

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos Clínicos do Óxido Nítrico

Em 1980, Furchgott e Zawadzki demonstraram que a vasodilatação, em resposta à infusão de acetilcolina, era dependente de tecido endotelial intacto. Consequentemente, propuseram que o endotélio era responsável por sintetizar um fator responsável por mediar a vasodilatação, denominando-o de fator relaxante derivado do endotélio (*EDRF-endothelial-derived relaxing factor*) (FURCHGOTT, 1980). Anos mais tarde, foi estabelecido que o fator relaxante derivado do endotélio era o óxido nítrico (NO) (MONCADA, 1991), um gás endógeno, proveniente da conversão do aminoácido L-arginina à L-citrulina, sob ação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (MARLETTA, 1993).

Importante regulador do sistema cardiovascular (ANDREW, 1999), o NO é responsável pela manutenção do tônus vascular, inibição da agregação plaquetária, da adesão de leucócitos ao endotélio, da migração e proliferação de células lisas musculares (ALBRECHT, 2003; MARLETTA, 1993). Esses efeitos biológicos caracterizam o NO como crucial na prevenção de danos cardiovasculares, tais como, hipertensão arterial e aterosclerose (ANDREW, 1999; KHAZAEI, 2008)

O NO, possui meia vida curta, de aproximadamente quatro a oito segundos e, por ser um gás lábil, não pode ser armazenado (PALMER, 1987). Redução na expressão ou na atividade do NO provoca mudanças na reatividade vascular e diminuição na capacidade de remodelamento, ou seja, na habilidade do vaso em reorganizar os componentes celulares e extracelulares frente a diferentes estímulos (HINGORANI, 2003; RUDIC, 1999).

Como o NO possui ação antiaterogênica, antitrombótica e antiproliferativa, a redução na sua biodisponibilidade está associada a diversas condições patológicas, como hipertensão arterial, diabetes mellitus, insuficiência cardíaca, e doença arterial coronariana (MONCADA, 2006; YETIK-ANACAK, 2006). Por exemplo, animais geneticamente modificados, com deleção do gene da eNOS, fato que provoca redução na biodisponibilidade do NO, apresentam fenótipo hipertensivo. E, apesar de que outros mecanismos possam estar envolvidos, é evidente o papel essencial do NO na regulação, a curto e longo prazo da pressão arterial (MONCADA, 2006).

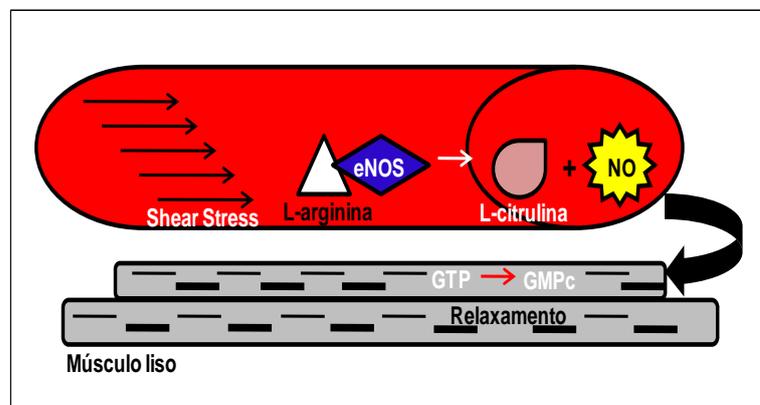
Mesmo na infância, a exposição à ambiente desfavorável, como má alimentação, sedentarismo e excesso de peso está associado com redução na biodisponibilidade do NO (MALHOTRA, 2004). Por exemplo, Gruber e colaboradores (2008), observaram redução na biodisponibilidade do NO em adolescentes obesos, quando comparados a seus pares

eutróficos. Além desses fatores ambientais, alterações genéticas tem sido identificadas por promover redução na biodisponibilidade do NO. Determinados polimorfismos, presentes na eNOS, tem sido associados a condições patológicas como hipertensão arterial e doença arterial coronariana (JEEMA, 2009; SRIVASTAVA, 2008; ROSSI, 2003a).

## 1.2 Síntese do Óxido Nítrico

A biossíntese de NO ocorre por meio da catálise da eNOS, e envolve dois momentos: a hidroxilação da L-arginina e, posteriormente, a formação de L-citrulina e NO (Figura 1).

Após a síntese, o NO produzido pelas células endoteliais, difunde-se para a célula muscular lisa e para o lúmen vascular. Na célula muscular lisa ele interage com o ferro da enzima guanilato ciclase, tornando-a ativa, esta por sua vez catalisa a guanosina trifosfato (GTP) dando origem à guanosina monofosfato cíclica (GMPc). A GMPc é então, a responsável final pelo relaxamento da musculatura lisa vascular, por meio da redução na liberação e aumento no sequestro de cálcio pelo retículo endoplasmático (BREDT, 1999; KHAZAEI, 2008) (Figura 1). Além disso, uma vez no lúmen vascular, o NO pode ligar-se às plaquetas, nas quais, de modo similar ao que ocorre nas células musculares lisas, irá promover o aumento de GMPc, redução do cálcio livre e conseqüentemente redução da atividade de agregação plaquetária, uma vez que esta é dependente de cálcio (RADOMSKI, 1990).



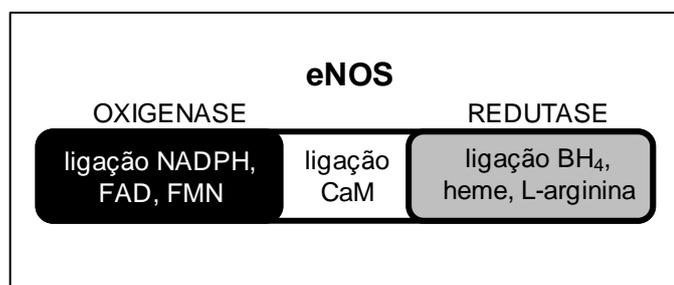
**Figura 1.** Representação esquemática da síntese do óxido nítrico (NO) sob estímulo do *shear stress*. A L-arginina é catalizada pela enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), o que promove a formação de L-citrulina e NO. O NO difunde-se para o músculo liso vascular, onde é responsável pela conversão da guanosina trifosfato (GTP) a guanosina monofosfato cíclica (GMPc), este por sua vez, reduz a disponibilidade de cálcio promovendo relaxamento.

Todo este processo de síntese do NO depende, dentre outros, da ação da eNOS que localiza-se nas células endoteliais, principalmente, em espaços da membrana celular denominados cavéolas (MONCADA, 2006). A eNOS é codificada pelo gene localizado no cromossomo 7q35-36, composta por 26 éxons que codificam uma proteína de 1203 aminoácidos, com dois monômeros análogos. A eNOS é funcional apenas na forma dimérica, ou seja, sem a conexão entre os monômeros a enzima é ineficiente para síntese de NO (ALBRETCH, 2003).

Os monômeros da eNOS são divididos funcionalmente e estruturalmente em dois domínios principais: um domínio C-terminal redutase, que contém sítios de ligação para nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, flavina mononucleotídeo e flavina adenina dinucleotídeo e, um domínio N-terminal oxidase, que possui sítios de ligação para o ferro heme, para o cofator 4 tetrahidrobiopterina e para a L-arginina (ANDREW, 1999; KHAZAEI, 2008). Entre esses dois domínios do monômero, localiza-se o sítio de ligação para a calmodulina, responsável por controlar o fluxo de elétrons entre os domínios redutase e oxigenase (Figura 2).

Um dos maiores estímulos fisiológicos para a síntese de NO pelo endotélio é o *shear stress*, ou seja, a força tangencial gerada pelo sangue sobre a superfície das células endoteliais (MONCADA, 2006). Assim, o *shear stress* é a força mecânica, gerada pela pressão sanguínea na superfície da camada endotelial vascular. O endotélio por sua vez, é capaz de modular a resistência do músculo liso vascular, e ajustar o tônus vascular de acordo com as mudanças locais no *shear stress* e na pressão arterial, adaptando o vaso sanguíneo às mudanças na demanda de perfusão do tecido (BUGA, 1991).

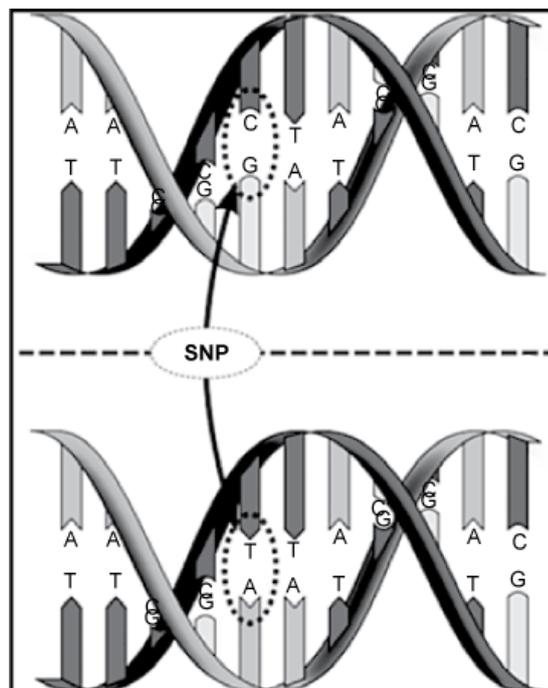
O exercício físico, aumenta a síntese de NO, pois promove aumento no *shear stress*. Assim, na vasodilatação promovida durante o exercício físico, o NO contribui com aproximadamente 30%, sendo portanto, responsável pelo aumento no fluxo sanguíneo, para atender à elevação na demanda metabólica (CASEY, 2010; GREEN, 2003).



**Figura 2.** Representação esquemática do monômero da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Representados o domínio oxigenase e os sítios de ligação para adenina nicotinamida dinucleotídeo fosfato (NADPH), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN), o domínio redutase e os sítios de ligação da tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), ferro heme (heme) e L-arginina e o sítio de ligação do complexo cálcio/calmodulina (CaM).

### 1.3 Polimorfismos Genéticos

Polimorfismos são variações específicas da sequência de bases do gene que ocorrem com frequência superior a 1% na população. Caracteriza a substituição de um único nucleotídeo, denominada polimorfismo de nucleotídeo único ou *single-nucleotide polymorphism* (SNP), que provavelmente advém de erros de replicação, no qual um nucleotídeo é substituído por outro, normalmente transições de purina para purina (adenina para guanina), ou pirimidina para pirimidina (citosina por timina) (DORIS, 2002; WANG, 2000) (Figura 3). Por exemplo, podem ocorrer pela substituição de uma base Citosina por Timina em regiões do gene que codificam os aminoácidos (éxons), causando uma correspondente substituição de um aminoácido por outro, potencialmente alterando a estrutura e/ou função da proteína. Os polimorfismos representam cerca de 90% das variações comuns do genoma (DORIS, 2002), e tem ganho cada vez mais interesse clínico, pois oferecem poderosa ferramenta para estudos genéticos e tratamentos clínicos (WANG., 2000). Identificar os polimorfismos que são funcionalmente neutros, e aqueles que contribuem para o surgimento de doenças são o grande desafio dos estudos em genética humana (NG, 2002).



**Figura 3.** Representação esquemática de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP). Neste exemplo, houve a troca de uma citosina por uma timina.

Os polimorfismos da eNOS podem estar presentes na região que controla a transcrição (promotora), na região codificante (éxons), ou na região não codificante do gene (introns) (Figura 4). São considerados polimórficos os genótipos que apresentam troca do par de base, que pode se manifestar em homozigose (há troca nos dois pares de base, por exemplo o indivíduo Asp/Asp para o polimorfismo do exon 7), ou heterozigose (há troca de apenas uma base do par, por exemplo o indivíduo Glu/Asp para o polimorfismo do exon 7).

O polimorfismo que ocorre na região promotora do gene da eNOS, consiste na substituição de uma Timina por uma Citosina, na posição -786 (T-786C). Segundo Nakayama *et al.*(1999), esse polimorfismo resulta em menor atividade transcricional do gene, ou seja, menor síntese de RNAmensageiro da eNOS. Indivíduos portadores desse polimorfismo, apresentam menor vasodilatação dependente do endotélio (em resposta à infusão de acetilcolina) (ROSSI, 2003b) e, aumento na prevalência de hipertensão resistente (CRUZ-GONZÁLEZ, 2009), espasmo coronariano e manifestações mais severas deste (NAKAYAMA, 1999), síndrome aguda coronariana (ÇIFTIÇI, 2008) e risco para doença arterial coronariana (CATTARUZZA, 2009; ROSSI, 2003a; COLOMBO, 2003).

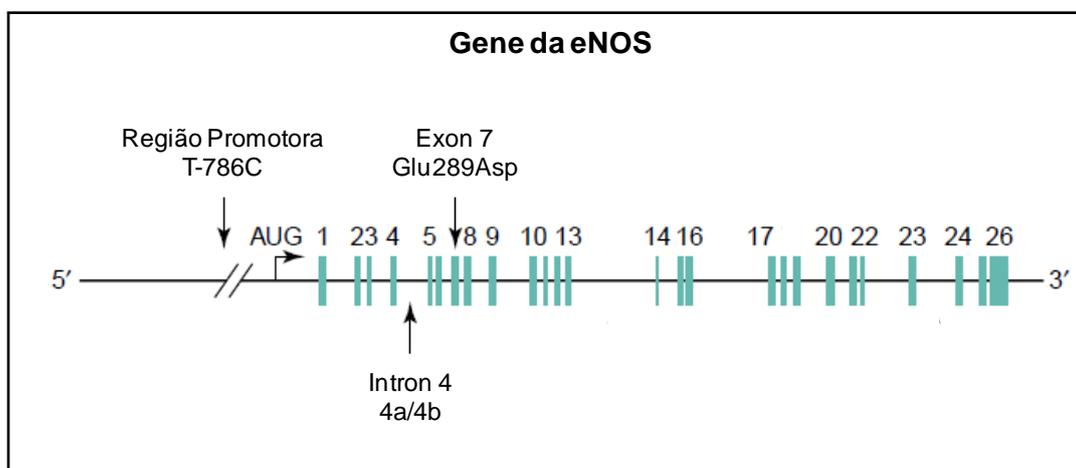
O polimorfismo do exon 7 do gene da eNOS, consiste na substituição da base guanina por timina na posição 894 (G894T). Esta alteração resulta na substituição do aminoácido Glutamato por Aspartato na posição 298 da proteína sintetizada (Glu289Asp) (TESAURO, 2000). Os efeitos desta mutação tem sido associados à redução na atividade ou na estabilidade proteica da eNOS (JOSHI, 2007; SENTHIL, 2005; TESAURO, 2000). Deste modo, a presença do alelo polimórfico 289Asp, está associada a elevadas taxas de marcadores inflamatórios e estresse oxidativo (CHRYSHOOU, 2004), reduzida vasodilatação dependente do endotélio (GODFREY, 2007; PARADOSSI, 2004), hipertensão arterial (KISHIMOTO, 2004; MYIAMOTO, 1998; SRIVASTAVA, 2008), aterosclerose (LEMBO, 2001), doença arterial coronariana prematura (CAM, 2005), infarto prematuro do miocárdio (ANTONIADES, 2005) e, doenças cardíacas isquêmicas (CASAS, 2004).

