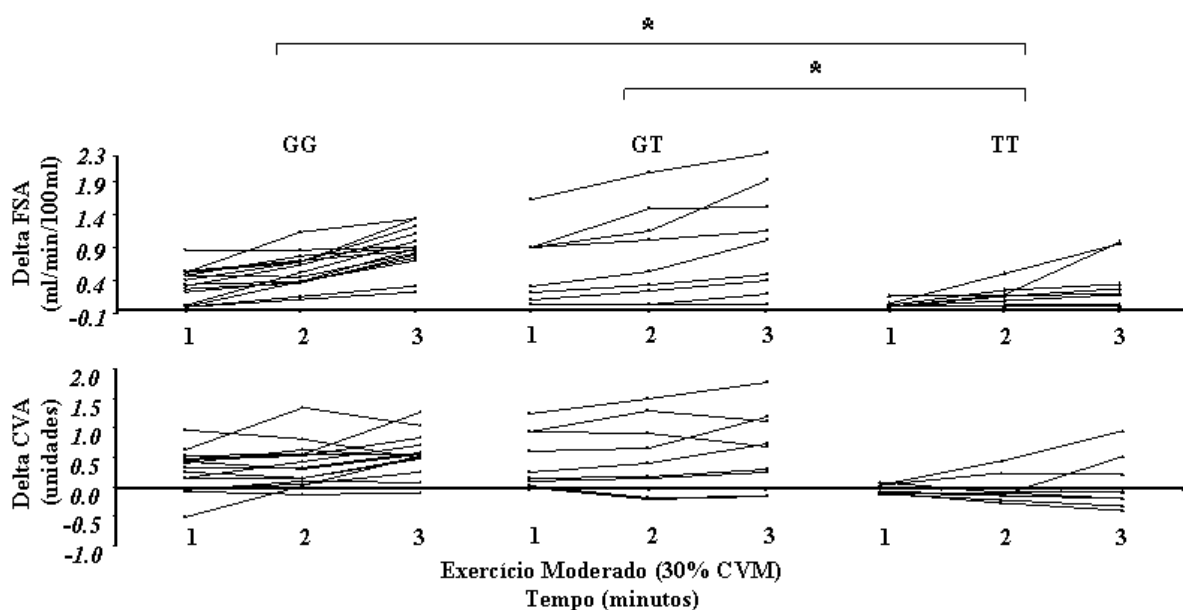


Figura 3 – Comportamento individual da resposta (variação absoluta) reflexa do fluxo sanguíneo no antebraço (FSA) e condutância vascular no antebraço (CVA) ao exercício de *handgrip* a 30% da contração voluntária máxima (CVM) em indivíduos codificados com GG, GT e TT para o gene da eNOS. Observe que a resposta do FSA e da CVA são significativamente menores no genótipo TT quando comparado aos genótipos GG e GT. Comportamento individual da resposta (variação absoluta) reflexa do fluxo sanguíneo no antebraço (FSA) e condutância vascular no antebraço (CVA) ao exercício de *handgrip* a 30% da contração voluntária máxima (CVM) em indivíduos codificados com GG, GT e TT para o gene da eNOS. Observe que a resposta do FSA e da CVA são significativamente menores no genótipo TT quando comparado aos genótipos GG e GT. *Two-way ANOVA* seguido de *Scheffé's post-hoc*.  $P < 0.05$

genótipos GG e GT. Em contraste, o fluxo sanguíneo no antebraço aumentou levemente nos indivíduos com genótipo TT. A comparação entre os genótipos mostrou que o aumento no fluxo sanguíneo no antebraço foi significativamente maior no genótipo GG e GT, quando comparado ao genótipo TT. Valores similares aos de fluxo sanguíneo no antebraço foram encontrados quando a variável analisada foi a condutância vascular no antebraço. Durante o exercício isométrico a condutância vascular no antebraço contralateral aumentou progressivamente e de forma significativa entre os genótipos GG e GT sendo que este aumento ocorreu de forma atenuada no genótipo TT. A comparação entre os genótipos mostrou que o aumento

na condutância vascular no antebraço foi significativamente maior no genótipo GG e GT, quando comparado ao genótipo TT.

### **Medidas Basais com Infusão de Drogas Vasoativas**

Os valores basais de frequência cardíaca e pressão arterial média durante as três sequencias de infusão estão apresentados na Tabela 3 e os valores basais de fluxo sanguíneo no antebraço, condutância vascular no antebraço e atividade nervosa simpática muscular na Tabela 4. A infusão de L-NMMA e L-NMMA + fentolamina não alterou a frequência cardíaca, a pressão arterial média e a atividade nervosa simpática muscular nos dois genótipos estudados. Os valores basais de fluxo sanguíneo no antebraço não foram diferentes entre os genótipos GG e TT. A infusão de L-NMMA reduziu o fluxo sanguíneo no antebraço, em média, 22% nos indivíduos com genótipo GG e 23% nos indivíduos com genótipo TT (Tabela 4; Figura 4). A infusão do L-NMMA associado à fentolamina aumentou o fluxo sanguíneo no antebraço, em média, 51% nos indivíduos com genótipo GG e 38% nos indivíduos com genótipo TT, quando comparado à infusão de salina. Quando comparado à infusão de L-NMMA, a infusão de L-NMMA associado à fentolamina aumentou o fluxo sanguíneo no antebraço, em média, 92% ( $p < 0.05$ ) nos indivíduos com genótipo GG e 80% ( $p < 0.05$ ) nos indivíduos com genótipo TT (Figura 4).

Os valores basais de condutância vascular no antebraço não foram diferentes entre os genótipos GG e TT nas três sequencias. A infusão de L-NMMA reduziu a condutância vascular no antebraço, em média, 23% nos indivíduos com genótipo GG e 24% nos indivíduos com genótipo TT. A infusão do L-NMMA associado à fentolamina aumentou a condutância vascular no antebraço, em média, 44% nos indivíduos com genótipo GG e 36% nos indivíduos com genótipo TT.

Quando comparado à infusão de L-NMMA, a infusão de L-NMMA associado à fentolamina aumentou a condutância vascular no antebraço, em média, 87% nos indivíduos com genótipo GG ( $p < 0.05$ ) e 79% nos indivíduos com genótipo TT (Figura 4).

Tabela 3 - Valores basais e alterações absolutas da frequência cardíaca e da pressão arterial média durante o exercício moderado de *handgrip* a 30% da máxima contração voluntária com infusão de salina, L-NMMA e L-NMMA associado à fentolamina em indivíduos codificados com GG (n=8) e TT (n=7) para o gene da eNOS.

		<b>Frequência cardíaca, bpm</b>			
		<b>Basal</b>	<b>Exercício</b>		
			<b>1 min</b>	<b>2 min</b>	<b>3 min</b>
<b>Salina</b>	GG	70 ± 4	3±1 <sup>‡</sup>	6±2 <sup>‡</sup>	4±1 <sup>‡</sup>
	TT	73 ± 3	6±1	10±2	7±3
<b>L-NMMA</b>	GG	68 ± 4	5±1 <sup>‡</sup>	9±2 <sup>‡</sup>	7±2 <sup>‡</sup>
	TT	73 ± 2	8±2	8±2	5±2
<b>L-NMMA + fentolamina</b>	GG	69 ± 5	9±2 <sup>‡</sup>	13±4 <sup>‡</sup>	11±3 <sup>‡</sup>
	TT	73 ± 2	9±1	9±3	6±3

		<b>Pressão arterial média, mmHg</b>			
		<b>Basal</b>	<b>Exercício</b>		
			<b>1 min</b>	<b>2 min</b>	<b>3 min</b>
<b>Salina</b>	GG	86 ± 4	6±1 <sup>‡</sup>	10±2 <sup>‡</sup>	11±2 <sup>‡</sup>
	TT	85 ± 6	8±3	12±2	9±3
<b>L-NMMA</b>	GG	87 ± 3	7±1 <sup>‡</sup>	14±2 <sup>‡</sup>	10±2 <sup>‡</sup>
	TT	87 ± 7	11±3	14±3	8±4
<b>L-NMMA + fentolamina</b>	GG	89 ± 3	8±2 <sup>‡</sup>	14±2 <sup>‡</sup>	10±2 <sup>‡</sup>
	TT	90 ± 7	12±3	13±3	6±4

Valores apresentados como média ± EPM. ‡ ambos os genótipos diferente do basal. Two-way ANOVA seguido de *Scheffé's post-hoc*.  $P < 0.05$

### Respostas Hemodinâmicas e Neurovasculares Durante o Exercício com Infusão de Drogas Vasoativas

Os valores das variáveis frequência cardíaca e pressão arterial média em resposta ao exercício estão apresentados na Tabela 3 e os valores das variáveis fluxo sanguíneo no antebraço, condutância vascular no antebraço e atividade nervosa simpática muscular em resposta ao exercício na Tabela 4. A infusão de salina, L-NMMA e L-NMMA + fentolamina não alterou o comportamento da frequência cardíaca, pressão arterial média e atividade nervosa simpática muscular nos genótipos GG e TT. Durante o exercício isométrico, a frequência cardíaca aumentou de forma significativa nos genótipos GG e TT, não havendo diferença entre eles (Figura 5). Este mesmo resultado foi observado na pressão arterial média. Durante o exercício isométrico, a pressão arterial média aumentou de forma significativa em

ambos os genótipos, sendo o comportamento semelhante entre eles (Figura 5). A atividade nervosa simpática muscular aumentou de forma significativa durante o exercício isométrico nos genótipos GG e TT, não havendo diferença entre eles (Figura 6).

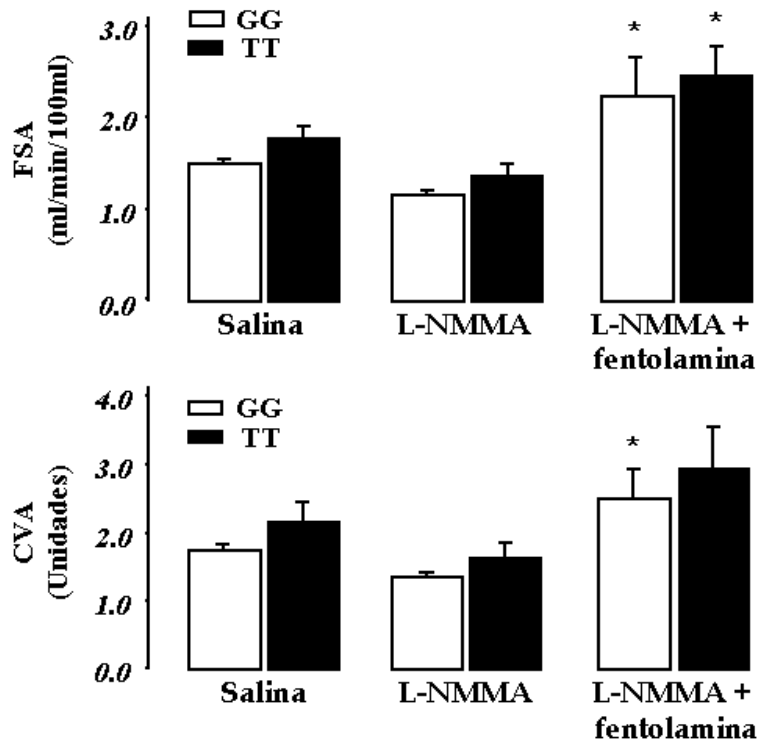


Figura 4 – Valores basais de fluxo sanguíneo no antebraço (FSA) e condutância vascular no antebraço (CVA) durante a infusão de salina, L-NMMA e L-NMMA + fentolamina em indivíduos codificados com GG (n=8) e TT (n=7) para o gene da eNOS. \* vs. L-NMMA. *One-way ANOVA. P<0.05.*

Durante a infusão de salina, o fluxo sanguíneo no antebraço contralateral aumentou progressivamente e de forma significativa no genótipo GG em resposta ao exercício isométrico. Em contraste, o fluxo sanguíneo no antebraço aumentou levemente nos indivíduos com genótipo TT (Figura 7). A comparação entre os genótipos mostrou que o aumento no fluxo sanguíneo no antebraço foi significativamente maior no genótipo GG quando comparado ao genótipo TT. Estes dados reproduzem os resultados previamente encontrados no Protocolo I. Durante a infusão do L-NMMA, o fluxo sanguíneo no antebraço contralateral não se alterou no genótipo TT em resposta ao exercício isométrico. No entanto, o fluxo sanguíneo no antebraço

contralateral foi significativamente reduzido no genótipo GG (em média 68% - valor de pico) para valores similares aos valores de fluxo sanguíneo no antebraço do genótipo TT. Durante a infusão do L-NMMA associado à fentolamina, o fluxo sanguíneo no antebraço contralateral aumentou simultaneamente em ambos os genótipos estudados (Figura 7).

Tabela 4 - Valores basais e alterações absolutas do fluxo sanguíneo no antebraço, condutância vascular no antebraço e atividade nervosa simpática muscular durante o exercício moderado de *handgrip* a 30% da máxima contração voluntária com infusão de salina, L-NMMA e L-NMMA associado à fentolamina em indivíduos codificados com GG (n=8) e TT (n=7) para o gene da eNOS.

<b>Fluxo sanguíneo no antebraço, ml.min<sup>-1</sup>.100 ml<sup>-1</sup></b>					
		<b>Basal</b>	<b>Exercício</b>		
			<b>1 min</b>	<b>2 min</b>	<b>3 min</b>
<b>Salina</b>	GG	1.48 ± 0.07	0.65±0.11 <sup>♦</sup>	0.84±0.11 <sup>♦</sup>	0.81±0.11 <sup>♦</sup>
	TT	1.77 ± 0.14	0.13±0.13 <sup>†</sup>	0.26±0.16 <sup>†</sup>	0.16±0.18 <sup>†</sup>
<b>L-NMMA</b>	GG	1.16 ± 0.04	0.18±0.08	0.23±0.09	0.26±0.08
	TT	1.36 ± 0.13	0.12±0.08	0.16±0.11	0.08±0.12
<b>L-NMMA + fentolamina</b>	GG	2.23 ± 0.42 <sup>*</sup>	0.55±0.20 <sup>‡</sup>	1.03±0.24 <sup>‡</sup>	1.42±0.30 <sup>‡</sup>
	TT	2.44 ± 0.33 <sup>*</sup>	0.35±0.20	0.78±0.28	0.80±0.13

<b>Condutância vascular no antebraço, unidades</b>					
		<b>Basal</b>	<b>Exercício</b>		
			<b>1 min</b>	<b>2 min</b>	<b>3 min</b>
<b>Salina</b>	GG	1.73 ± 0.10	0.59±0.11 <sup>♦</sup>	0.71±0.11 <sup>♦</sup>	0.79±0.14 <sup>♦</sup>
	TT	2.15 ± 0.29	-0.07±0.23 <sup>†</sup>	-0.05±0.26 <sup>†</sup>	-0.05±0.20 <sup>†</sup>
<b>L-NMMA</b>	GG	1.34 ± 0.06	0.08±0.09	0.04±0.09	0.14±0.09
	TT	1.63 ± 0.23	-0.07±0.16	-0.11±0.21	-0.09±0.18
<b>L-NMMA + fentolamina</b>	GG	2.50 ± 0.42 <sup>*</sup>	0.40±0.21 <sup>‡</sup>	0.67±0.19 <sup>‡</sup>	1.16±0.26 <sup>‡</sup>
	TT	2.92 ± 0.64	-0.07±0.23	0.26±0.50	0.56±0.24