O polimorfismo na região do intron 4 do gene da eNOS, consiste na repetição de 27 pares de bases (bp) por 4 ou 5 vezes, sendo o alelo menor (4 x 27bp) denominado 4a e o alelo maior (5 x 27bp) 4b. A este tipo de alteração genética, chamada de repetições em *tandem* de número variável (VNTR), tem sido associada ao efeito supressor ou promotor na eficácia da transcrição gênica (SUSHMA, 2009; ZHANG, 2005; WANG, 2002). Assim sendo, a presença do alelo polimórfico 4a parece expor os indivíduos à maior predisposição ao desenvolvimento de hipertensão arterial (JEEMA, 2009; MATYAR, 2005; PULKKINEN, 2000; ZINTZARAS, 2006).

Porém, outros estudos não encontraram relação entre os polimorfismos T-786C, Glu289Asp e 4a/4b e patologias cardiovasculares (ANDRIKOPOULOS, 2008; BENJAFIELD, 2000; CAGLAYAN, 2009; GHAZALI, 2008; JARAMILLO, 2010; SCHMOELZER, 2005).

Segundo Marroni e colaboradores (2005) e Neves e colaboradores (2010), os resultados conflitantes dos estudos devem-se, entre outros, à diversidade étnica das populações investigadas e ausência de situações dinâmicas que poderiam revelar comprometimentos que não podem ainda serem observados em condições basais.

Além das alterações na biodisponibilidade do NO que podem ser desencadeadas pelos polimorfismos da eNOS e, conseqüentemente, associadas às doenças cardiovasculares, esses polimorfismos podem alterar de forma aguda a vasodilatação e pressão arterial durante situações dinâmicas (DIAS, 2009; NEVES, 2010).



**Figura 4.** Representação esquemática do gene da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Representação das regiões correspondentes aos polimorfismos T-786C, Glu289Asp e 4a/4b.

#### 1.4 Reflexo Pressor ao Exercício Físico e Estresse Mental

Situações dinâmicas, como exercício físico e estresse mental, são caracterizadas por aumento da descarga nervosa simpática, resultando em aumento da pressão arterial, frequência cardíaca, débito cardíaco e fluxo sanguíneo periférico. Este mecanismo ocorre devido à necessidade de suprir a demanda metabólica do exercício físico ou da reação de alerta ao estresse (denominado reação de luta ou fuga) (IELLAMO, 2001; SMITH, 2006; STEPTOE, 1991).

Durante o exercício físico, pelo menos três mecanismos são responsáveis pela regulação cardiovascular: o comando central, os receptores musculares sensíveis à deformação mecânica (mecanorreceptores) e os receptores sensíveis às alterações

metabólicas da musculatura esquelética (metaboreceptores) (ALAN, 1937; IELLAMO, 2001; SMITH, 2006; TROMBETA, 2005)

O comando central é o mecanismo pelo qual sinais do córtex motor, responsáveis pelo recrutamento de unidades motoras, ativam áreas do sistema cardiovascular no tronco cerebral, modulando a atividade simpática e parassimpática durante o exercício. O reflexo pressor do exercício, por outro lado é o reflexo da unidade periférica neural, originário do músculo esquelético, que também ativa áreas do tronco cerebral responsáveis pelo controle cardiovascular durante o exercício físico (ALLAN, 1937; IELLAMO, 2001; SMITH, 2006).

Durante o exercício físico a ativação do reflexo é mediada por estimulação dos metaboreceptores e dos mecanoreceptores musculares, que são neurônios aferentes primários, que de forma reflexa promovem aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca, principalmente por ativação simpática e inibição parassimpática (IELLAMO, 2001; SMITH, 2006; TROMBETA, 2005).

Deste modo, as ativações que regulam o aumento da atividade nervosa simpática durante o exercício físico dinâmico ou isométrico são primeiramente “acionadas” pelo comando central, que precede a contração muscular voluntária e a acompanha durante a execução do exercício e, posteriormente, de forma reflexa por aferentes musculares, sensíveis a deformações mecânicas e a alterações químicas do metabolismo muscular (RAY, 1993; TROMBETA, 2002).

Durante situações de estresse mental, há redistribuição do fluxo sanguíneo, para que se antecipe o ataque iminente. Este mecanismo se dá por meio de alterações dos sistemas neural, humoral e celular, envolvendo diversos órgãos e tecidos. Um complexo sistema constituído pelo sistema nervoso central e periférico, incluindo neurônios hipotalâmicos, o tronco cerebral, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e o sistema nervoso autonômico, é responsável pela intensa descarga adrenérgica frente a situações de ameaça (LOURES, 2002; KRANTS, 1984; TROMBETA, 2002).

Baseado nisso, sabe-se que o sistema cardiovascular exerce grande participação na resposta ao estresse mental, e a forma como este sistema se adapta tem sido utilizada para investigar condições patogênicas (SHERWOOD, 1999; STEPTOE, 1991; TROMBETTA, 2005). Os testes laboratoriais de estresse mental, por exemplo, são ferramentas para induzir respostas cardiovasculares a desafios emocionais, em ambiente controlado, com objetivo de investigar adaptações e eventos cardiovasculares em situações de estresse e assim elucidar mecanismos que podem estar alterados frente a patologias.

Frente a estas situações de estresse fisiológico, a elevação na pressão arterial e na frequência cardíaca desencadeiam aumento no *shear stress*, principal estímulo à síntese de NO (GREEN, 2004). Este é um dos mecanismos que permite que a musculatura utilizada receba maior aporte sanguíneo, ou seja, vasodilatação. Portanto, é importante conhecer os

efeitos dos polimorfismos da eNOS nos níveis pressóricos, durante situações como o exercício físico e estresse mental.

### **1.5 Obesidade Infantil**

A obesidade infantil é consequência do balanço energético positivo, de origem multifatorial (DANIELS, 2009), caracterizada por meio do índice de massa corporal (IMC) igual ou superior ao percentil 95, de acordo com idade e gênero (KUCZMARSKI, 2000). Dados epidemiológicos demonstram que a obesidade infantil atinge 17% das crianças e adolescentes nos Estados Unidos (OGDEN, 2010), 14,2% das crianças e 5% dos adolescentes no Brasil (IBGE, 2010).

Em adultos, o aumento excessivo do tecido adiposo corporal promove alterações fisiopatológicas que resultam em inflamação vascular, disfunção endotelial e do sistema nervoso autonômico, e essas, por sua vez, levam à hiperinsulinemia, hipertensão arterial, diabetes mellitus tipo 2, hiperlipidemia e aterosclerose (MIRANDA, 2011)

Do mesmo modo, na infância a obesidade confere importante fator de risco para o desenvolvimento precoce de doenças crônicas e para o aumento na morbidade e mortalidade na vida adulta (LEE, 2009). De fato, as alterações fisiopatológicas decorrentes do acúmulo de tecido adiposo corporal na infância, promovem disfunção endotelial e hipertensão arterial, que podem ser desencadeadas pela redução na biodisponibilidade de óxido nítrico (SOROF, 2002; WOO, 2004).

Neste sentido, adolescentes obesos quando comparados a seus pares eutróficos, apresentam redução na biodisponibilidade de óxido nítrico (GRUBER, 2008). Esse fato explica, pelo menos em parte, a reduzida vasodilatação, níveis pressóricos elevados e a disfunção endotelial observadas nesta população (AGGOUN, 2008; LAMOTE, 2010; WOO, 2004). Adicionalmente, em situações dinâmicas, como o exercício físico e estresse mental, crianças e adolescentes obesos apresentam resposta pressórica hiperreativa e reduzido fluxo sanguíneo muscular quando comparadas a crianças e adolescentes eutróficos (CARLETTI, 2008; RIBEIRO, 2005). Todas essas alterações hemodinâmicas observadas em crianças e adolescentes obesos, são justificadas fisiologicamente pela redução na síntese de NO, disfunção endotelial e hiperatividade nervosa simpática (RIBEIRO, 2005; WOO, 2004), embora nem todos esses fatores tenham sido avaliados diretamente na população pediátrica.

Portanto, ainda não está totalmente esclarecido se em situações dinâmicas, o comprometimento hemodinâmico observado em crianças e adolescentes obesos está associado à inabilidade na síntese de NO. Assim não sabemos se os polimorfismos da

eNOS exercem algum papel na resposta pressórica no exercício físico e estresse mental em crianças e adolescentes obesos e, conhecer esse comportamento, é de extrema importância.

Considerando o exposto, desenvolvemos os seguintes estudos:

Estudo 1: Efeitos dos Polimorfismos da eNOS no Comportamento Pressórico Durante o Exercício Físico e Estresse Mental de Crianças e Adolescentes Saudáveis.

Estudo 2: Efeitos do Polimorfismo Glu289Asp da eNOS no Comportamento Pressórico Durante o Exercício Físico e Estresse Mental de Crianças e Adolescentes Obesos Normotensos.

## 2 REFERÊNCIAS

- 1.FURCHGOTT, R.F., ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** 288:373-376, 1980.
- 2.MONCADA, S., PALMER, R.M., HIGGS, E. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacology** 43:109-142, 1991.
- 3.MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **Journal Biology and Chemistry** 268:1223-1234, 1993.
- 4.ANDREW, P.J., MAYER, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. **Cardiovascular Research** 43:521-531, 1999.
- 5.ALBRECHT, E.W.J.A. et al. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. **Journal of Pathology** 199:8-17, 2003.
- 6.KHAZAEI, M., MOEIN-AFSHARI, F., LAHER, I. Vascular endothelial function in health and diseases. **Pathophysiology** 15:49-67, 2008.
- 7.PALMER, R.M., FERRIGE, A.G., MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature** 327:524-526, 1987.
- 8.RUDIC, R.C., SESSA, W.C. Human Genetics'99: The cardiovascular system. Nitric oxide in endothelial dysfunction and vascular remodeling: clinical correlates and experimental links. **American Journal of Human Genetic** 64:673-677, 1999.
- 9.HINGORANI, A.D. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and hypertension. **Current Hypertension Reports** 5:19-25, 2003.
- 10.MONCADA, S., HIGGS, E.A. Nitric oxide and vascular endothelium. **Handbook of Experimental Pharmacology** 176:1213-1254, 2006.
- 11.YETIK-ANACAK, G., CATRAVAS, J.D. Nitric oxide and the endothelium: History and impact on cardiovascular disease. **Vascular Pharmacology** 45:268-276, 2006.
- 12.MALHOTRA, S. et al. Effects of NOS3 Glu289Asp polymorphism on hemodynamic reactivity to stress: Influences of ethnicity and obesity. **Hypertension** 44:866-871, 2004.
- 13.GRUBER, H.J. et al. Obesity reduces the bioavailability of nitric oxide in juveniles. **International Journal of Obesity** 32:826-831, 2008.
- 14.JEEMA, R. et al. Association of a 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with hypertension in a Tunisian population. **Clinical Biochemistry** 42:852-856, 2009.
- 15.SRIVASTAVA, K. et al. Association of eNOS Glu298Asp gene polymorphism with essential hypertension in Asian Indians. **Clinica Chimica Acta** 387:80-83, 2008.

- 16.a-ROSSI, G.P. et al. The T-786C endothelial nitric oxide synthase genotype is a novel risk factor for coronary artery disease in Caucasian patients of the GENICA Study. **Journal of the American College of Cardiology** 41:930-937, 2003.
- 17.BRETT, D.S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. **Free Radical Research** 31:577-596, 1999.
- 18.RADOMSKI, M.W., PALMER, M.J., MONCADA, S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. **Proceedings of the National Academy of Science** 87:5193-5197, 1990.
- 19.BUGA, G.M. et al. Shear stress-induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads. **Hypertension** 17:187-193, 1991.
- 20.CASEY, D.P. et al. Nitric oxide contributes to the augmented vasodilatation during hypoxic exercise. **Journal of Physiology** 588:373-385, 2010.
- 21.GREEN, D.J. et al. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. **Journal of Physiology** 561:1-25, 2004.
- 22.DORIS, P.A. Hypertension genetics, single nucleotide polymorphisms, and the common diseases: Common variant hypothesis. **Hypertension** 39:323-331, 2002.
- 23.WANG, J., WANG, X.L. Endothelial nitric oxide synthase gene sequences variations and vascular disease. **Molecular Genetics and Metabolism** 70:241-251, 2000.
- 24.NG, P., HENIKOFF, S. Accounting for human polymorphisms predicted to affect protein. **Genome Research** 12:436-446, 2002.
- 25.NAKAYAMA, M. et al. T-786C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. **Circulation** 99:2864-2870, 1999.
- 26.b-ROSSI, G.P. et al. The T-786C and Glu289Asp polymorphisms of the affect the forearm blood flow responses of Caucasian hypertensive patients. **Journal of the American College of Cardiology** 41:938-945, 2003.
- 27.CRUIZ-GONZÁLEZ, I. et al. Association between T-786C NOS3 polymorphism and resistant hypertension: a prospective cohort study. **BMC Cardiovascular Disorders** 9:35-40, 2009.
- 28.ÇİFTİÇ, Ç. et al. Association of endothelial nitric oxide synthase promoter region (T-786C) gene polymorphism with acute coronary syndrome and coronary heart disease. **Lipids in Health and Diseases** 7:1-6, 2008.
- 29.CATTARUZZA, M. et al. Shear stress insensitivity of endothelial nitric oxide synthase expression as a genetic risk factor for coronary heart disease. **Circulation Research** 95:841-847, 2004.
- 30.COLOMBO, M.G. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of coronary artery disease. **Clinical Chemistry** 49:389-395, 2003.

- 31.TESAURO, M. et al. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary disease: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.** 97:2832-2835, 2000.
- 32.JOSHI, M.S. et al. Biochemical consequences of the NOS3 Glu289Asp variation in human endothelium: altered caveolar localization and impaired response to shear. **The FASEB Journal** 21:2655-2663, 2007.
- 33.SENTHIL, D. et al. Genotype-dependent expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and its regulatory proteins in cultured endothelial cells. **DNA and Cell Biology** 24:218-224, 2005.
- 34.CHRYSOHOOU, C. et al. Evidence for association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (G894T) and inflammatory markers: The ATTICA study. **American Heart Journal** 148:733-738, 2004.
- 35.GODFREY, V. et al. The functional consequence of the Glu289Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene in young healthy volunteers. **Cardiovascular Drug Reviews** 25:280-288, 2007.
- 36.PARADOSSI, U. et al. Endothelial function and carotid intima-media thickness in young healthy subjects among endothelial nitric oxide synthases Glu289Asp and T-786C polymorphisms. **Stroke** 35:1305-1309, 2004.
- 37.KISHIMOTO, T. et al. eNOS Glu298Asp polymorphism and hypertension in a cohort study in Japanese. **Preventive Medicine** 39:927-931, 2004.
- 38.MYIAMOTO, Y. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. **Hypertension** 32:3-8, 1998.
- 39.LEMBO, G. et al. A common variant of endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is an independent risk factor for carotid atherosclerosis. **Stroke** 32:735-740, 2001.
- 40.CAM, S.F. et al. The G894T polymorphism on endothelial nitric oxide synthase gene is associated with premature coronary artery disease in a Turkish population. **Thrombosis Research** 116:287-292, 2005.
- 41.ANTONIADES, C. et al. Genetic polymorphism G894T on the eNOS gene is associated with endothelial function and vWF levels in premature myocardial infarction survivors. **International Journal of Cardiology** 107:95-100, 2007.
- 42.CASAS, J.P. et al. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. **Circulation** 109:1359-1365, 2004.
- 43.SUSHMA, P. et al. High risk of essential hypertension in males with intron 4 VNTR polymorphisms of eNOS gene. **Indian Journal of Human Genetics** 15:49-53, 2009.

- 44.ZHANG, M.X. et al. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by small RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 22:16967-16972, 2005.
- 45.WANG, J., DUDLEY, D., WANG, X.L. Haplotype-specific effects on endothelial NO synthase promoter efficiency. Modifiable by cigarette smoking. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology** 22:1-4, 2002.
- 46.MATYAR, S. et al. eNOS gene intron 4 a/b VNTR polymorphism is a risk factor for coronary artery disease in Southern Turkey. **Clinica Chimica Acta** 354:153-158, 2005.
- 47.PULKKINEN, A. et al. Intron 4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with elevated blood pressure in type 2 diabetic patients with coronary heart disease. **Journal of Molecular Medicine** 78:372-379, 2000.
- 48.ZINTZARAS, E., KITSIOS, G., STEFANIDIS, I. Endothelial NO synthase gene polymorphisms and hypertension. **Hypertension** 48:700-710, 2006.
- 49.ANDRIKOPOULOS, G.K. et al. Association of the 894G>T polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with risk of acute myocardial infarction. **BMC Medical Genetics** 9:43-48, 2008.
- 50.BENJAFIELD, A.V., MORRIS, B.J. Association analyses of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in essential hypertension. **American Journal of Hypertension** 13:994-998, 2000.
- 51.CAGLAYAM, A.O. et al. Lack of association between the Glu289Asp polymorphism of endothelial nitric oxide synthase and slow coronary flow the Turkish population. **Canadian Journal of Cardiology** 25:e69-e72, 2009.
- 52.GHAZALI, D.M. et al. Candidate gene polymorphisms and their association with hypertension in Malays. **Clinica Chimica Acta** 388:46-50, 2008.
- 53.JARAMILLO, P.C. et al. Polymorphisms of the NOS3 gene in Southern Chilean subjects with coronary artery disease and controls. **Clinica Chimica Acta** 411:258-262, 2010.
- 54.SCHMOELZER, I. et al. Lack of association of the Glu298Asp polymorphism of endothelial nitric oxide synthase with manifest coronary artery disease, carotid atherosclerosis and forearm vascular reactivity in two Austrian populations. **European Journal of Clinical Investigation** 33:191-198, 2003.
- 55.MARRONI, A.S. et al. Consistent interethnic differences in the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide synthase genetic polymorphisms. **Nitric Oxide** 12:177-182, 2005.
- 56.NEVES, F.J. et al. Effect of the 894G>T polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase on vascular reactivity following maximal dynamic exercise. **Journal of Hypertension** 28:764-770, 2010.

57. DIAS, R.G. et al. Glu289Asp eNOS gene polymorphism causes attenuation in nonexercising muscle vasodilation. **Physiological Genomics** 37:99-107, 2009.
58. IELLAMO, F. Neural mechanisms of cardiovascular regulation during exercise. **Autonomic Neurociens: Basic and Clinical** 90:66-75, 2001.
59. SMITH, S.A., MITCHELL, J.H., GARRY, M.G. The mammalian exercise pressor reflex in health and disease. **Experimental Physiology** 91:89-102, 2006.
60. STEPTOE, A., VOGÈLE, C. Methodology of mental stress testing in cardiovascular research. *Circulation* 83:II14-II24, 1991.
61. ALAM, M., SMIRK, F.H. Observations in man upon a blood pressure raising reflex arising from the voluntary muscles. **Journal of Physiology** 89:372-383, 1937.
62. TROMBETTA, I.C. et al. Gly16+Glu27  $\beta_2$ -adrenoceptor polymorphisms cause increased forearm blood flow responses to mental stress and handgrip in humans. **Journal of Applied Physiology** 98:787-794, 2005.
63. RAY, C.E., MARK, A.L. Sympathetic adjustments to exercise: insights from microneurographic recordings. In: HAINSWORTH, E., MARK, A.L. Cardiovascular reflex control in health and disease. Saunders, p.137-164, 1993.
64. TROMBETTA, I.C. **Estudo do controle neurovascular em mulheres obesas portadoras de polimorfismo dos receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos**. 2002. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2002.
65. LOURES, D.L. et al. Estresse mental e sistema cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** 78:525-530, 2002.
66. KRANTZ, D.S., MANUCK, S.B. Acute psychophysiologic reactivity and risk of cardiovascular disease: A review and methodologic critique. **Psychological Bulletin** 96:435-464, 1984.
67. SHERWOOD, A. et al. Endothelial function and hemodynamic responses during mental stress. **Psychosomatic Medicine** 61:365-370, 1999.
68. DANIELS, S.R. et al. American Heart Association Childhood Obesity Research Summit Report. **Circulation** 119:e489-e517, 2009.
69. KUCZMARSKI, R.J. et al. CDC growth charts: United States. **Advanced Data From Vital and Health Statistics** 314:1-28, 2000.
70. OGDEN, C.L. et al. Prevalence of high body mass index in US children and adolescents, 2007-2008. **Journal of the American Medical Association** 303:242-249, 2010.
71. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA 2010. Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009.

- 72.MIRANDA, J.A., GODOY, D.M., LATERZA, M.C. Efeitos do treinamento físico na obesidade. **Suplemento da Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo** 21:3-6, 2011, no prelo.
- 73.LEE, Y.S. Consequences of childhood obesity. **Annual of Academy Medical Singapore** 38:75-81, 2009.
- 74.SOROF, J., DANIELS, S. Obesity hypertension in children. A problem of epidemic proportions. **Hypertension** 40:441-447, 2002.
- 75.WOO, K.S. et al. Overweight in children is associated with arterial endothelial dysfunction and intima-media thickening. **International Journal of Obesity** 28:852-857, 2004.
- 76.AGGOUN, Y. et al. Impaired endothelial and smooth muscle functions and arterial stiffness appear before puberty in obese children and are associated with elevated ambulatory blood pressure. **European Heart Journal** 29:792-799, 2008.
- 77.LAMOTTE, C. et al. Increased intima-media thickness of the carotid artery in childhood: a systematic review of observational studies. **European Journal of Pediatrics** *In Press*, 2010.
- 78.CARLETTI, L. et al. Blood pressure response to physical exertion in adolescents: Influence of overweight and obesity. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** 91:24-28, 2008.
- 79.RIBEIRO, M.M. et al. Diet and exercise training restore blood pressure and vasodilatory responses during physiological maneuvers in obese children. **Circulation** 111:1915-1923, 2005.

### **3 Estudo 1- Efeitos dos Polimorfismos da eNOS no Comportamento Pressórico Durante o Exercício Físico e Estresse Mental de Crianças e Adolescentes Saudáveis**

#### **3.1 Introdução**

A enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) é fundamental na promoção da síntese do óxido nítrico (NO) (MARLETTA, 1993). Por ser um dos principais agentes vasodilatadores endógenos, o NO exerce importante papel na regulação do tônus vascular e nos níveis pressóricos (ALBRECHT, 2003; ANDREW, 1999). De fato, a redução na expressão proteica da eNOS e, conseqüente, diminuição na biodisponibilidade de óxido nítrico está diretamente associada à elevação da pressão arterial (FORTE, 1997; NODE, 1997; KLAHR, 2001).

Adicionalmente, tem sido identificado que polimorfismos, variações em um único nucleotídeo da sequência de bases do gene, podem prejudicar, no indivíduo adulto, a expressão proteica e/ou a atividade funcional da eNOS (HINGORANI, 2000; GODFREY, 2007; WANG, 2000). Recentemente, três polimorfismos do gene da eNOS, tem sido envolvidos na patogênese da hipertensão arterial: T-786C, caracterizado pela troca de uma timina por uma citosina no par de base -786 da região promotora; Glu289Asp, caracterizado pela troca de uma guanina por uma timina no par de base 894 do exon 7, que promove, na proteína expressa, a substituição de um glutamato por um aspartato na posição 289 da eNOS e; 4a/4b, caracterizado pela repetição de 4, ao invés de 5, sucessivos 27 pares de bases na região do intron 4 (CRUZ-GONZÁLEZ, 2009; KISHIMOTO, 2004; MYIAMOTO, 1998; SRIVASTAVA, 2007; ZINTZARAS, 2006).

Porém, na infância esses polimorfismos parecem ainda não produzir efeitos na hemodinâmica de repouso, uma vez que Souza-Costa e colaboradores (2010) ao avaliarem a influência dos polimorfismos T-786C, Glu289Asp e 4a/4b na pressão arterial de crianças e adolescentes, não observaram diferenças significativas entre os grupos portadores e não portadores de genótipo polimórfico. Por outro lado, não sabemos se em situações de estresse fisiológico, nas quais, em condições normais

há aumento na expressão proteica da eNOS (MONCADA, 2006), esses polimorfismos interferem nos níveis pressóricos.

### **3.2 Objetivo**

Avaliar os efeitos dos polimorfismos T-786C, Glu289Asp e 4a/4b do gene da eNOS nos níveis de pressão arterial, durante o exercício isométrico e estresse mental, de crianças e adolescentes saudáveis.

### 3.3 Métodos

#### 3.3.1 Amostra

Foram selecionados para este estudo, vinte e oito crianças e adolescentes, do Ambulatório de Endocrinologia Infantil do Instituto da Criança e do Adolescente de Juiz de Fora, que contemplaram os seguintes critérios de inclusão: 1) Idade entre 8 e 17 anos; 2) Eutróficos quanto ao índice de massa corporal (IMC); 3) Não estar sob uso de qualquer medicação; 4) Ausência de patologias metabólicas, cardiovasculares e/ou hormonais e 5) Não estar regularmente engajados em programas de esportes ou exercício físico, exceto as aulas de educação física escolar. Aos representantes legais e aos voluntários, foram explicados todos os procedimentos da pesquisa e, após concordância de ambos, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1) foi assinado. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora (parecer 0051/2009).

#### 3.3.2 Antropometria

O peso corporal foi medido com os voluntários usando roupas leves, sem calçados, pela balança da marca Asimed, com precisão de 0,1 Kg. A estatura, foi medida com os voluntários sem calçados em estadiômetro acoplado à balança Asimed, com precisão de 0,1 cm. O IMC foi calculado dividindo o peso corporal (Kg) pela altura (m) ao quadrado. A eutrofia foi definida pelo valor de IMC entre os percentis 5 e 85, considerando a idade e o gênero (KUCZMARSKI, 2000).

### 3.3.3 Lipidograma

Pela manhã, após jejum de 12 horas, foram coletados 5 mLs de sangue por punção venosa para avaliação do colesterol total, triglicerídeos e lipoproteína de alta densidade (HDL). O sangue coletado foi adicionado a um tubo a vácuo sem anticoagulante para separação de soro. O colesterol total, triglicerídeos e a HDL foram determinados por métodos enzimáticos com reagentes comerciais (Labtest Diagnóstica, Brasil). A lipoproteína de baixa densidade (LDL) foi calculada pela fórmula de Friedewald (FRIEDEWALD, 1972).

### 3.3.4 Determinação do Genótipo

Para as genotipagens, 5 mLs de sangue foram anticoagulados com ácido etilenodiamino tetra-acético e separados para extração do DNA genômico (SAMBROOK, 2001). A análise genotípica dos polimorfismos T-786C e Glu289Asp foi realizada utilizando a amplificação pela técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real, pelo sistema de detecção de fluorescência (SOUZA-COSTA, 2010) e o polimorfismo 4a/4b, pela técnica de PCR seguida de eletroforese.

#### *Determinação dos polimorfismos T-786C e Glu289Asp*

Os genótipos para os polimorfismos T-786C e Glu298Asp foram determinados por meio de ensaio de discriminação *Taqman Allele* e PCR em tempo real pelo Chromo 4 Detector (Bio-Rad Laboratórios, Hercules, CA, EUA) (SOUZA-COSTA, 2010).

Desta forma, foram determinadas as variações genotípicas localizadas no par de base -786 da região promotora do gene da eNOS, e identificados os seguintes genótipos: -786TT (selvagem homocigoto), -786TC (polimórfico heterocigoto) ou -786CC (polimórfico homocigoto). Do mesmo modo, as variações genotípicas localizadas no par de base 894 do exon 7 do gene da eNOS, foram determinadas e

identificados os seguintes genótipos: 289Glu (selvagem homocigoto), 289Glu/Asp (polimórfico heterocigoto) e 289Asp (polimórfico homocigoto).

#### *Determinação do polimorfismo 4a/4b*

Os genótipos para o polimorfismo no intron 4 foram determinados por PCR, usando primers 5'-AGG CCC TAT GGT AGT GCC TTT-3'(sense) e 5'-TCT CTT AGT GCT GTG GTC AC-3'(antisense). A PCR foi realizada em volume de reação que incluía aproximadamente 100 ng de modelo genômico de DNA, 10pmol de cada primer, 200 µM de cada dNTP, 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 µl de 10x buffer de PCR e 5U de DNA Taq Polimerase (Promega, Madison, WI). A mistura da PCR foi aquecida a 94°C por 4 minutos para desnaturação e passou por 35 ciclos a 94°C com duração de 30 segundos cada, para desnaturação, 63°C por 30 segundos para anelamento e 72°C por 1 minuto para extensão. Finalmente, a extensão foi aquecida a 72°C por 5 minutos e os fragmentos de 339, 393, 420 e 447 pares de bases correspondentes aos alelos da eNOS 4y, 4a, 4b e 4c respectivamente, foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% e visualizado por coloração de prata (MARRONI, 2005).

Desta forma, foram determinadas as variações genóticas localizadas no intron 4 do gene da eNOS, e identificados os seguintes genótipos: 4b/4b (selvagem homocigoto), 4a/4b (polimórfico heterocigoto) ou 4a/4a (polimórfico homocigoto).

#### 3.3.5 Atividade Física Habitual

A atividade física foi avaliada por meio do Questionário para Avaliar Atividade Física Habitual (FLORINDO, 2006), que permite quantificar anualmente o tempo dedicado à atividade física habitual (Anexo 2).

### 3.3.6 Modulação Autonômica Cardíaca

Os voluntários foram orientados previamente a não ingerir bebidas estimulantes e a não realizar exercícios físicos nas vinte e quatro horas antecedentes ao estudo.

Assim, a modulação autonômica cardíaca foi avaliada pelo o método indireto de variabilidade da frequência cardíaca (VFC). Os batimentos cardíacos foram registrados continuamente pelo cardiofrequencímetro Polar S810i, em repouso, na posição supina, em respiração espontânea, pelo período de dez minutos.

Os valores pontuais dos intervalos entre cada batimento cardíaco (iRR) foram transferidos ao microcomputador, pela transmissão de dados do receptor de pulso para o *software Polar Precision Performance*. Posteriormente, os dados foram transferidos para o aplicativo Matlab, versão 6.0, para seleção automática dos cinco minutos de menor variância que foram utilizados para o cálculo da VFC, por meio de uma rotina previamente implementada (LOPES, 2007). As séries temporais com duração de 5 minutos selecionadas foram transferidas para o software Kubios HRV Analysis, versão 2.0 (SHULTZ, 2011). Neste aplicativo foi realizada a correção de artefatos utilizando o filtro de nível médio do software e foram calculados os índices de VFC no domínio do tempo (MNN, SDNN, RMSSD, pNN50). Posteriormente foi realizada interpolação por meio da *spline* cúbica a uma frequência de 4Hz e a remoção da componente de tendência da série temporal, pelo método de suavização a priori (TARVEINEN, 2002). A estimativa da função densidade espectral de potência, foi realizada pelo método não paramétrico da Transformada Rápida de Fourier (MALIK, 1995). Para a análise espectral da VFC, foram consideradas as bandas de baixa frequência (LF – 0,04 a 0,15 Hz) e de alta frequência (HF – 0,15 a 0,4 Hz) do espectro de potência, expressas em potência absoluta ( $\text{ms}^2$ ) e em unidades normalizadas (un), além da razão LF/HF.