<b>Atividade nervosa simpática muscular, disparos/min.</b>					
		<b>Basal</b>	<b>Exercício</b>		
			<b>1 min</b>	<b>2 min</b>	<b>3 min</b>
<b>Salina</b>	GG (n=4)	13 ± 4	2±1	5±1 <sup>‡</sup>	8±2 <sup>‡</sup>
	TT (n=7)	18 ± 5	3±1	6±2	11±2
<b>L-NMMA</b>	GG	16 ± 4	3±2	6±2 <sup>‡</sup>	9±6 <sup>‡</sup>
	TT	18 ± 4	4±2	7±3	12±3
<b>L-NMMA + fentolamina</b>	GG	16 ± 4	6±3	6±2 <sup>‡</sup>	14±5 <sup>‡</sup>
	TT	19 ± 5	5±2	9±5	10±2

Valores apresentados como média ± EPM. \* vs. infusão de L-NMMA; ♦ diferente do basal; † diferente do genótipo GG; ‡ ambos os genótipos diferente do basal. Two-way ANOVA seguido de *Scheffé's post-hoc*.  $P < 0.05$ .



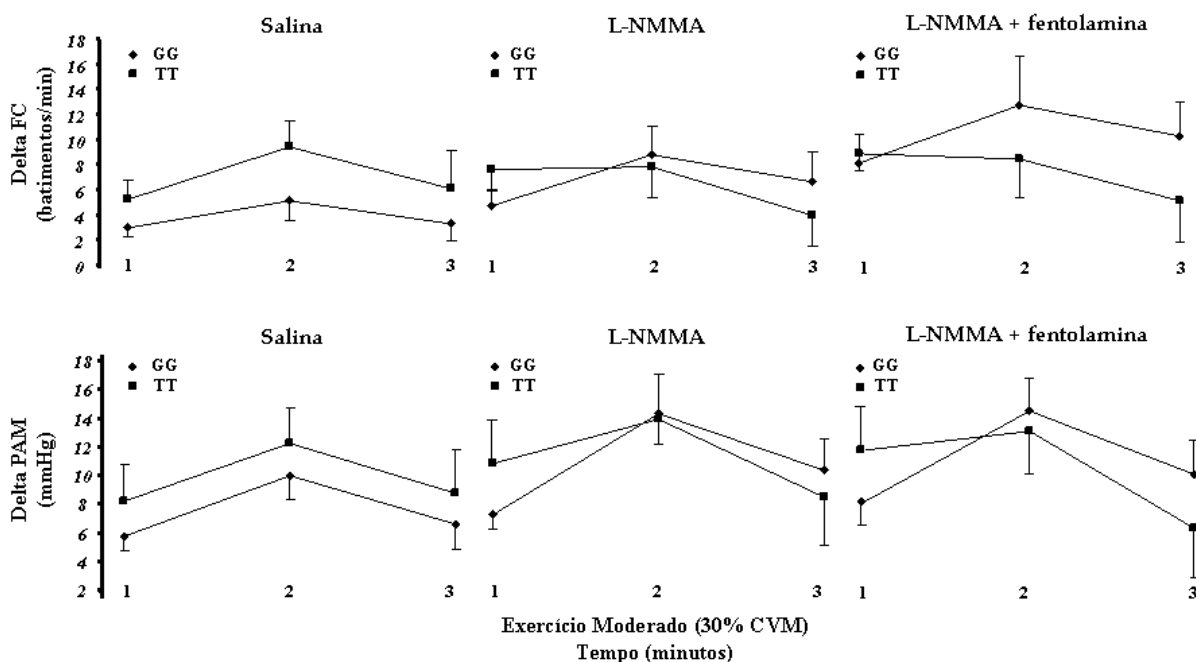


Figura 5 – Comportamento (variação absoluta) da frequência cardíaca (FC) e da pressão arterial média (PAM) em resposta ao exercício de *handgrip* a 30% da contração voluntária máxima (CVM) com infusão de salina, L-NMMA e L-NMMA associado à fentolamina em indivíduos codificados com GG (n=8) e TT (n=7) para o gene da eNOS.

Valores similares aos de fluxo sanguíneo no antebraço foram encontrados quando a variável analisada foi a condutância vascular no antebraço. Durante a infusão de salina, a condutância vascular no antebraço contralateral aumentou progressivamente e de forma significativa no genótipo GG em resposta ao exercício isométrico. Em contraste, a condutância vascular no antebraço aumentou levemente nos indivíduos com genótipo TT (Figura 7). A comparação entre os genótipos mostrou que o aumento na condutância vascular no antebraço foi significativamente maior no genótipo GG quando comparado ao genótipo TT. Durante a infusão do L-NMMA, a condutância vascular no antebraço contralateral não se alterou no genótipo TT em resposta ao exercício isométrico. No entanto, a condutância vascular no antebraço contralateral foi significativamente reduzida no genótipo GG (em média 82% - valor de pico) para valores similares aos valores de condutância vascular no antebraço do genótipo TT. Durante a infusão do L-NMMA associado à fentolamina, a CVA contralateral aumentou simultaneamente em ambos os genótipos estudados, não havendo diferença entre eles (Figura 7). As respostas de

atividade nervosa simpática muscular foram semelhantes entre os dois genótipos estudados, tanto com a infusão de L-NMMA quanto com a infusão do L-NMMA associado à fentolamina (Figura 6).

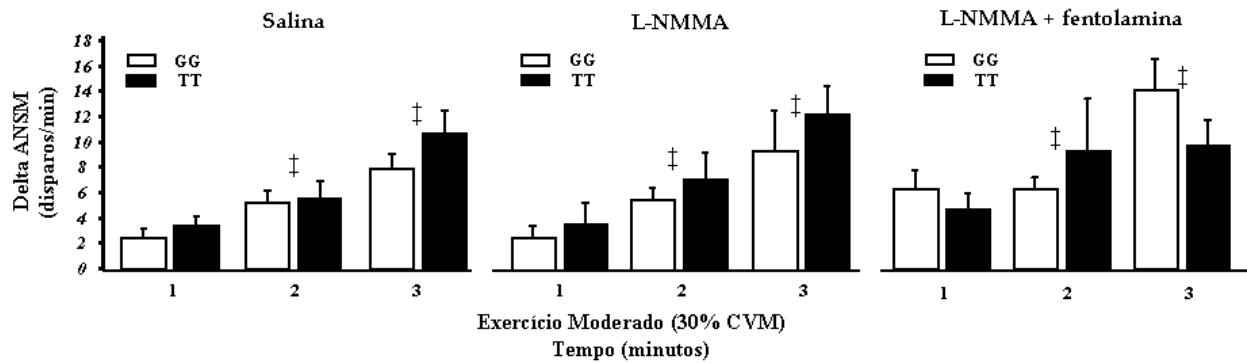


Figura 6 – Comportamento (variação absoluta) da atividade nervosa simpática muscular (ANSM) em resposta ao exercício de *handgrip* a 30% da contração voluntária máxima (CVM) com infusão de salina, L-NMMA e L-NMMA associado à fentolamina em indivíduos codificados com GG e TT para o gene da eNOS. ‡ ambos os genótipos diferente do basal. *Two-way ANOVA* seguido de *Scheffé's post-hoc*.  $P < 0.05$ .