### 3.3.7 Pressão Arterial Clínica

A pressão arterial foi aferida após 15 minutos em repouso na posição supina, de forma não-invasiva, no membro superior direito, pelo método auscultatório, utilizando-se esfigmomanômetro de coluna de mercúrio da marca Takaoka® (VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2007). Foram adotados tamanhos adequados de manguito, de acordo com a circunferência do braço, conforme recomendações da VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (2007).

### 3.3.8 Pressão Arterial Durante o Protocolo Experimental

A pressão arterial durante o protocolo experimental foi realizada de forma não-invasiva, minuto a minuto, no membro inferior direito, em posição supina, pelo método oscilométrico, por meio do monitor portal DIXTAL® 2020. Foram adotados tamanhos adequados de manguito, de acordo com a circunferência do tornozelo (RIBEIRO, 2005).

### 3.3.9 Frequência Cardíaca Durante o Protocolo Experimental

A frequência cardíaca foi monitorada continuamente, durante todo o protocolo experimental, utilizando o cardiofrequencímetro Polar S810i®.

### 3.3.10 Exercício Isométrico de Preensão de Mão

Inicialmente, o dinamômetro para membros superiores (Jamar®), foi mostrado ao voluntário e explicado como seria a realização do teste de preensão de mão para

avaliação da contração voluntária máxima. Após esta explicação inicial, o voluntário manuseou o aparelho e foi solicitado que realizasse uma contração “leve”, com intuito de familiarização com teste. Logo após, o voluntário realizou três contrações máximas, sendo adotado como máximo o valor médio das três tentativas de exercício físico isométrico de preensão de mão, com o membro dominante. Em seguida, o voluntário permaneceu em repouso por cinco minutos.

O protocolo foi composto por três minutos, com o voluntário em posição supina (condição basal), seguido de três minutos de exercício físico isométrico de preensão de mão, a 30% da contração voluntária máxima (RIBEIRO, 2005). Principalmente, durante o exercício físico as crianças e adolescentes foram instruídos a respirarem normalmente e a não realizarem a manobra de Valsalva. Ao longo de todo este protocolo a pressão arterial foi medida minuto a minuto e a frequência cardíaca registrada continuamente.

### 3.3.11 Estresse Mental

O protocolo de estresse mental foi realizado por meio do Teste de Cores (*Stroop Color Word Test*) (STROOP, 1935; MIDDLEKAUFF, 1997). Este teste consiste de uma tabela com uma série de nomes de cores escritos com tinta diferente daquela do significado da palavra (Figura 1). Foi solicitado ao voluntário falar a cor da tinta e não o significado da palavra, em voz alta, o mais rápido possível, sendo gentilmente advertido no caso de erro.

O protocolo foi realizado com o voluntário em posição supina, por três minutos em repouso (condição basal), seguido de dois minutos de estresse mental (RIBEIRO *et al.*, 2005). Ao final do teste, foi perguntado ao voluntário o grau de dificuldade do teste de cores a partir de uma tabela padrão de grau de dificuldade: 0= não estressante, 1= pouco estressante, 2= estressante, 3= muito estressante, 4= extremamente estressante.

Ao longo de todo este protocolo a pressão arterial foi medida minuto a minuto e a frequência cardíaca registrada continuamente.



**Figura 1.** Representação do Teste de Confusão de Cores (*Stroop Color Word Test*) (STROOP, 1935).

### 3.3.12 Protocolo Experimental

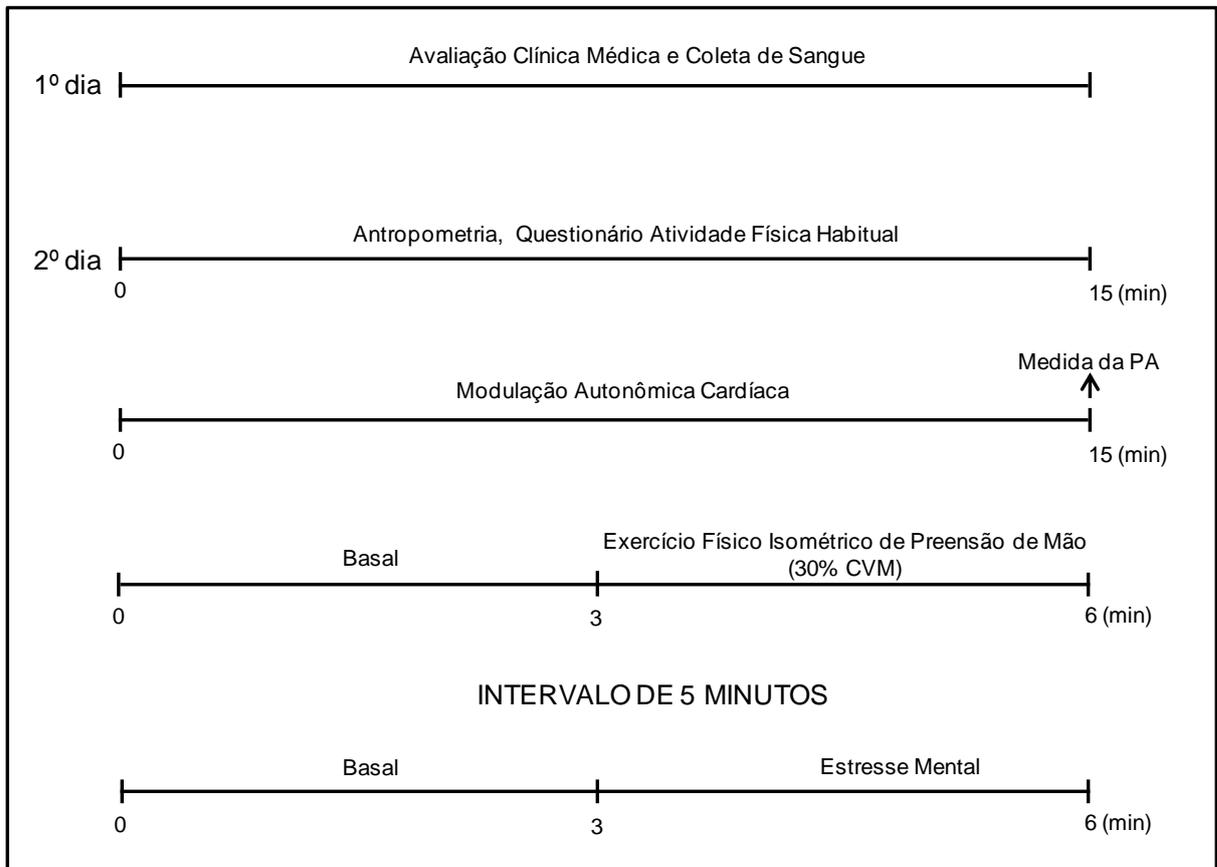
O protocolo experimental teve início no Ambulatório de Endocrinologia Infantil do Instituto da Criança e do Adolescente de Juiz de Fora, onde os voluntários foram avaliados clinicamente por uma médica endocrinologista. Após a avaliação clínica, foi realizada a coleta sanguínea, para a realização do lipidograma e da genotipagem.

Em seguida os voluntários foram encaminhados à Unidade de Avaliação Física do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora, onde foram realizadas as avaliações posteriores, sempre no período da tarde.

Todas as crianças e adolescentes que participaram deste estudo, estavam acompanhadas por seus representantes legais em todos os momentos da pesquisa.

Após a assinatura do termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foi realizada uma entrevista para investigar possíveis impedimentos para a realização do protocolo experimental. Em seguida, foi aplicado o questionário para avaliar a atividade física habitual seguido da antropometria. Logo após, o voluntário foi acomodado em posição supina e permaneceu em repouso por quinze minutos, então as variáveis hemodinâmicas de repouso (pressão arterial e frequência cardíaca) foram medidas.

Por fim, foram realizados os protocolos de exercício físico isométrico de preensão de mão e estresse mental. A figura 2, esquematiza a linha temporal do protocolo experimental.



**Figura 2.** Linha temporal do protocolo experimental. PA = pressão arterial, CVM = contração voluntária máxima.

### 3.3.13 Divisão dos Grupos

Os voluntários foram divididos em grupos de acordo com a presença (grupo polimórfico) ou ausência (grupo selvagem) do genótipo polimórfico, em cada região avaliada (T-786C, Glu289Asp e 4a/4b). Assim o grupo polimórfico do polimorfismo T-786C foi constituído por indivíduos portadores do genótipo TC, e pelos indivíduos portadores do genótipo CC (TC+CC), do polimorfismo Glu289Asp por indivíduos portadores do genótipo Glu/Asp, e pelos indivíduos portadores do genótipo Asp/Asp (Glu/Asp+Asp/Asp) e, do polimorfismo 4a/4b por indivíduos portadores de genótipo ab, e pelos indivíduos portadores do genótipo aa (aa+ab). O grupo selvagem do polimorfismo T-786C por indivíduos portadores do genótipo TT, do polimorfismo

Glu289Asp por indivíduos portadores do genótipo Glu/Glu e do polimorfismo 4a/4b constituído por indivíduos portadores de genótipo bb (Tabela 1).

**Tabela 1** - Divisão dos Grupos de Acordo com o Genótipo Para os Polimorfismos T-786C, Glu289Asp e 4a/4b da Enzima Óxido Nítrico Sintase Endotelial

Região	Polimórfico (n)	Selvagem (n)
<b>T-786C</b>	TC+CC (9)	TT (19)
<b>Glu289Asp</b>	Glu/Asp+Asp/Asp (14)	Glu/Glu (14)
<b>4a/4b</b>	aa+ab (15)	bb (13)

### 3.3.14 Análise Estatística

A distribuição dos genótipos para cada polimorfismo foi testada para desvio de *Hardy-Weinberg equilibrium* por meio do teste qui-quadrado.

Para testar a normalidade, as variáveis foram submetidas ao teste de *Shapiro-Wilk*. Desta forma, o teste *t* de *Student* (variáveis com distribuição normal) ou o teste *Mann-Whitney* (variáveis sem distribuição normal) foram utilizados para testar as possíveis diferenças entre as características físicas, lipídicas, hemodinâmicas e autonômicas entre os grupos polimórfico e selvagem. A análise de variância de dois fatores (*Anova two-way*) para medidas repetidas foi utilizada para testar as possíveis diferenças nas variáveis hemodinâmicas, frente ao exercício físico isométrico de prensão de mão e estresse mental, e entre os grupos polimórfico e selvagem. Quando identificada diferença significativa, o teste *post hoc* de *Sheffé* foi aplicado. O teste qui-quadrado foi utilizado para testar as possíveis diferenças entre os grupos polimórfico e selvagem quanto ao grau de dificuldade do estresse mental. Para as análises do comportamento hemodinâmico foram consideradas a média aritmética dos três minutos do basal e o pico da resposta pressórica de cada teste, sendo o terceiro minuto no exercício físico isométrico de prensão de mão e segundo minuto no estresse mental.

Para todas essas análises, foi adotado como significativo  $p \leq 0,05$  e os dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão.

### 3.4 Resultados

A frequência de distribuição dos genótipos para os polimorfismos T-786C, Glu289Asp e 4a/4b não mostrou desvio de *Hardy-Weinberg equilibrium* ( $p = 0,20$ ,  $p = 0,10$ ,  $p = 0,10$ , respectivamente) (Tabela 2).

**Tabela 2** - Frequência e Distribuição dos Genótipos dos Polimorfismos T-786C, Glu289Asp e 4a/4b da Enzima Óxido Nítrico Sintase Endotelial

Região	Genótipos	Frequência (n)
<b>T-786C</b>	TT	68% (19)
	TC	29% (8)
	CC	3% (1)
<b>Glu289Asp</b>	Glu/Glu	50% (14)
	Glu/Asp	46% (13)
	Asp/Asp	4% (1)
<b>4a/4b</b>	bb	46% (13)
	ab	50% (14)
	aa	4% (1)

#### 3.4.1 Polimorfismo T-786C

Na tabela 3 são apresentadas as características físicas, lipídicas e hemodinâmicas dos grupos polimórfico (TC+CC) e selvagem (TT). Os grupos foram semelhantes para idade, peso, altura, IMC percentil, percentual de gordura corporal, tempo dedicado a atividade física no último ano, força correspondente a 30% da contração voluntária máxima, colesterol total, LDL, triglicérides, pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, pressão arterial média e frequência cardíaca. O nível da HDL foi significativamente maior no grupo polimórfico quando comparado ao grupo selvagem.

Os dados referentes à modulação autonômica cardíaca basal são apresentados na tabela 4. As variáveis no domínio do tempo MNN, SDNN, RMSSD, pNN50, assim como, as variáveis no domínio da frequência LF (ms<sup>2</sup>), HF (ms<sup>2</sup>), LF (un), HF (un), LF/HF, foram semelhantes entre os grupos polimórfico e selvagem.

**Tabela 3** - Características Físicas, Lipídicas e Hemodinâmicas dos Grupos Polimórfico (TC+CC) e Selvagem (TT) do Polimorfismo T-786C da Enzima Óxido Nítrico Sintase Endotelial

Variáveis	Polimórfico (TC+CC)	Selvagem (TT)	p
<i>Características Físicas</i>			
Idade (anos)	11,8 ± 0,8	13,2 ± 0,6	0,194
Peso (kg)	42,4 ± 4,4	45,8 ± 2,4	0,460
Altura (m)	1,52 ± 0,06	1,52 ± 0,02	0,927
IMC (percentil)	36,7 ± 8,9	51,1 ± 5,0	0,139
Atividade Física (escore anual)	5187 ± 1240	7535 ± 1989	0,446
30% da CVM (Kgf)	6,4 ± 1,0	6,8 ± 0,5	0,695
<i>Características Lipídicas</i>			
Colesterol Total (mg/dL)	136,5 ± 4,7	131,3 ± 6,3	0,609
LDL (mg/dL)	71,4 ± 4,3	74,8 ± 5,4	0,701
HDL (mg/dL)	53,4 ± 5,9	40,6 ± 2,2	0,029
Triglicérides (mg/dL)	58,1 ± 5,1	79,8 ± 7,0	0,061
<i>Características Hemodinâmicas</i>			
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	107,6 ± 2,6	106,8 ± 1,7	0,817
Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	68,4 ± 4,3	65,7 ± 2,0	0,519
Pressão Arterial Média (mmHg)	81,5 ± 3,5	79,4 ± 1,4	0,516
Frequência Cardíaca (bpm)	71,8 ± 5,1	73,4 ± 2	0,725

Dados apresentados como média ± erro padrão. IMC = índice de massa corporal, CVM = contração voluntária máxima, LDL = lipoproteína de baixa densidade, HDL = lipoproteína de alta densidade.

**Tabela 4** - Modulação Autonômica Cardíaca dos Grupos Polimórfico (TC+CC) e Selvagem (TT) do Polimorfismo T-786C da Enzima Óxido Nítrico Sintase Endotelial

Variáveis	Polimórfico (TC+CC)	Selvagem (TT)	p
<i>Domínio do Tempo</i>			
MNN (ms)	880,4 ± 94,0	819,4 ± 24,8	0,840
SDNN (ms)	49,4 ± 4,8	57,9 ± 5,4	0,372
RMSSD (ms)	62,9 ± 8,7	69,7 ± 7,8	0,632
pNN50 (%)	40, ± 6,9	43 ± 5,6	0,795
<i>Domínio da Frequência</i>			
LF (ms <sup>2</sup> )	753,3 ± 143,5	1187,2 ± 237,2	0,435
HF (ms <sup>2</sup> )	1263,4 ± 148,5	1911,4 ± 373,7	0,795
LF (un)	36,5 ± 3,1	41,1 ± 3,3	0,429
HF (un)	63,5 ± 3,1	58,9 ± 3,3	0,429
LF/HF	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,157

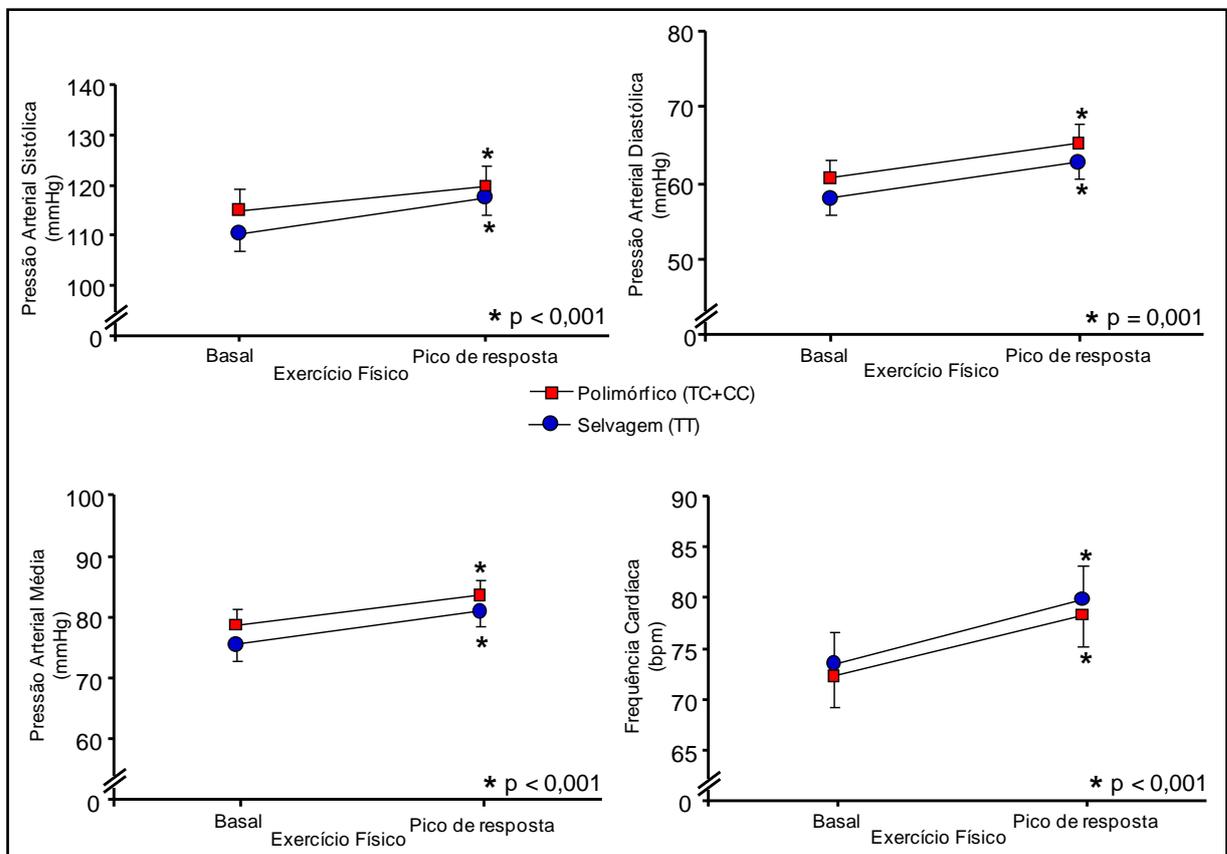
Dados apresentados como média ± erro padrão. MNN = média dos intervalos NN, SDNN = desvio padrão dos intervalos NN, RMSSD = raiz média quadrática das diferenças de batimentos sucessivos, pNN50 = proporção entre os intervalos NN sucessivos com diferença de duração superior a 50 ms e o número total de intervalos NN, LF = banda de baixa frequência (0,04-0,15 Hz), HF = banda de alta frequência (0,15-0,4 Hz), PT = potência total.

#### *Exercício Físico Isométrico de Preensão de Mão*

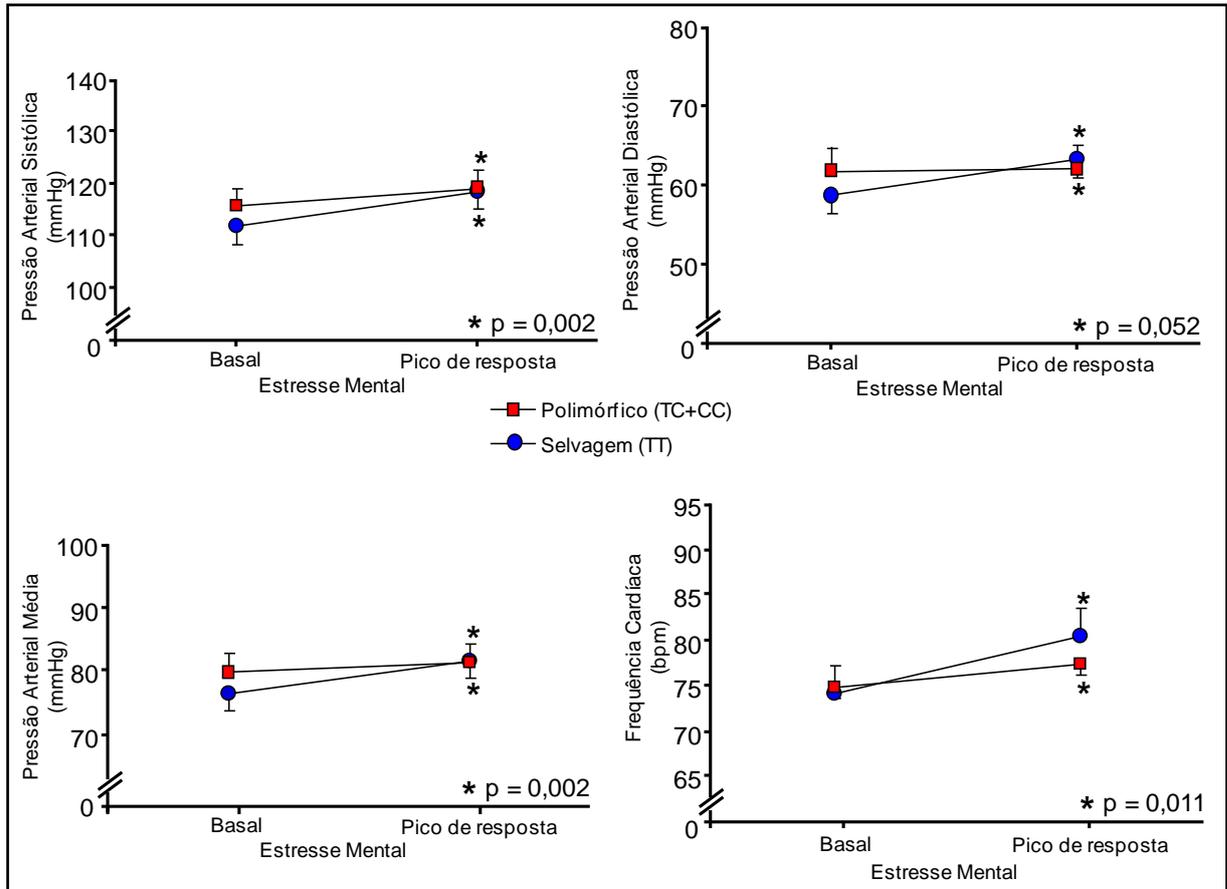
No período basal e no pico de resposta ao exercício físico isométrico de preensão de mão, os valores de pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, pressão arterial média e frequência cardíaca foram semelhantes entre os grupos polimórfico e selvagem. E, quando comparado, o pico de resposta com o valor basal, todas as medidas hemodinâmicas aumentaram significativamente e similarmente em ambos os grupos (Figura 3).

### Estresse Mental

No período basal e no pico de resposta ao estresse mental, os valores de pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, pressão arterial média e frequência cardíaca foram semelhantes entre os grupos polimórfico e selvagem. E, quando comparado, o pico de resposta com o valor basal, todas essas medidas hemodinâmicas aumentaram significativamente e similarmente em ambos os grupos (Figura 4). O grau de dificuldade do estresse mental foi semelhante entre os grupos polimórfico ( $1 \pm 0,2$ ) e selvagem ( $1 \pm 0,2$ ) ( $p = 0,961$ ).



**Figura 3.** Controle hemodinâmico durante o exercício físico isométrico de preensão de mão dos grupos polimórfico (TC+CC) e selvagem (TT) do polimorfismo T-786C da enzima óxido nítrico sintase endotelial. \* = diferença vs. basal.



**Figura 4.** Controle hemodinâmico durante o estresse mental dos grupos polimórfico (TC+CC) e selvagem (TT) do polimorfismo T-786C da enzima óxido nítrico sintase endotelial. \* = diferença vs. basal.

### 3.4.2 Polimorfismo Glu289Asp

Na tabela 5 são apresentadas as características físicas, lipídicas e hemodinâmicas dos grupos polimórfico (Glu/Asp+Asp/Asp) e selvagem (Glu/Glu). Os grupos são semelhantes para idade, peso, altura, IMC percentil, percentual de gordura corporal, tempo dedicado a atividade física no último ano, a força correspondente a 30% da contração voluntária máxima, colesterol total, LDL, HDL, triglicérides, pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, pressão arterial média e frequência cardíaca.

Os dados referentes à modulação autonômica cardíaca são apresentados na tabela 6. As variáveis no domínio do tempo MNN, SDNN, RMSSD, pNN50, assim

como as variáveis no domínio da frequência LF (ms<sup>2</sup>), HF (ms<sup>2</sup>), LF (un), HF (un), LF/HF, foram semelhantes entre os grupos polimórfico e selvagem.

**Tabela 5** - Características Físicas, Lipídicas e Hemodinâmicas dos Grupos Polimórficos (Glu/Asp+Asp/Asp) e Selvagem (Glu/Glu) do Polimorfismo Glu289Asp da Enzima Óxido Nítrico Sintase Endotelial

Variáveis	Polimórfico (Glu/Asp+Asp/Asp)	Selvagem (Glu/Glu)	p
<i>Características Físicas</i>			
Idade (anos)	13,1 ± 0,8	12,4 ± 0,5	0,477
Peso (kg)	45,9 ± 3,2	43,6 ± 2,8	0,592
Altura (m)	1,55 ± 0,04	1,49 ± 0,03	0,279
IMC (percentil)	40,4 ± 6,7	52,1 ± 5,7	0,192
Atividade Física (escore anual)	7994 ± 2537	10140 ± 3708	0,782
30% CVM (Kgf)	7,2 ± 0,7	6,1 ± 0,5	0,228
<i>Características Lipídicas</i>			
Colesterol Total (mg/dl)	131,1 ± 3,7	134,8 ± 7,6	0,704
LDL (mg/dl)	68,1 ± 3,5	77,4 ± 6,3	0,270
HDL (mg/dl)	50,0 ± 5,1	42,1 ± 2,3	0,188
Triglicérides (mg/dl)	65,0 ± 6,7	76,4 ± 7,8	0,328
<i>Características Hemodinâmicas</i>			
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	109,4 ± 2,1	104,7 ± 1,7	0.093
Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	66,9 ± 3,2	66,4 ± 2,2	0.899
Pressão Arterial Média (mmHg)	81,0 ± 2,3	79,1 ± 1,7	0.517
Frequência Cardíaca (bpm)	72,6 ± 3,6	73,1 ± 2,2	0.892

Dados apresentados como média ± erro padrão. IMC = índice de massa corporal, CVM = contração voluntária máxima, LDL = lipoproteína de baixa densidade, HDL = lipoproteína de alta densidade.

**Tabela 6** - Modulação Autonômica Cardíaca Basal dos Grupos Polimórfico (Glu/Asp+Asp/Asp) e Selvagem (Glu/Glu) do polimorfismo Glu289Asp da Enzima Óxido Nítrico Sintase Endotelial.

<b>Variáveis</b>	<b>Polimórfico (Glu/Asp+Asp/Asp)</b>	<b>Selvagem (Glu/Glu)</b>	<b>p</b>
<i>Domínio do Tempo</i>			
MNN (ms)	857,9 ± 53,1	813,7 ± 31,0	0,436
SDNN (ms)	53,8 ± 6,2	57,5 ± 5,7	0,665
RMSSD (ms)	61,5 ± 7,4	74,2 ± 9,7	0,312
pNN50 (%)	41,9 ± 6,4	42,8 ± 6,4	0,922
<i>Domínio da Frequência</i>			
LF (ms <sup>2</sup> )	1092,3 ± 303,9	991,3 ± 219,1	0,939
HF (ms <sup>2</sup> )	1530,2 ± 286,9	1943,7 ± 486,2	0,858
LF (un)	41,4 ± 2,3	38,3 ± 4,6	0,555
HF (un)	58,6 ± 2,3	61,7 ± 4,6	0,555
LF/HF	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,626

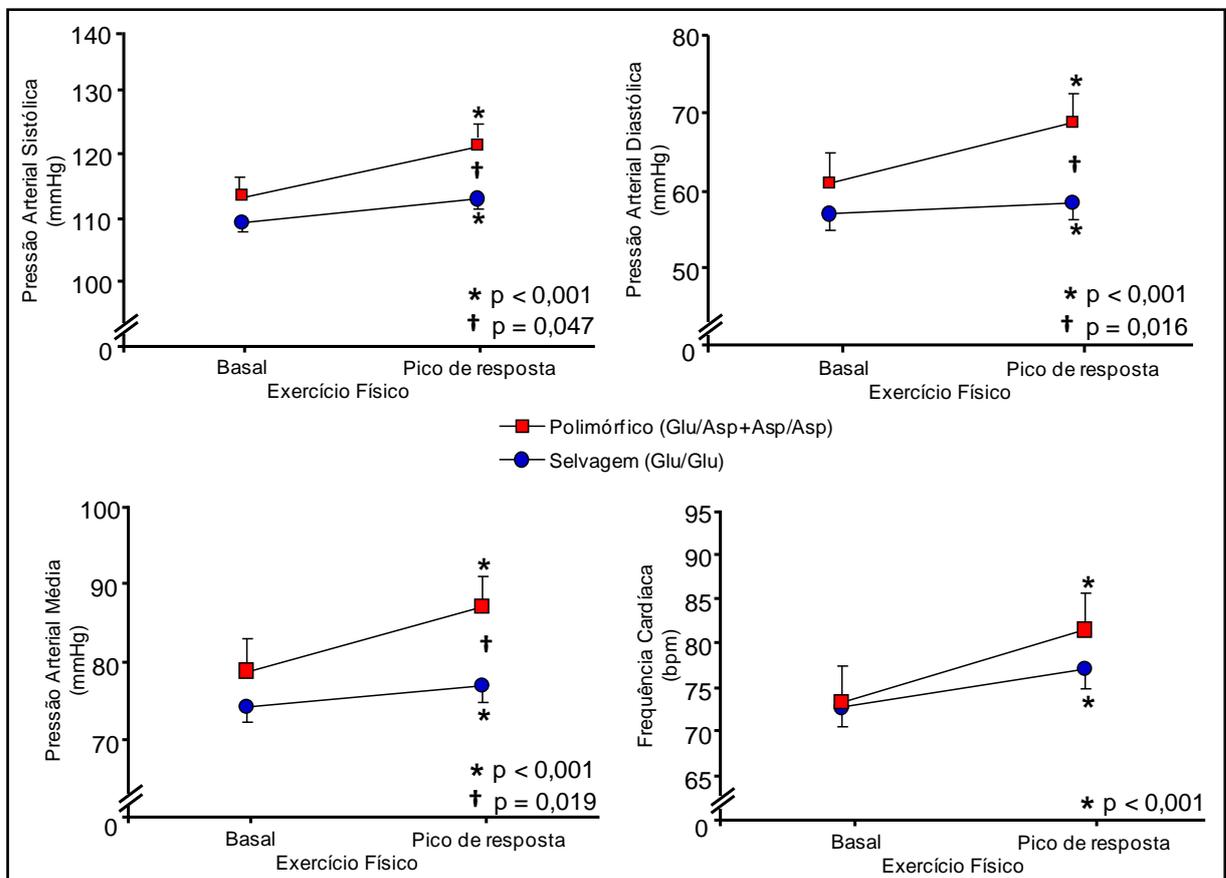
Dados apresentados como média ± erro padrão. MNN = média dos intervalos NN, SDNN = desvio padrão dos intervalos NN, RMSSD = raiz média quadrática das diferenças de batimentos sucessivos, pNN50 = proporção entre os intervalos NN sucessivos com diferença de duração superior a 50 ms e o número total de intervalos NN, LF = banda de baixa frequência (0,04-0,15 Hz), HF = banda de alta frequência (0,15-0,4 Hz), PT = potência total.