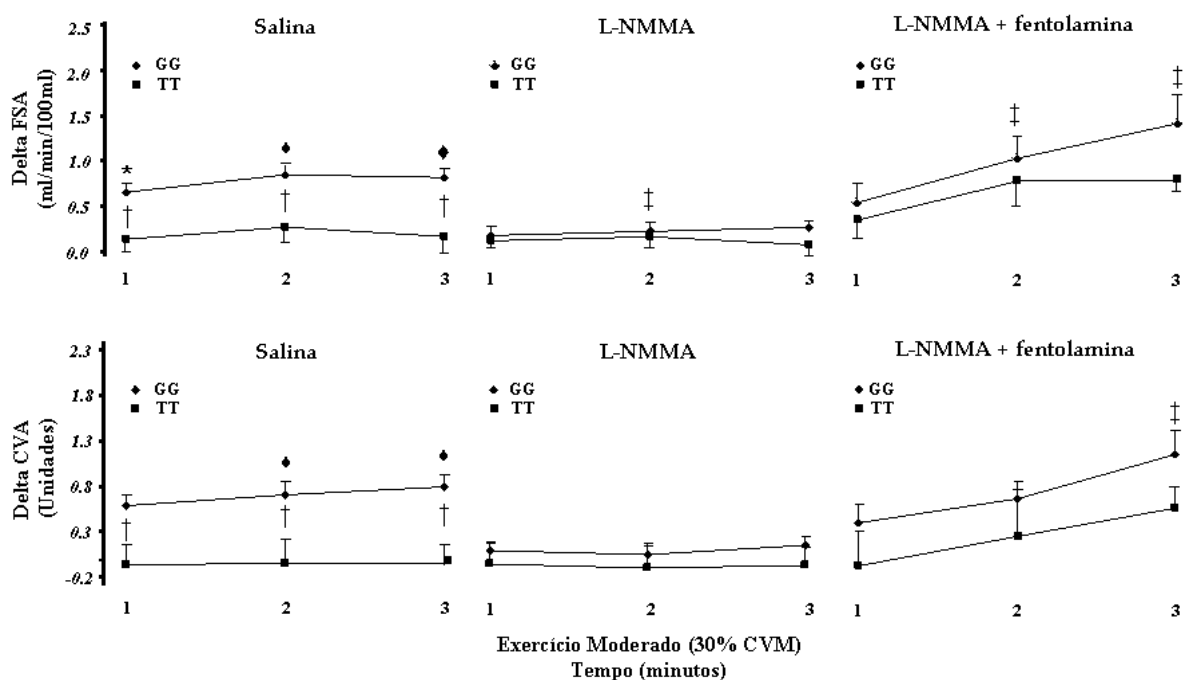


Figura 7 – Comportamento (variação absoluta) do fluxo sanguíneo no antebraço (FSA) e condutância vascular no antebraço (CVA) em resposta ao exercício de handgrip a 30% da contração voluntária máxima (CVM) com infusão de salina, L-NMMA e L-NMMA associado à fentolamina em indivíduos codificados com GG (n=8) e TT (n=7) para o gene da eNOS. ♦ diferente do basal; † diferente do genótipo GG; ‡ ambos os genótipos diferente do basal. *Two-way* ANOVA seguido de *Scheffé's post-hoc*.  $P < 0.05$ .

### Transcriptoma Responsivo ao Treinamento Físico

O transcriptoma responsivo ao treinamento físico está representado na Figura 8. Dentre os 28.869 transcritos analisados e representativos do genoma completo, 2445 mostraram-se diferentemente expressos ( $p < 0.05$ ) em resposta ao treinamento físico (dados não mostrados). Destes, 121 apresentaram alteração de 10% ou mais (fold change 1.1), dos quais 62 sofreram *downregulation* e 59 *upregulation*. Quando este painel de 121 transcritos é visualizado por cluster hierárquico para transcritos e indivíduos (Figura 8), observe que: 1) os transcritos que sofreram *downregulation* (vermelho para verde) ficaram dispostos na parte inferior no *heatmap*, enquanto aqueles que sofreram *upregulation* (verde para vermelho) ficaram dispostos na parte superior do *heatmap*; 2) os indivíduos no pré-treinamento ficaram dispostos do lado

direito do *heatmap* enquanto que no pós-treinamento, os mesmos ficaram dispostos no lado esquerdo no *heatmap*. Interessantemente, os indivíduos “a” e “b” não mostraram alterações expressivas de expressão gênica no pós-treinamento, fato este passível de observação por suas permanências dentro do cluster representativo do pré-treinamento.

***OBS. Como consequência do alto volume de anotações gerados para cada um dos genes identificados, a partir do software de análise, estes dados são comumente apresentados em material suplementar. A disponibilização destes dados neste projeto com páginas limitadas ultrapassaria o limite permitido. As informações sobre as anotações na íntegra podem ser solicitadas.***

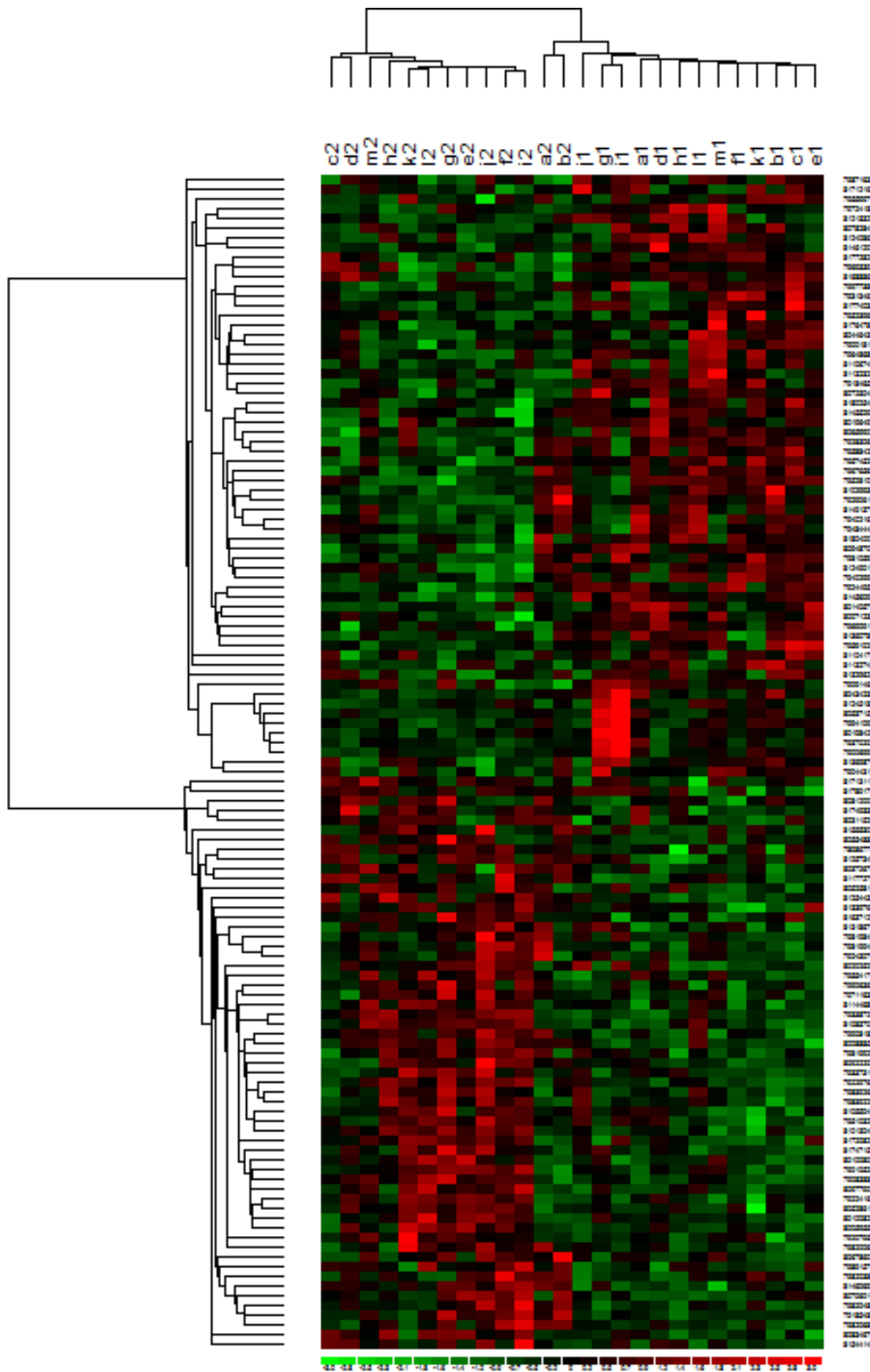


Figura 8 – Heatmap representativo de transcritos diferentemente expressos ( $p \leq 0.05$ ; Fold change 1.1). As letras de “a” a “m” representam os 13 indivíduos no pré- “1” e no pós-treinamento “2”. Dos 121 transcritos representados (números (ID) dispostos do lado direito do painel), 62 sofreram *downregulation* (vermelho para verde) e 59 *upregulation* (verde para vermelho).

## DISCUSSÃO

O primeiro e relevante resultado do presente estudo é que o polimorfismo G894T do gene da eNOS está funcionalmente associado a uma diminuída vasodilatação muscular reflexa durante o exercício isométrico de *handgrip*. No entanto, esta diminuída resposta vasodilatadora reflexa só foi observada na presença dos dois alelos mutantes (TT), uma vez que a resposta vasodilatadora reflexa no genótipo GT mostrou-se semelhante à observada no genótipo GG. No genótipo heterozigoto (GT), a presença do alelo G894 parece ser suficiente para compensar a possível deficiência do alelo T894, sugerindo um aumento da transcrição do gene e/ou um aumento da atividade enzimática da eNOS. Além disso, os presentes resultados fornecem suficientes evidências de que a prejudicada vasodilatação muscular reflexa induzida pelo exercício não pode ser atribuída a diferenças no tráfego simpático vasoconstritor, uma vez que a atividade nervosa simpática muscular foi semelhante entre os genótipos. Finalmente, os resultados sugerem que a diminuída vasodilatação muscular reflexa observada no genótipo TT é mediada por uma redução na biodisponibilidade de NO, podendo afetar a variabilidade fenotípica do sistema músculo esquelético em atletas.

Estudos prévios têm demonstrado o envolvimento do NO na modulação de inúmeros fenótipos cardiovasculares e o alelo T894 do gene da eNOS tem sido associado ao desenvolvimento de hipertensão arterial (Miyamoto et al., 1998; Lacolley et al., 1998), infarto agudo do miocárdio (Hibi et al., 1998), espasmo coronário induzido por acetilcolina (Yoshimura et al., 1998), disfunção vasomotora coronariana (Naber et al., 2001), reduzida geração de vasos colaterais na oclusão coronariana crônica (Lamblin et al., 2005) e reestenose pós-stent coronário (Suzuki et al., 2002). Os resultados do presente estudo estendem o conhecimento para o fato de que o alelo T894 em homozigose altera a função endotelial durante manobras fisiológicas em indivíduos saudáveis. Esta observação sugere que portadores do genótipo TT podem apresentar maior susceptibilidade à patologias cardiovasculares uma vez que uma resposta vasodilatadora reflexa diminuída ao exercício pode caracterizar uma disfunção endotelial. Em adição, a menor biodisponibilidade do NO pode aumentar a susceptibilidade a lesão no esporte e dificultar a recuperação pós lesão, uma vez que o NO está comprovadamente envolvido na regulação da geração de força muscular e na recuperação de lesões

do músculo esquelético. Foi verificado aumento de 30% na produção basal de NO após lesão causada por consecutivas contrações excêntricas (Rádak et al., 1999), porém esta biodisponibilidade aumentada pode estar reduzida em portadores do genótipo TT, resultando em alterações no tempo de recuperação e também no reparo da região lesada.

Em condições basais e durante manobras fisiológicas, incluindo o exercício físico, a reatividade vascular obedece ao comando antagônico das forças vasodilatadoras e vasoconstritoras. Embora este fenótipo obedeça ao controle de múltiplas vias de sinalização, parte da resposta vascular é mediada pela produção endotelial do NO e parte mediada pelo tono simpático vasoconstritor (Joyner & Dietz, 1997; Santos et al., 2005). Na condição de repouso, o NO participa da modulação do tônus vascular basal e o fluxo sanguíneo parece não ser afetado pela variante G894T do gene da eNOS. A infusão intra-arterial de L-NMMA reduziu o fluxo sanguíneo no antebraço, em média, 22% e essa redução foi semelhante entre os genótipos GG e TT. A infusão do L-NMMA associado à fentolamina, quando comparado à infusão do L-NMMA isoladamente, aumentou o fluxo sanguíneo no antebraço, em média, 86% e também de forma semelhante entre os genótipos. Estes resultados evidenciam que a restrição vasodilatadora mediada pelo tono vasoconstritor simpático é significativamente maior do que a vasodilatação NO-dependente na regulação do tônus vascular basal. Estudos prévios demonstraram que durante manobras fisiológicas a vasodilatação muscular é mediada, pelo menos em parte, pelo aumento da produção do NO (Dietz et al., 1997). Neste estudo, a resposta vasodilatadora reflexa diminuída ao exercício, observada no genótipo TT, não foi alterada com a infusão do L-NMMA. Em contraste, a infusão do L-NMMA aboliu a resposta vasodilatadora reflexa no genótipo GG para valores similares aos observados no genótipo TT, o que sugere que a resposta vasodilatadora muscular diminuída no genótipo TT é decorrente de uma menor biodisponibilidade de NO. Parece improvável que a vasodilatação muscular reflexa alterada no genótipo TT seja explicada por uma hiperatividade nervosa simpática. A mensuração da descarga eferente simpática, avaliada de forma direta pela técnica de microneurografia, mostrou que os níveis de atividade nervosa simpática muscular não são diferentes entre os genótipos. A noradrenalina liberada na fenda sináptica atua sobre os receptores alfa-adrenérgicos, mediadores da contração do músculo liso vascular. Dietz et al. (1997) e Eklund & Kaijser (1976) demonstraram que a

administração intra-arterial de antagonistas  $\alpha$ -adrenérgicos elimina virtualmente a vasoconstrição em leito muscular. Portanto, poderia ser questionado o fato de que, embora a atividade nervosa simpática muscular tenha mostrado ser semelhante entre os genótipos, uma alteração na expressão do gene do receptor alfa-adrenérgico e/ou alterações pós-transcricionais do mesmo poderia estar envolvidas na modulação das diferentes respostas entre os genótipos. Para excluir esta possibilidade, foi adotada a estratégia de duplo bloqueio, ou seja, a infusão do L-NMMA associado à fentolamina. Este procedimento provocou aumento semelhante na resposta vasodilatadora reflexa em ambos os genótipos. Assim, esses resultados reforçam a ideia de que a reduzida vasodilatação reflexa observada no genótipo TT é consequência de uma redução na biodisponibilidade do NO, mas não de uma atividade nervosa simpática aumentada.