#### *Exercício Físico Isométrico de Preensão de Mão*

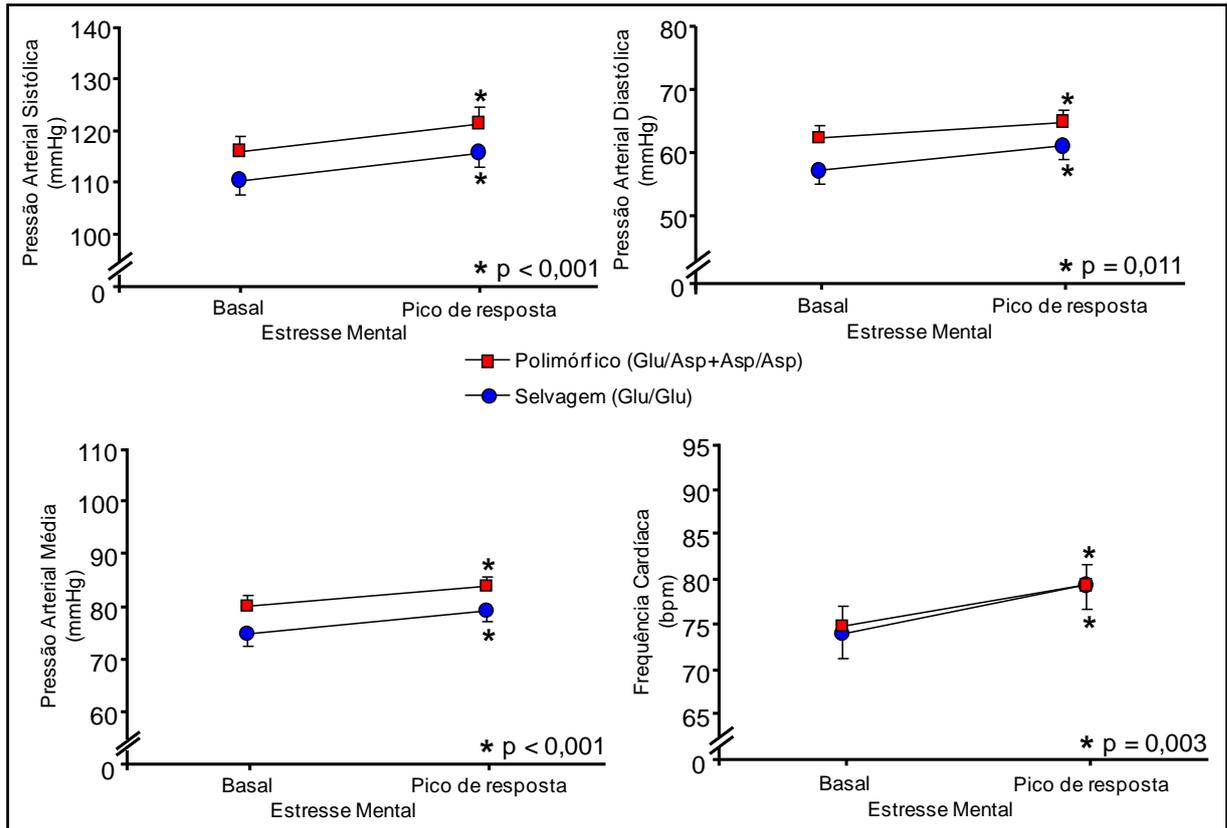
No período basal os valores da pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, pressão arterial média e frequência cardíaca foram similares entre os grupos polimórfico e selvagem. E, quando comparado o pico de resposta com o basal, os valores da pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e pressão arterial média aumentaram significativamente em ambos os grupos. Porém no grupo polimórfico esses aumentos foram significativamente maiores quando comparados ao grupo selvagem. A frequência cardíaca aumentou significativamente e similarmente entre os grupos (Figura 5).

### Estresse Mental

No período basal e no pico de resposta ao estresse mental os valores de pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, pressão arterial média e frequência cardíaca foram semelhantes entre os grupos polimórfico e selvagem. E, quando comparado, o pico de resposta com o basal, essas medidas hemodinâmicas aumentaram significativamente e similarmente em ambos os grupos (Figura 6). O grau de dificuldade do estresse mental foi semelhante entre os grupos polimórfico ( $1 \pm 0,2$ ) e selvagem ( $1 \pm 0,2$ ) ( $p = 0,995$ ).



**Figura 5.** Controle hemodinâmico durante o exercício físico isométrico de preensão de mão dos grupos polimórfico (Glu/Asp+Asp/Asp) e selvagem (Glu/Glu) do polimorfismo Glu289Asp da enzima óxido nítrico sintase endotelial. \* = diferença vs. basal; † = diferença polimórfico vs. selvagem.



**Figura 6.** Controle hemodinâmico durante o estresse mental dos grupos polimórfico (Glu/Asp+Asp/Asp) e selvagem (Glu/Glu) do polimorfismo Glu289Asp da enzima óxido nítrico sintase endotelial. \* = diferença vs. basal.

### 3.4.3 Polimorfismo 4a/4b

Na tabela 7 são apresentadas as características físicas, lipídicas e hemodinâmicas dos grupos polimórfico (ab+aa) e selvagem (bb). Os grupos são semelhantes para as variáveis idade, peso, altura, IMC percentil, percentual de gordura corporal, tempo dedicado a atividade física no último ano, a força correspondente a 30% da contração voluntária máxima, colesterol total, LDL, HDL, triglicérides, pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, pressão arterial média e frequência cardíaca.

Os dados referentes à modulação autonômica cardíaca são apresentados na tabela 8. As variáveis no domínio do tempo MNN, SDNN, RMSSD, pNN50, assim como as variáveis no domínio da frequência LF (ms<sup>2</sup>), HF (ms<sup>2</sup>), LF (un), HF (un), LF/HF, são similares entre os grupos polimórfico e selvagem.

**Tabela 7** - Características Físicas, Lipídicas e Hemodinâmicas dos Grupos Polimórficos (ab+aa) e Selvagem (bb) do Polimorfismo 4a/4b da Enzima Óxido Nítrico Sintase Endotelial

<b>Variáveis</b>	<b>Polimórfico (ab+aa)</b>	<b>Selvagem (bb)</b>	<b>p</b>
<i>Características Físicas</i>			
Idade (anos)	12,5 ± 0,6	12,9 ± 0,8	0,700
Peso (kg)	41,5 ± 2,0	48,5 ± 3,7	0,099
Altura (m)	1,50 ± 0,02	1,55 ± 0,04	0,319
IMC (percentil)	41,3 ± 5,8	51,9 ± 6,8	0,243
Atividade Física (escore anual)	8008 ± 2728	11234 ± 3701	0,482
30% da CVM (Kgf)	6,2 ± 0,4	7,2 ± 0,8	0,256
<i>Características Lipídicas</i>			
Colesterol Total (mg/dl)	136,8 ± 6,4	129,1 ± 5,9	0,434
LDL (mg/dl)	78,0 ± 5,0	68,2 ± 5,6	0,239
HDL (mg/dl)	44,3 ± 2,8	46,7 ± 4,9	0,694
Triglicérides (mg/dl)	72,0 ± 7,5	71,2 ± 7,5	0,945
<i>Características Hemodinâmicas</i>			
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	105,9 ± 2,1	108,5 ± 1,8	0,365
Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	66,8 ± 2,5	66,4 ± 3,1	0,916
Pressão Arterial Média (mmHg)	79,8 ± 2,1	80,4 ± 2,00	0,842
Frequência Cardíaca (bpm)	74,3 ± 2,0	71,2 ± 3,8	0,451

Dados apresentados como média ± erro padrão. IMC = índice de massa corporal, CVM = contração voluntária máxima, LDL = lipoproteína de baixa densidade, HDL = lipoproteína de alta densidade.

**Tabela 8** - Modulação Autonômica Cardíaca dos Grupos Polimórficos (ab+aa) e Selvagem (bb) do Polimorfismo 4a/4b da Enzima Óxido Nítrico Sintase Endotelial.

Variáveis	Polimórfico (ab+aa)	Selvagem (bb)	p
<i>Domínio do Tempo</i>			
MNN (ms)	806,9 ± 29,5	864,7 ± 53,3	0,555
SDNN (ms)	53,4 ± 4,7	57,8 ± 7,0	0,604
RMSSD (ms)	64,0 ± 6,9	71,7 ± 10,3	0,543
pNN50 (%)	38,2 ± 5,0	46,4 ± 7,3	0,364
<i>Domínio da Frequência</i>			
LF (ms <sup>2</sup> )	913,1 ± 183,6	1170,5 ± 323,1	0,608
HF (ms <sup>2</sup> )	1695,5 ± 305,1	1778,3 ± 482,1	0,590
LF (un)	36,0 ± 3,3	43,8 ± 3,7	0,130
HF (un)	64,0 ± 3,3	56,2 ± 3,7	0,130
LF/HF	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,118

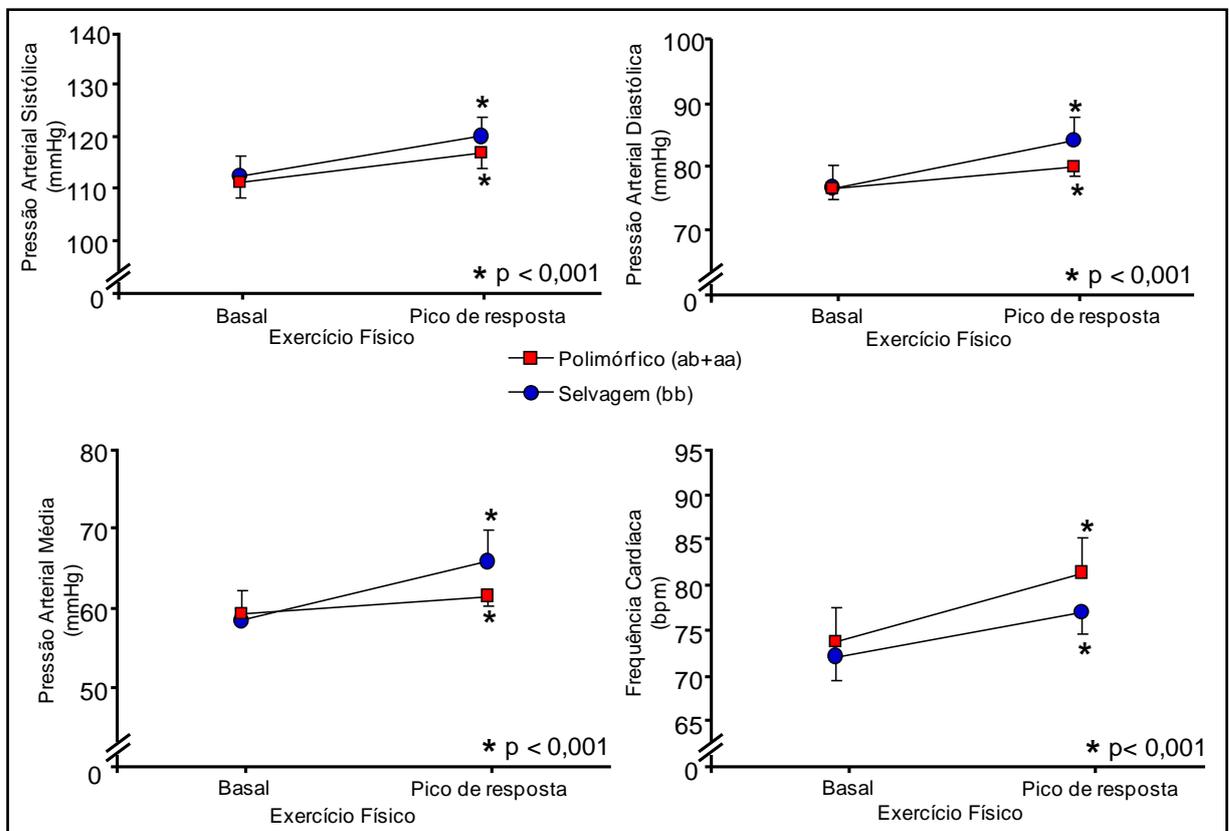
Dados apresentados como média ± erro padrão. MNN = média dos intervalos NN, SDNN = desvio padrão dos intervalos NN, RMSSD = raiz média quadrática das diferenças de batimentos sucessivos, pNN50 = proporção entre os intervalos NN sucessivos com diferença de duração superior a 50 ms e o número total de intervalos NN, LF = banda de baixa frequência (0,04-0,15 Hz), HF = banda de alta frequência (0,15-0,4 Hz), PT = potência total.