A regulação da reatividade vascular obedece ao comando de múltiplas moléculas e estas, por sua vez, estão na dependência do controle de seus respectivos genes. A estimulação dos receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos do vaso induz o relaxamento do músculo liso vascular. Majmudar et al. (1999) demonstraram em humanos que parte desta vasodilatação é mediada pelo NO, uma vez que a administração do L-NMMA reduziu, em 25% a vasodilatação induzida por ritodrine. Em adição, variantes genéticas na via  $\beta$ -adrenérgica poderiam explicar parte da variabilidade encontrada no fenótipo de vasodilatação. Trombetta et al. (2003) verificaram que mulheres obesas e portadoras dos dois alelos Gly<sup>16</sup>/Glu<sup>27</sup> para o receptor  $\beta_2$ -adrenérgico, apresentavam vasodilatação muscular reflexa aumentada em resposta ao exercício. Estes resultados poderiam explicar, pelo menos em parte, a variabilidade na vasodilatação muscular reflexa quando os indivíduos são comparados dentro de cada genótipo (Figura 3). Esta variabilidade interindividual é passível de observação em fenótipos controlados por múltiplos genes, um fenômeno caracterizado como interação gene-gene.

O segundo relevante resultado do presente estudo é que leucócitos, como sensores biológicos do ambiente sistêmico, apresentam um transcriptoma responsivo a ciclos de contração e relaxamento do músculo esquelético, com uma “assinatura molecular” composta de 121 genes diferentemente expressos ( $p < 0.05$ ; fold change 1.1). A análise por cluster hierárquico permitiu verificar a existência de uma semelhança na expressão de um grupo de transcritos, entre indivíduos caracterizados como sedentários. Subsequentemente verificou-se, para este mesmo



grupo de transcritos, alterações semelhantes entre os indivíduos em resposta ao estímulo do treinamento físico. Interessantemente, embora tenha sido caracterizado um padrão na alteração de expressão destes transcritos numa amostra bastante homogênea (recrutas da Polícia Militar sob um mesmo regime de treinamento e estilo de vida), é evidente a variabilidade na resposta deste transcriptoma entre indivíduos. Este fato é caracterizado a partir da observação do comportamento do padrão transcricional dos indivíduos “a” e “b” que, diferentemente, não mostraram alterações expressivas de expressão gênica no pós-treinamento, fato este passível de observação por suas permanências dentro do cluster representativo do pré-treinamento. Estas diferenças de responsividade do transcriptoma a ciclos de contração e relaxamento do músculo esquelético são explicadas, pelo menos em parte, por variantes genéticas nestes 121 novos marcadores identificados. Estes novos marcadores identificados caracterizam-se, por sua vez, como potenciais preditores da susceptibilidade a lesões e da responsividade à terapêutica adotada.

### **Potenciais Limitações**

Embora os resultados alcançados permitam apontar a biodisponibilidade reduzida do NO como a causa da redução na vasodilatação muscular reflexa observada no genótipo TT, apenas especulações podem ser feitas com relação às possíveis formas de modulação do fenótipo pelo polimorfismo G894T do gene da eNOS. Até o momento, os potenciais mecanismos moleculares envolvidos na disfunção da enzima eNOS não são totalmente compreendidos. Variantes na seqüência de bases do DNA podem afetar desde o processo de transcrição de um gene, até regulações pós-transcricionais e atividade enzimática. Hingorani (2001) sugere que alterações na sequência de bases na região promotora do gene afetariam a expressão do mesmo, enquanto alterações em regiões exônicas estariam envolvidas na modulação da atividade biológica da proteína. O RNAm transcrito pelo alelo T894 é traduzido numa sequência polipeptídica com o aminoácido aspartato na posição 298, uma vez que o alelo G894 gera uma seqüência polipeptídica com o aminoácido glutamato nesta posição. Embora a substituição seja conservativa, o resíduo 298 está localizado externamente no domínio oxidativo da enzima, local onde se encontram os sítios de ligação da L-

arginina e do co-fator tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>). Estudos utilizando-se de proteína recombinante revelaram não haver diferença na atividade enzimática das duas formas protéicas (Hingorani, 2001). Embora a substituição do glutamato pelo aspartato no resíduo 298 da enzima pareça não afetar a atividade enzimática *in vitro*, Tesouro et al. (2000) demonstraram que o resíduo Asp298 é mais susceptível à clivagem proteolítica, precisamente na posição Asp<sup>298</sup>-Pro<sup>299</sup>. Posteriormente, Fairchild et al. (2001) verificaram que o resultado do estudo anterior era um artefato dos métodos de preparação do experimento. Mesmo sob a luz de tais contradições, não pode ser descartada a hipótese de que, *in vivo*, um desconhecido mecanismo de clivagem proteolítica ou um mecanismo de regulação pós-transcricional esteja sendo modulado pelo resíduo Asp298. A reduzida biodisponibilidade do NO ainda pode ser resultante de um *locus* funcional em algum outro local do gene ou em sua vizinhança, que esteja em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo G894T. Mesmo este polimorfismo não sendo a causa direta do fenótipo caracterizado, isso não exclui a possibilidade de que tal variante genética seja utilizada como um marcador de um *locus* funcional.

Estudos de associação em genética não são de fáceis interpretações, já que um único gene exerce apenas uma pequena ou moderada modulação num determinado fenótipo. Embora este raciocínio seja particularmente verdadeiro no caso da reatividade vascular, um fenótipo modulado por um conjunto de genes, os resultados do presente estudo são consistentes com o fato de que a biodisponibilidade do NO está fundamentalmente envolvida na regulação do fluxo sanguíneo muscular no genótipo GG. A vasodilatação muscular reflexa foi abolida em resposta ao exercício isométrico de *handgrip* quando o L-NMMA foi administrado na artéria braquial. Esta evidência sugere uma alta funcionalidade do gene da eNOS na modulação da responsividade vascular no genótipo GG durante manobras fisiológicas. Por outro lado, a reduzida biodisponibilidade do NO parece explicar, pelo menos em parte, a prejudicada vasodilatação muscular reflexa no genótipo TT, uma vez a administração de L-NMMA não alterou a reatividade vascular neste grupo. Em adição, a atividade nervosa simpática muscular está envolvida na regulação da pressão arterial e na perfusão tecidual, tanto em situações de repouso quanto durante manobras fisiológicas. Nesse caso, poderia se especular que o menor aumento do fluxo sanguíneo no antebraço observado no genótipo TT seria consequência de uma menor pressão de perfusão. Isso parece improvável, uma vez

que o aumento na pressão arterial mediada pelo exercício isométrico de handgrip foi similar entre os genótipos GG e TT. Estes resultados sustentam a hipótese de que o aumento do fluxo sanguíneo no antebraço é mediado por vasodilatação local e não por aumento da pressão de perfusão. Além disso, a condutância vascular no antebraço leva em consideração os valores de fluxo sanguíneo e de pressão arterial média, evitando quaisquer confusões decorrentes de diferenças de pressão de perfusão entre os genótipos. Por outro lado, é pouco provável que o reduzido fluxo sanguíneo observado no genótipo TT seja consequência de um débito cardíaco diminuído. Embora o volume de ejeção sistólica não tenha sido analisado, a frequência cardíaca basal e o seu aumento durante o exercício foi semelhante entre os genótipos.

## **CONCLUSÃO**

O presente estudo mostrou que o polimorfismo G894T do gene da eNOS está funcionalmente envolvido na variabilidade vasodilatadora muscular reflexa induzida pelo exercício e que a presença dos dois alelos T894 parece reduzir a biodisponibilidade do NO. Estes resultados sugerem que a carga genética pode influenciar, sobremaneira, a função vascular e músculo esquelética e que a variante G894T do gene da eNOS pode ser uma candidata utilizada no rastreamento de maior susceptibilidade à doenças cardiovasculares e também no rastreamento de atletas com diferentes susceptibilidades ao desenvolvimento de lesões e responsividade à terapêutica adotada. Durante o exercício físico, parte da aumentada demanda energética muscular é sustentada por um incremento no débito cardíaco e na vasodilatação local. Neste caso, seria possível suspeitar que a capacidade aeróbia dos indivíduos portadores do genótipo TT fosse menor que a dos indivíduos com pelo menos um alelo G894. Como a geração de força muscular é em parte regulada negativamente pelo NO, a menor biodisponibilidade deste poderia resultar em geração de força acima do suportado pelas estruturas músculo esquelética e tendíneas, aumentando a possibilidade da ocorrência de lesões. Em adição, menor biodisponibilidade do NO viria afetar sobremaneira a recuperação do tecido lesado, uma vez que a ativação, proliferação e diferenciação das células satélites é mediada em parte por este radical livre. Este racional é, principalmente, aplicável para o contexto do esporte de alto rendimento. Embora tenhamos investido

na caracterização da funcionalidade de um único gene em um fenótipo modulado por um conjunto deles, nossos resultados demonstraram pela primeira vez que, o NO isoladamente, é o responsável por ~90% da vasodilatação muscular em resposta à ativação simpática reflexa induzida pelo exercício. Mesmo assim, isso não significa que em outros fenótipos o mesmo NO possa exercer tão expressiva influência, como é o caso das lesões em músculo esquelético. Na tentativa de compreender como genes interagem entre si e com os fatores ambientais, utilizamos uma plataforma exploratória, livre de hipóteses. Identificamos, a partir da análise completa do genoma humano, 121 novos marcadores genéticos, caracterizando novos e potenciais alvos para serem rastreados na tentativa de identificação de variantes genéticas que, eventualmente, possam explicar pelo menos em parte a diferente susceptibilidade de atletas a lesões musculares, além de suas diferentes responsabilidades à terapêutica. Este estudo se constitui no primeiro a caracterizar uma “assinatura molecular” do treinamento físico numa população extremamente bem controlada, servindo como base para uma possível adoção de terapias individualizadas para o esporte de alto rendimento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSON, V.C. & HILTON, S.M. (1964). The Role of Active Muscle Vasodilatation in the Alerting Stage of the Defence Reaction. *J Physiol*, 171, 189-202.
- ALBRECHT, E.W., STEGEMAN, C.A., HEERINGA, P., HENNING, R.H. & VAN GOOR, H. (2003). Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol*, 199, 8-17.
- ANDREW, P.J. & MAYER, B. (1999). Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res*, 43, 521-31.
- BECKMAN, J.S. & KOPPENOL, W.H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*, 271, C1424-37.
- BLAIR, D.A., GLOVER, W.E., GREENFIELD, A.D. & RODDIE, I.C. (1959). Excitation of cholinergic vasodilator nerves to human skeletal muscles during emotional stress. *J Physiol*, 148, 633-47.
- BOLME, P. & FUXE, K. (1970). Adrenergic and cholinergic nerve terminals in skeletal muscle vessels. *Acta Physiol Scand*, 78, 52-9.

- CHARCHAR, F., ZIMMERLI, L., TOMASZEWSKI, M. (2008). The pressure of finding human hypertension genes: new tools, old dilemmas. *J Hum Hypertens*, 22:821-8.
- DIETZ, N.M., ENGELKE, K.A., SAMUEL, T.T., FIX, R.T. & JOYNER, M.J. (1997). Evidence for nitric oxide-mediated sympathetic forearm vasodilatation in humans. *J Physiol*, 498 ( Pt 2), 531-40.
- DIETZ, N.M., RIVERA, J.M., WARNER, D.O. & JOYNER, M.J. (1994). Is nitric oxide involved in cutaneous vasodilation during body heating in humans? *J Appl Physiol*, 76, 2047-53.
- DIMMELER, S., FLEMING, I., FISSALTHALER, B., HERMANN, C., BUSSE, R. & ZEIHNER, A.M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, 399, 601-5.
- DYKE, C.K., PROCTOR, D.N., DIETZ, N.M. & JOYNER, M.J. (1995). Role of nitric oxide in exercise hyperaemia during prolonged rhythmic handgripping in humans. *J Physiol*, 488 ( Pt 1), 259-65.
- EKLUND, B. & KAIJSER, L. (1976). Effect of regional alpha- and beta-adrenergic blockade on blood flow in the resting forearm during contralateral isometric handgrip. *J Physiol*, 262, 39-50.
- FAIRCHILD, T.A., FULTON, D., FONTANA, J.T., GRATTON, J.P., MCCABE, T.J. & SESSA, W.C. (2001). Acidic hydrolysis as a mechanism for the cleavage of the Glu(298)-->Asp variant of human endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 276, 26674-9.
- FERREIRO, C.R., CHAGAS, A.C., CARVALHO, M.H., DANTAS, A.P., SCAVONE, C., SOUZA, L.C., BUFFOLO, E. & DA LUZ, P.L. (2004). Expression of inducible nitric oxide synthase is increased in patients with heart failure due to ischemic disease. *Braz J Med Biol Res*, 37, 1313-20.
- FULTON, D., GRATTON, J.P., MCCABE, T.J., FONTANA, J., FUJIO, Y., WALSH, K., FRANKE, T.F., PAPAPETROPOULOS, A. & SESSA, W.C. (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*, 399, 597-601.
- GOVERS, R. & RABELINK, T.J. (2001). Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol*, 280, F193-206.
- GRIFFITH, O.W. & STUEHR, D.J. (1995). Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol*, 57, 707-36.

- HARRISON, D.G. (1997). Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest*, 100, 2153-7.
- HEINZEL, B., JOHN, M., KLATT, P., BOHME, E. & MAYER, B. (1992). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem J*, 281 ( Pt 3), 627-30.
- HIBI, K., ISHIGAMI, T., TAMURA, K., MIZUSHIMA, S., NYUI, N., FUJITA, T., OCHIAI, H., KOSUGE, M., WATANABE, Y., YOSHII, Y., KIHARA, M., KIMURA, K., ISHII, M. & UMEMURA, S. (1998). Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension*, 32, 521-6.
- HINGORANI, A.D. (2001). Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis: John French Lecture 2000. *Atherosclerosis*, 154, 521-7.
- HINGORANI, A.D., LIANG, C.F., FATIBENE, J., LYON, A., MONTEITH, S., PARSONS, A., HAYDOCK, S., HOPPER, R.V., STEPHENS, N.G., O'SHAUGHNESSY, K.M. & BROWN, M.J. (1999). A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation*, 100, 1515-20.
- HUBAL, M.J. *et al.* CCL2 and CCR2 polymorphisms are associated with markers of exercise-induced skeletal muscle damage (2010). *J Appl Physiol*, 108(6):1651-8.
- JOYNER, M.J. & DIETZ, N.M. (1997). Nitric oxide and vasodilation in human limbs. *J Appl Physiol*, 83, 1785-96.
- JOYNER, M.J. & DIETZ, N.M. (2003). Sympathetic vasodilation in human muscle. *Acta Physiol Scand*, 177, 329-36.
- KARANTZOULIS-FEGARAS, F., ANTONIOU, H., LAI, S.L., KULKARNI, G., D'ABREO, C., WONG, G.K., MILLER, T.L., CHAN, Y., ATKINS, J., WANG, Y. & MARSDEN, P.A. (1999). Characterization of the human endothelial nitric-oxide synthase promoter. *J Biol Chem*, 274, 3076-93.
- KLATT, P., PFEIFFER, S., LIST, B.M., LEHNER, D., GLATTER, O., BACHINGER, H.P., WERNER, E.R., SCHMIDT, K. & MAYER, B. (1996). Characterization of heme-deficient neuronal nitric-oxide synthase reveals a role for heme in subunit dimerization and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem*, 271, 7336-42.
- KOJDA, G. & HARRISON, D. (1999). Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res*, 43, 562-71.