#### *Exercício isométrico de Preensão de Mão*

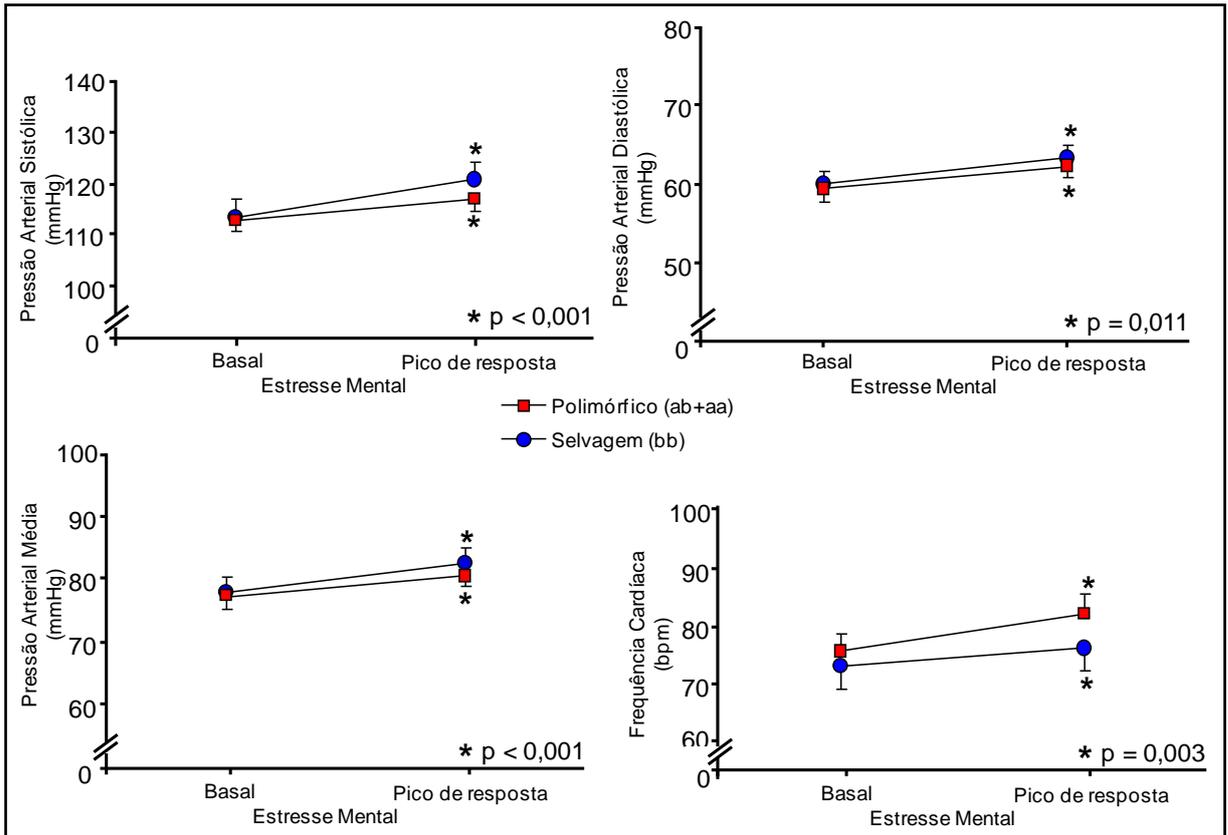
No período basal e no pico de resposta ao exercício físico isométrico de preensão de mão, os valores de pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, pressão arterial média e frequência cardíaca foram semelhantes entre os grupos polimórfico e selvagem. E, quando comparado, o pico de resposta com o basal, todas essas medidas hemodinâmicas aumentaram significativamente e similarmente em ambos os grupos (Figura 7).

### Estresse Mental

No período basal e no pico de resposta ao estresse mental os valores de pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, pressão arterial média e frequência cardíaca foram semelhantes entre os grupos polimórfico e selvagem. E, quando comparado, o pico de resposta com o basal, todas essas medidas hemodinâmicas aumentaram significativamente e similarmente em ambos os grupos (Figura 8). O grau de dificuldade do estresse mental foi semelhante entre os grupos polimórfico ( $1 \pm 0,2$ ) e selvagem ( $1 \pm 0,2$ ) ( $p = 0,958$ ).



**Figura 7.** Controle hemodinâmico durante o exercício físico isométrico de preensão de mão dos grupos polimórfico (ab+aa) e selvagem (bb) do polimorfismo 4a/4b da enzima óxido nítrico sintase endotelial. \* = diferença vs. basal.



**Figura 8.** Controle hemodinâmico durante o estresse mental (dos grupos polimórfico (ab+aa) e selvagem (bb) do polimorfismo 4a/4b da enzima óxido nítrico sintase endotelial. \* = diferença vs. basal.

### 3.5 Discussão

#### 3.5.1 Exon 7 (Glu289Asp)

O principal achado deste estudo foi que em crianças e adolescentes saudáveis, carreadoras do genótipo polimórfico (Glu/Asp+Asp/Asp) para o polimorfismo Glu289Asp, a resposta da pressão arterial no exercício físico isométrico de preensão de mão foi maior quando comparada a seus pares portadores do genótipo selvagem (Glu/Glu). Porém, ao longo de todo o teste de estresse mental os níveis de pressão arterial foram semelhantes entre esses os grupos.

Adultos jovens, carreadores do genótipo polimórfico do polimorfismo Glu289Asp, quando submetidos ao estresse mental, apresentam maiores níveis pressóricos quando comparados a não carreadores do polimorfismo Glu289Asp (MALHOTRA, 2004). Porém, este resultado foi dependente não só do genótipo polimórfico, mas também da presença da obesidade e/ou etnia africana. A novidade do nosso estudo foi que investigamos o efeito do polimorfismo Glu289Asp durante uma sessão de exercício físico agudo e uma situação estresse mental em crianças e adolescentes saudáveis. Portanto, em nosso estudo, somente o genótipo diferenciava os grupos.

A presença do genótipo polimórfico para o polimorfismo Glu289Asp, em indivíduos adultos, está associada à redução na atividade ou na estabilidade proteica da eNOS, o que resulta em menor liberação de NO (JOSHI, 2007; MALHOTRA, 2004; SENTHIL, 2005; TESAURO, 2000), fisiologicamente, esta característica explica a maior prevalência de hipertensão arterial nessa população. Porém, podemos suspeitar que na infância a presença desse polimorfismo ainda não gerou o fenótipo hipertensivo. Porque em nosso estudo, e de outros autores (SOUZA-COSTA, 2010; BARÁTH, 2004), os níveis de pressão arterial clínica foram semelhantes entre crianças e adolescentes carreadoras ou não do genótipo polimórfico.

Em situações dinâmicas, tem sido observado que a infusão do inibidor da síntese de NO (L-NMMA) não provoca a esperada redução da vasodilatação

muscular esquelética em indivíduos adultos com o polimorfismo Glu289Asp, indicando que a síntese do NO já estava comprometida neste grupo (DIAS, 2009). E, de fato, em nosso estudo, podemos suspeitar que a baixa produção do NO, nas crianças e adolescentes com o polimorfismo Glu289Asp, justifica a maior pressão arterial no exercício físico.

Outro fator que explicaria a resposta exacerbada da pressão arterial é a disfunção autonômica cardíaca. Porém em nosso estudo a modulação autonômica cardíaca, avaliada de maneira indireta pela variabilidade da frequência cardíaca, não foi diferente entre os grupos polimórfico e selvagem para o polimorfismo Glu289Asp da eNOS. Esses resultados estão de acordo com os resultados da medida direta da atividade nervosa simpática periférica, que também foi semelhante entre esses grupos, não só no repouso, mas também durante o exercício físico (DIAS, 2009).

Entretanto, no estresse mental, não observamos maiores níveis pressóricos no grupo carreador do polimorfismo Glu289Asp da eNOS, isto porque os mecanismos de ajustes hemodinâmicos são distintos entre estas duas manobras. O reflexo pressor do exercício físico é mediado por comandos centrais e periféricos (metaboreceptores e mecanoreceptores) e, o estresse mental, principalmente no teste aplicado por este estudo, o aumento da pressão arterial é mediado exclusivamente pelo comando central (IELLAMO, 2001; SMITH, 2006; LOURES, 2002; TROMBETA, 2002). Assim, como a alteração funcional nas propriedades da eNOS apresentam importante impacto periférico, este comprometimento parece ser evidente quando mecanismos periféricos estão envolvidos diretamente no controle hemodinâmico, como no exercício físico (NEVES, 2010). Desta forma, acreditamos que, em crianças e adolescentes saudáveis o polimorfismo Glu289Asp, possa provocar prejuízo na resposta pressórica durante o exercício físico isométrico de preensão de mão, pois este exige mecanismos periféricos de ajuste cardiovascular, o que não ocorre no estresse mental.

Com base nesses dados, sugerimos que a exacerbada resposta pressórica observada no grupo portador do polimorfismo Glu289Asp, está associada ao comprometimento funcional da eNOS em crianças e adolescentes saudáveis.

### 3.5.2 Região Promotora (T-786C) e Intron 4 (4a/4b)

Em nosso estudo, não observamos diferenças no repouso, no exercício físico e no estresse mental, nos níveis pressóricos de crianças e adolescentes saudáveis carreadoras dos polimorfismos T-786C e 4a/4b.

Este resultado está de acordo com o observado por Casas e colaboradores (2004) que não observaram associação do polimorfismo T-786C com fenótipo patológico. Embora, outros estudos tenham identificado que a presença do alelo C está associada à redução na biodisponibilidade de NO e reduzida vasodilatação arterial. Contudo, este polimorfismo parece associar-se à elevação da pressão arterial e a patologias cardiovasculares, somente quando em conjunto com outros fatores de risco, como por exemplo o tabagismo e hipercolesterolemia (ÇİFTÇİ, 2008; COLOMBO, 2003; ERBS, 2006; KIM, 2007; PEREIRA, 2007). Em nosso estudo, foram avaliadas crianças e adolescentes saudáveis, e a ausência desses fatores de risco pode ter determinado a diferença entre nossos resultados e dos demais autores.

O polimorfismo 4a/4b também não se associou a alterações hemodinâmicas durante o exercício físico isométrico de preensão de mão e estresse mental em crianças e adolescentes saudáveis. Apesar de alguns autores apontarem associação entre o polimorfismo do intron 4 e fenótipo patológico, como reduzida vasodilatação arterial (RITTIG, 2008), hipertensão arterial (CASAS, 2004; JEEMA, 2009; PULKINEN, 2000) e doença arterial coronariana (KIM, 2007), outros autores, no entanto, não observaram impacto do polimorfismo 4a/4b na incidência de hipertensão arterial (CZARNECKA, 2006; DENG, 2007). Do mesmo modo, em nosso estudo, não foi verificada influência deste polimorfismo no comportamento pressórico de crianças e adolescentes saudáveis no exercício físico e estresse mental.

### **3.6 Limitações e Perspectiva**

A avaliação do fluxo sanguíneo muscular e/ou a dosagem dos metabólitos do óxido nítrico durante todo o protocolo experimental poderiam esclarecer os mecanismos fisiológicos envolvidos na resposta pressórica das crianças e adolescentes carreadores do genótipo polimórfico. Mas, avaliação da pressão arterial realizada nesse estudo, nos fornece inferências sobre a resistência vascular periférica.

Assim, acreditamos que investigar a funcionalidade da alteração provocada pelos polimorfismos da eNOS e o esclarecimento dos mecanismos fisiológicos envolvidos na gênese da resposta pressórica exacerbada no grupo polimórfico ainda são necessários.

### 3.7 Implicações Clínicas

A hipereatividade pressórica ao exercício físico representa impacto negativo na saúde cardiovascular, uma vez que aumenta a probabilidade para o desenvolvimento de hipertensão arterial e pior prognóstico cardiovascular (SHARABI, 2001). Em nosso estudo, as crianças e adolescentes carreadoras do polimorfismo Glu289Asp, que apresentaram valores elevados de pressão arterial no exercício físico, podem ser futuramente envolvidos nesse quadro patológico. Desta forma, identificar precocemente a susceptibilidade ao desenvolvimento de patologias é fator determinante na conduta preventiva.

Os estudos genéticos, tem sido empregados no sentido de esclarecer questões individuais que são categóricas na prevenção e na conduta no tratamento de patologias. A associação do conhecimento genético, com fatores ambientais, poderão em um futuro próximo, direcionar e quantificar a abordagem terapêutica necessária para a promoção da saúde.

### 3.8 Conclusão

Os polimorfismos T-786C e 4a/4b da eNOS não alteram os níveis de pressão arterial no exercício físico e estresse mental de crianças e adolescentes saudáveis. Porém, o polimorfismo Glu289Asp promove elevação pressórica exacerbada no exercício físico, mas não no estresse mental, nessa amostra.

### 3.9 Referências

1. MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **Journal Biology and Chemistry** 268:1231-12234, 1993.
2. ALBRECHT, E.W.J.A. et al. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. **Journal of Pathology** 199:8-17, 2003.
3. ANDREW, P.J., MAYER, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. **Cardiovascular Research** 43:521-531, 1999.
4. FORTE, P. et al. Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension. **The Lancet** 349:837-842, 1997.
5. NODE, K. et al. Reduced plasma concentrations of nitrogen oxide in individuals with essential hypertension. **Hypertension** 30:405-408, 1997.
6. KLAHR, S. The role of nitric oxide in hypertension and renal disease progression. **Nephrology Dialysis Transplantation** 16:60-62, 2001.
7. HINGORANI, A.D. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis. John French Lecture 2000. **Atherosclerosis** 154:521-527, 2000.
8. GODFREY, V. et al. The functional consequence of the Glu289Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene in young healthy volunteers. **Cardiovascular Drug Reviews** 25:280-288, 2007.
9. WANG, X.L., WANG, J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. **Molecular Genetics and Metabolism** 70:241-251, 2000.
10. CRUZ-GONZÁLEZ, I. et al. Association between -T786C NOS3 polymorphism and resistant hypertension: a prospective cohort study. **BMC Cardiovascular Disorders** 9:35-40, 2009.
11. KISHIMOTO, T. et al. eNOS Glu298Asp polymorphism and hypertension in a cohort study in Japanese. **Preventive Medicine** 39:927-931, 2004.
12. MYIAMOTO, Y. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. **Hypertension** 32:3-8, 1998.
13. SRIVASTAVA, K. et al. Association of eNOS Glu298Asp gene polymorphism with essential hypertension in Asian Indians. **Clinica Chimica Acta** 387:80-83, 2008.

14. ZINTZARAS, E., KITSIOS, G., STEFANIDIS, I. Endothelial NO synthase gene polymorphisms and hypertension. **Hypertension** 48:700-710, 2006.
15. SOUZA-COSTA, D.C. et al. eNOS haplotype associated with hypertension in obese children and adolescents. **International Journal of Obesity In Press**, 2010.
16. MONCADA, S., HIGGS, E.A. Nitric oxide and vascular endothelium. **Handbook of Experimental Pharmacology** 176:I213-I254, 2006.
17. KUCZMARSKI, R.J. et al. CDC growth charts: United States. **Advance Data** 314:1-27, 2000.
18. FRIEDEWALD, W.T., LEVY, R.L., FREDRICKSON, D.S. Estimation the concentration low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry** 18:499-502, 1972.
19. SAMBROOK, J., RUSSEL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
20. MARRONI, A.S. et al. Consistent interethnic differences in the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide synthase genetic polymorphisms. **Nitric Oxide** 12:177-182, 2005.
21. FLORINDO, A.A. et al. Desenvolvimento e validação de um questionário de avaliação da atividade física para adolescentes. **Revista de Saúde Pública** 40:1-8, 2006.
22. LOPES, F.L. et al. Redução da variabilidade da frequência cardíaca em indivíduos de meia idade e o efeito do treinamento de força. **Revista Brasileira de Fisioterapia** 11:113-119, 2007.
23. SHULTZ, D.M. et al. Cardiovascular effects of spinal cord stimulation in hypertensive patients. **Pain Physician** 14:1-14, 2011.
24. TARVAINEN, M.P., RANTA-AHO, P.O., KARJALAINEN, P.A. An advanced detrending method with application to HRV analysis. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering** 49:172-175, 2002.
25. MALIK, M., CAMM, A.J. **Heart Rate Variability**. 1 ed. New York: Futura Publishing Company, 1995.
26. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** 89:e24-e79, 2007.
27. RIBEIRO, M.M et al. Diet and exercise training restore blood pressure and vasodilatory responses during physiological maneuvers in obese children. **Circulation** 111:1915-1923, 2005.