- LACOLLEY, P., GAUTIER, S., POIRIER, O., PANNIER, B., CAMBIEN, F. & BENETOS, A. (1998). Nitric oxide synthase gene polymorphisms, blood pressure and aortic stiffness in normotensive and hypertensive subjects. *J Hypertens*, 16, 31-5.
- LAMBLIN, N., CUIILLERET, F.J., HELBECQUE, N., DALLONGEVILLE, J., LABLANCHE, J.M., AMOUYEL, P., BAUTERS, C. & VAN BELLE, E. (2005). A common variant of endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is associated with collateral development in patients with chronic coronary occlusions. *BMC Cardiovasc Disord*, 5, 27.
- MAJMUDAR, N.G., ANUMBA, D., ROBSON, S.C. & FORD, G.A. (1999). Contribution of nitric oxide to beta2-adrenoceptor mediated vasodilatation in human forearm arterial vasculature. *Br J Clin Pharmacol*, 47, 173-7.
- MARLETTA, M.A. (1994). Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*, 78, 927-30.
- MARSDEN, P.A., HENG, H.H., SCHERER, S.W., STEWART, R.J., HALL, A.V., SHI, X.M., TSUI, L.C. & SCHAPPERT, K.T. (1993). Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem*, 268, 17478-88.
- MATSUKAWA, K., SHINDO, T., SHIRAI, M. & NINOMIYA, I. (1993). Nitric oxide mediates cat hindlimb cholinergic vasodilation induced by stimulation of posterior hypothalamus. *Jpn J Physiol*, 43, 473-83.
- MAYER, B., JOHN, M., HEINZEL, B., WERNER, E.R., WACHTER, H., SCHULTZ, G. & BOHME, E. (1991). Brain nitric oxide synthase is a biopterin- and flavin-containing multi-functional oxido-reductase. *FEBS Lett*, 288, 187-91.
- MCDONALD, K.K., ZHARIKOV, S., BLOCK, E.R. & KILBERG, M.S. (1997). A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric-oxide synthase may explain the "arginine paradox". *J Biol Chem*, 272, 31213-6.
- MICHEL, T. & FERON, O. (1997). Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest*, 100, 2146-52.
- MILNER, P., KIRKPATRICK, K.A., RALEVIC, V., TOOTHILL, V., PEARSON, J. & BURNSTOCK, G. (1990). Endothelial cells cultured from human umbilical vein release ATP, substance P and acetylcholine in response to increased flow. *Proc Biol Sci*, 241, 245-8.

- MIYAMOTO, Y., SAITO, Y., KAJIYAMA, N., YOSHIMURA, M., SHIMASAKI, Y., NAKAYAMA, M., KAMITANI, S., HARADA, M., ISHIKAWA, M., KUWAHARA, K., OGAWA, E., HAMANAKA, I., TAKAHASHI, N., KANESHIGE, T., TERAOKA, H., AKAMIZU, T., AZUMA, N., YOSHIMASA, Y., YOSHIMASA, T., ITOH, H., MASUDA, I., YASUE, H. & NAKAO, K. (1998). Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension*, 32, 3-8.
- MONCADA, S., PALMER, R.M. & HIGGS, E.A. (1989). The biological significance of nitric oxide formation from L-arginine. *Biochem Soc Trans*, 17, 642-4.
- MOUNT, P.F., KEMP, B.E. & POWER, D.A. (2007). Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol*, 42, 271-9.
- NABER, C.K., BAUMGART, D., ALTMANN, C., SIFFERT, W., ERBEL, R. & HEUSCH, G. (2001). eNOS 894T allele and coronary blood flow at rest and during adenosine-induced hyperemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281, H1908-12.
- NEGRAO, C.E., HAMILTON, M.A., FONAROW, G.C., HAGE, A., MORIGUCHI, J.D. & MIDDLEKAUFF, H.R. (2000). Impaired endothelium-mediated vasodilation is not the principal cause of vasoconstriction in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 278, H168-74.
- NEGRAO, C.E., TROMBETTA, I.C., BATALHA, L.T., RIBEIRO, M.M., RONDON, M.U., TINUCCI, T., FORJAZ, C.L., BARRETTO, A.C., HALPERN, A. & VILLARES, S.M. (2001). Muscle metaboreflex control is diminished in normotensive obese women. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281, H469-75.
- OSTROWSKI, K., ROHDE, T., ASP, S., SCHJERLING, P., PEDERSEN, B.K (1999). Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol*, 515 ( Pt 1):287-91.
- PALMER, R.M., FERRIGE, A.G. & MONCADA, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327, 524-6.
- PHILIP, I., PLANTEFEVE, G., VUILLAUMIER-BARROT, S., VICAUT, E., LEMARIE, C., HENRION, D., POIRIER, O., LEVY, B.I., DESMONTS, J.M., DURAND, G. & BENESSIONO, J. (1999). G894T polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with an enhanced vascular responsiveness to phenylephrine. *Circulation*, 99, 3096-8.



- RADÁK, Z. *et al* (1999). Muscle soreness-induced reduction in force generation is accompanied by increased nitric oxide content and DNA damage in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*, 26(7-8):1059-63.
- RADAK, Z. *et al* (2012). Nitric oxide: is it the cause of muscle soreness? *Nitric Oxide*, 15;26(2):89-94.
- SANTOS, A.C., ALVES, M.J., RONDON, M.U., BARRETTO, A.C., MIDDLEKAUFF, H.R. & NEGRAO, C.E. (2005). Sympathetic activation restrains endothelium-mediated muscle vasodilatation in heart failure patients. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289, H593-9.
- SEO, D., GINSBURG, G.S., GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P.J (2006). Gene expression analysis of cardiovascular diseases: novel insights into biology and clinical applications. *J Am Coll Cardiol*, 48:227-35.
- SCHMUTZ, S., DAPP, C., WITTEWER, M., VOGT, M., HOPPELER, H., FLUCK, M (2006). Endurance training modulates the muscular transcriptome response to acute exercise. *Pflugers Arch*, 451:678-87.
- SHIOJIMA, I. & WALSH, K. (2002). Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res*, 90, 1243-50.
- STUEHR, D.J. (1997). Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 37, 339-59.
- SUZUKI, T., OKUMURA, K., SONE, T., KOSOKABE, T., TSUBOI, H., KONDO, J., MUKAWA, H., KAMIYA, H., TOMIDA, T., IMAI, H., MATSUI, H. & HAYAKAWA, T. (2002). The Glu298Asp polymorphism in endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary in-stent restenosis. *Int J Cardiol*, 86, 71-6.
- TESAURO, M., THOMPSON, W.C., ROGLIANI, P., QI, L., CHAUDHARY, P.P. & MOSS, J. (2000). Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 2832-5.
- TROMBETTA, I.C., BATALHA, L.T., RONDON, M.U., LATERZA, M.C., KUNIYOSHI, F.H., GOWDAK, M.M., BARRETTO, A.C., HALPERN, A., VILLARES, S.M. & NEGRAO, C.E. (2003). Weight loss improves neurovascular and muscle metaboreflex control in obesity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285, H974-82.
- VASQUEZ-VIVAR, J., KALYANARAMAN, B., MARTASEK, P., HOGG, N., MASTERS, B.S., KAROUI, H., TORDO, P. & PRITCHARD, K.A., JR. (1998).

Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 9220-5.

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

YAMIN, C. *et al.* IL6 (-174) and TNFA (-308) promoter polymorphisms are associated with systemic creatine kinase response to eccentric exercise (2008). *Eur J Appl Physiol*, 104(3):579-86.

YOSHIMURA, M., YASUE, H., NAKAYAMA, M., SHIMASAKI, Y., SUMIDA, H., SUGIYAMA, S., KUGIYAMA, K., OGAWA, H., OGAWA, Y., SAITO, Y., MIYAMOTO, Y. & NAKAO, K. (1998). A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet*, 103, 65-9.