28. STROOP, J.R. Studies of interference in serial verbal reactions. **Journal of Experimental Psychology** 18:643-662, 1935.
29. MIDDLEKAUFF, H.R. et al. Impact of acute mental stress on sympathetic nerve activity and regional blood flow in advanced heart failure. **Circulation** 96:1835-1842, 1997.
30. BARÁTH, A. et al. Endothelin-1 gene and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in adolescents with juvenile and obesity-associated hypertension. **Acta Physiologica Hungarica** 94:49-66, 2007.
31. MALHOTRA, S. et al. Effects of NOS3 Glu289Asp polymorphism on hemodynamic reactivity to stress: Influences of ethnicity and obesity. **Hypertension** 44:866-871, 2004.
32. JOSHI, M.S. et al. Biochemical consequences of the NOS3 Glu289Asp variation in human endothelium: altered caveolar localization and impaired response to shear. **The FASEB Journal** 21:2655-2663, 2007.
33. SENTHIL, D. et al. Genotype-dependent expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and its regulatory proteins in cultured endothelial cells. **DNA and Cell Biology** 24:218-224, 2005.
34. TESAURO, M. et al. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary disease: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.** 97:2832-2835, 2000.
35. DIAS, R.G. et al. Glu289Asp eNOS gene polymorphism causes attenuation in nonexercising muscle vasodilation. **Physiological Genomics** 37:99-107, 2009.
36. IELLAMO, F. Neural mechanisms of cardiovascular regulation during exercise. **Autonomic Neurociences: Basic and Clinical** 90:66-75, 2001.
37. SMITH, S.A., MITCHELL, J.H., GARRY, M.G. The mammalian exercise pressor reflex in health and disease. **Experimental Physiology** 91:89-102, 2006.
38. LOURES, D.L. et al. Estresse mental e sistema cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** 78:525-530, 2002.
39. TROMBETTA, I.C. **Estudo do controle neurovascular em mulheres obesas portadoras de polimorfismo dos receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos**. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2002.

40. NEVES, F.J. et al. Effect of the 894G>T polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase on vascular reactivity following maximal dynamic exercise. **Journal of Hypertension** 28:764-770, 2010.
41. ÇIFTIÇ, Ç. et al. Association of endothelial nitric oxide synthase promoter region (T-786C) gene polymorphism with acute coronary syndrome and coronary heart disease. **Lipids in Health and Diseases** 7:5-10, 2008.
42. COLOMBO, M.G. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of coronary artery disease. **Clinical Chemistry** 49:389-395, 2003.
43. ERBS, S. et al. Promoter but not exon 7 polymorphism of endothelial nitric oxide synthase affects training-induced correction of endothelial dysfunction. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology** 23:1814-1819, 2003.
44. KIM, I.J. et al. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (-786T>C, 4a4b, 894G>T) in Korean patients with coronary artery disease. **Thrombosis Research** 119:579-585, 2007.
45. PEREIRA, T.V. et al. Three endothelial nitric oxide (NOS3) gene polymorphisms in hypertensive and normotensive individuals: meta-analysis of 53 studies reveals evidence of publication bias. **Journal of Hypertension** 25:1763-1774, 2007.
46. RITTIG, K. et al. Endothelial NO-synthase intron 4 polymorphism is associated with disturbed in vivo nitric oxide production in individuals prone to type 2 diabetes. **Hormone and Metabolic Research** 40:13-17, 2008.
47. CASAS, J.P. et al. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. **Circulation** 109:1359-1365, 2004.
48. JEEMA, R. et al. Association of a 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with hypertension in a Tunisian population. **Clinical Biochemistry** 42:852-856, 2009.
49. PULKKINEN, A. et al. Intron 4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with elevated blood pressure in type 2 diabetic patients with coronary heart disease. **Journal of Molecular Medicine** 78:372-379, 2000.
50. CZARNEKA, D. et al. Ambulatory blood pressure, left ventricular mass and vascular phenotypes in relation to the endothelial nitric oxide synthase gene Glu289Asp and intron 4 polymorphisms in a population-based family study. **Journal of Human Hypertension** 19:413-420, 2005.

51. DENG, F. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene intron 4, 27 bp repeat polymorphism and essential hypertension in the Kazakh Chinese population. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica** 39:311-316, 2007.
52. SHARABI, Y. et al. The significance of hypertensive response to exercise as a predictor of hypertension and cardiovascular disease. **Journal of Human Hypertension** 15:353-356, 2001.

## **4 Estudo 2- Efeitos do Polimorfismo Glu289Asp da eNOS no Comportamento Pressórico Durante o Exercício Físico e Estresse Mental de Crianças e Adolescentes Obesos Normotensos**

### **4.1 Introdução**

A obesidade infantil, patologia diagnosticada de acordo com a idade e gênero por valores de índice de massa corporal (IMC) iguais ou superiores ao percentil 95 (KUCZMARSKI, 2000), está diretamente associada a alterações hemodinâmicas (SOROF, 2002). Estudos clínicos (AGUILAR, 2010; SOROF, 2002; DANIELS, 2009) demonstram que crianças e adolescentes obesos, mesmo que normotensos, possuem níveis significativamente elevados de pressão arterial quando comparados aos seus pares eutróficos. Além dessas alterações em repouso, nessa população a resposta pressórica está aumentada quando evocada pelo exercício físico e/ou estresse mental (GOLDBACHER, 2005; RIBEIRO, 2005). Sem dúvida, todos esses achados conferem ao obeso infantil maior risco para o desenvolvimento de hipertensão arterial e comprometimento cardiovascular (CHIDA, 2010; SHARABI, 2001).

O comprometimento na função vascular é um dos mecanismos envolvidos na elevação da pressão arterial com o aumento de peso corporal (RIBEIRO, 2005; WOO, 2004). Tem sido observado que adolescentes obesos, mesmo normotensos, já apresentam alterações na função e/ou síntese da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e, conseqüente, biodisponibilidade diminuída do óxido nítrico (NO) (GRUBER, 2008). Fatos, que estão diretamente envolvidos na patogênese da hipertensão arterial nessa população (SOROF, 2002; DANIELS, 2009).

Além disso, recentemente, o polimorfismo do exon 7 do gene da eNOS, caracterizado pela substituição do aminoácido glutamato (GAG) por aspartato (GAT) na posição 298 (Glu289Asp), tem sido identificado por reduzir a atividade ou a estabilidade desta proteína (JOSHI, 2007; SENTHIL, 2005; TESAURO, 2000). De fato, o polimorfismo Glu289Asp da eNOS, tem sido associado, em adultos, ao

aumento na susceptibilidade à hipertensão arterial (MIAYMOTO, 1998), e a reduzida vasodilatação durante e após uma sessão aguda de exercício físico (DIAS, 2009; NEVES, 2010). Contudo, ainda não se conhecem os efeitos da somatória da patologia obesidade com o polimorfismo Glu289Asp nos níveis pressóricos durante o exercício físico e estresse mental de crianças e adolescentes.

## 4.2 Objetivo

Testar a hipótese de que crianças e adolescentes, obesos, normotensos, portadores do polimorfismo Glu289Asp (Glu/Asp+Asp/Asp), apresentarão maiores níveis pressóricos durante o exercício físico e estresse mental, quando comparados a crianças e adolescentes obesos normotensos não portadoras do polimorfismo Glu289Asp (Glu/Glu).

## 4.3 Método

### 4.3.1 Amostra

Foram selecionados para este estudo, trinta e uma crianças e adolescentes, do Ambulatório de Endocrinologia Infantil do Instituto da Criança e do Adolescente de Juiz de Fora, que deveriam atender aos seguintes critérios de inclusão: 1) idade entre 8 e 17 anos; 2) obesos quanto ao IMC; 3) não estar sob uso de qualquer medicação; 4) ausência de patologias metabólicas, cardiovasculares e/ou hormonais, exceto a obesidade; 5) não estarem regularmente engajados em programas de esportes ou exercício físico, exceto as aulas de educação física escolar. Aos representantes legais e aos voluntários, foram explicados todos os procedimentos da pesquisa e após a concordância de ambos o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1) foi assinado. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora (parecer 0051/2009).

### 4.3.2 Antropometria

O peso corporal foi medido com os voluntários usando roupas leves, sem calçados, pela balança da marca Asimed, com precisão de 0,1 Kg. A estatura, foi medida com os voluntários sem calçados em estadiômetro acoplado à balança Asimed, com precisão de 0,1 cm. O IMC foi calculado dividindo o peso corporal (Kg) pela altura (m) ao quadrado. A obesidade foi definida quando o IMC foi maior ou igual ao percentil 95 de acordo com a idade e o gênero (KURZMARSKI, 2000).

#### 4.3.3 Lipidograma

Pela manhã, após jejum de 12 horas, foram coletados 5 mLs de sangue por punção venosa para avaliação do colesterol total, triglicerídeos e lipoproteína de alta densidade (HDL). O sangue coletado foi adicionado a um tubo a vácuo sem anticoagulante para separação de soro. O colesterol total, triglicerídeos e a HDL foram determinados por métodos enzimáticos com reagentes comerciais (Labtest Diagnóstica, Brasil). A lipoproteína de baixa densidade (LDL) foi calculada pela fórmula de Friedewald (FRIEDEWALD, 1972).

#### 4.3.4 Determinação do Genótipo

Para as genotipagens, 5 mLs de sangue foram anticoagulados com ácido etilenodiamino tetra-acético e separados para extração do DNA genômico (SAMBROOK, 2001). A análise genotípica do polimorfismo Glu289Asp foi realizada utilizando a amplificação pela técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real, pelo sistema de detecção de fluorescência (SOUZA-COSTA *et al.*, 2010).

##### *Polimorfismo do exon 7 (Glu289Asp)*

Os genótipos para o polimorfismo Glu298Asp foram determinados por meio de ensaio de discriminação *Taqman Allele* e PCR em tempo real pelo Chromo 4 Detector (Bio-Rad Laboratórios, Hercules, CA, EUA) (SOUZA-COSTA, 2010).

Desta forma, foram determinadas as variações genotípicas localizadas no par de base 894 do exon 7 do gene da eNOS, foram determinadas e identificados os seguintes genótipos: 289Glu (selvagem homozigoto), 289Glu/Asp (polimórfico heterozigoto) e 289Asp (polimórfico homozigoto).

#### 4.3.5 Atividade Física Habitual

A atividade física foi avaliada por meio do Questionário para Avaliar Atividade Física Habitual (FLORINDO, 2006), que permite quantificar anualmente o tempo dedicado à atividade física habitual (Anexo 2).

#### 4.3.6 Modulação Autonômica Cardíaca

Os voluntários foram orientados previamente a não ingerir bebidas estimulantes e a não realizar exercícios físicos nas vinte e quatro horas antecedentes ao estudo.

Assim, a modulação autonômica cardíaca foi avaliada pelo o método indireto de variabilidade da frequência cardíaca (VFC). Os batimentos cardíacos foram registrados continuamente pelo cardiofrequencímetro Polar S810i, em repouso, na posição supina, em respiração espontânea, pelo período de dez minutos.

Os valores pontuais dos intervalos entre cada batimento cardíaco (iRR) foram transferidos ao microcomputador, pela transmissão de dados do receptor de pulso para o *software Polar Precision Performance*. Posteriormente os dados foram transferidos para o aplicativo Matlab, versão 6.0, para seleção automática dos cinco minutos de menor variância que foram utilizados para o cálculo da VFC, por meio de uma rotina previamente implementada (LOPES, 2007). As séries temporais com duração de 5 minutos selecionadas foram transferidas para o software Kubios HRV Analysis, versão 2.0 (SHULTZ, 2011). Neste aplicativo foi realizada a correção de artefatos utilizando o filtro de nível médio do software e foram calculados os índices de VFC no domínio do tempo (MNN, SDNN, RMSSD, pNN50). Posteriormente foi realizada interpolação por meio da *spline* cúbica a uma frequência de 4Hz e a remoção da componente de tendência da série temporal, pelo método de suavização a priori (TARVEINEN, 2002). A estimativa da função densidade espectral de potência, foi realizada pelo método não paramétrico da Transformada Rápida de Fourier (MALIK, 1995). Para a análise espectral da VFC, foram consideradas as bandas de baixa frequência (LF – 0,04 a 0,15 Hz) e de alta frequência (HF – 0,15 a 0,4 Hz) do espectro de potência, expressas em potência absoluta ( $\text{ms}^2$ ) e em unidades normalizadas (un), além da razão LF/HF.

#### 4.3.7 Pressão Arterial Clínica

A pressão arterial foi aferida após 15 minutos em repouso na posição supina, de forma não-invasiva, no membro superior direito, pelo método auscultatório, utilizando-se esfigmomanômetro de coluna de mercúrio da marca Takaoka® (VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2007). Foram adotados tamanhos adequados de manguito, de acordo com a circunferência do braço, conforme recomendações da VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (2007).

#### 4.3.8 Pressão Arterial Durante o Protocolo Experimental

A pressão arterial durante o protocolo experimental foi realizada de forma não-invasiva, minuto a minuto, no membro inferior direito, em posição supina, pelo método oscilométrico, por meio do monitor portal DIXTAL® 2020. Foram adotados tamanhos adequados de manguito, de acordo com a circunferência do tornozelo (RIBEIRO, 2005).

#### 4.3.9 Frequência Cardíaca Durante o Protocolo Experimental

A frequência cardíaca foi monitorada continuamente, durante todo o protocolo experimental, utilizando o cardiofrequencímetro Polar S810i®.

#### 4.3.10 Exercício Isométrico de Preensão de Mão

Inicialmente, o dinamômetro para membros superiores (Jamar®), foi mostrado ao voluntário e explicado como seria a realização do teste de preensão de mão para avaliação da contração voluntária máxima. Após esta explicação inicial, o voluntário

manuseou o aparelho e foi solicitado que realizasse uma contração “leve”, com intuito de familiarização com teste. Logo após, o voluntário realizou três contrações máximas, sendo adotado como máximo o valor médio das três tentativas de exercício físico isométrico de preensão de mão, com o membro dominante. Em seguida, o voluntário permaneceu em repouso por cinco minutos.

O protocolo foi composto por três minutos, com o voluntário em posição supina (condição basal), seguido de três minutos de exercício físico isométrico de preensão de mão, a 30% da contração voluntária máxima (RIBEIRO, 2005). Principalmente, durante o exercício físico as crianças e adolescentes foram instruídos a respirarem normalmente e a não realizarem a manobra de Valsalva. Ao longo de todo este protocolo a pressão arterial foi medida minuto a minuto e a frequência cardíaca registrada continuamente.

#### 4.3.11 Teste de Estresse Mental

O protocolo de estresse mental foi realizado por meio do Teste de Cores (*Stroop Color Word Test*) (STROOP, 1935; MIDDLEKAUFF, 1997). Este teste consiste de uma tabela com uma série de nomes de cores escritos com tinta diferente daquela do significado da palavra (Figura 1). Foi solicitado ao voluntário falar a cor da tinta e não o significado da palavra, em voz alta, o mais rápido possível, sendo gentilmente advertido no caso de erro.

O protocolo foi realizado com o voluntário em posição supina, por três minutos em repouso (condição basal), seguido de dois minutos de estresse mental (RIBEIRO *et al.*, 2005). Ao final do teste, foi perguntado ao voluntário o grau de dificuldade do teste de cores a partir de uma tabela padrão de grau de dificuldade: 0= não estressante, 1= pouco estressante, 2= estressante, 3= muito estressante, 4= extremamente estressante.

Ao longo de todo este protocolo a pressão arterial foi medida minuto a minuto e a frequência cardíaca registrada continuamente.



Figura 1. Representação do Teste de Confusão de Cores (*Stroop Color Word Test*) (STROOP, 1935).

#### 4.3.12 Protocolo Experimental

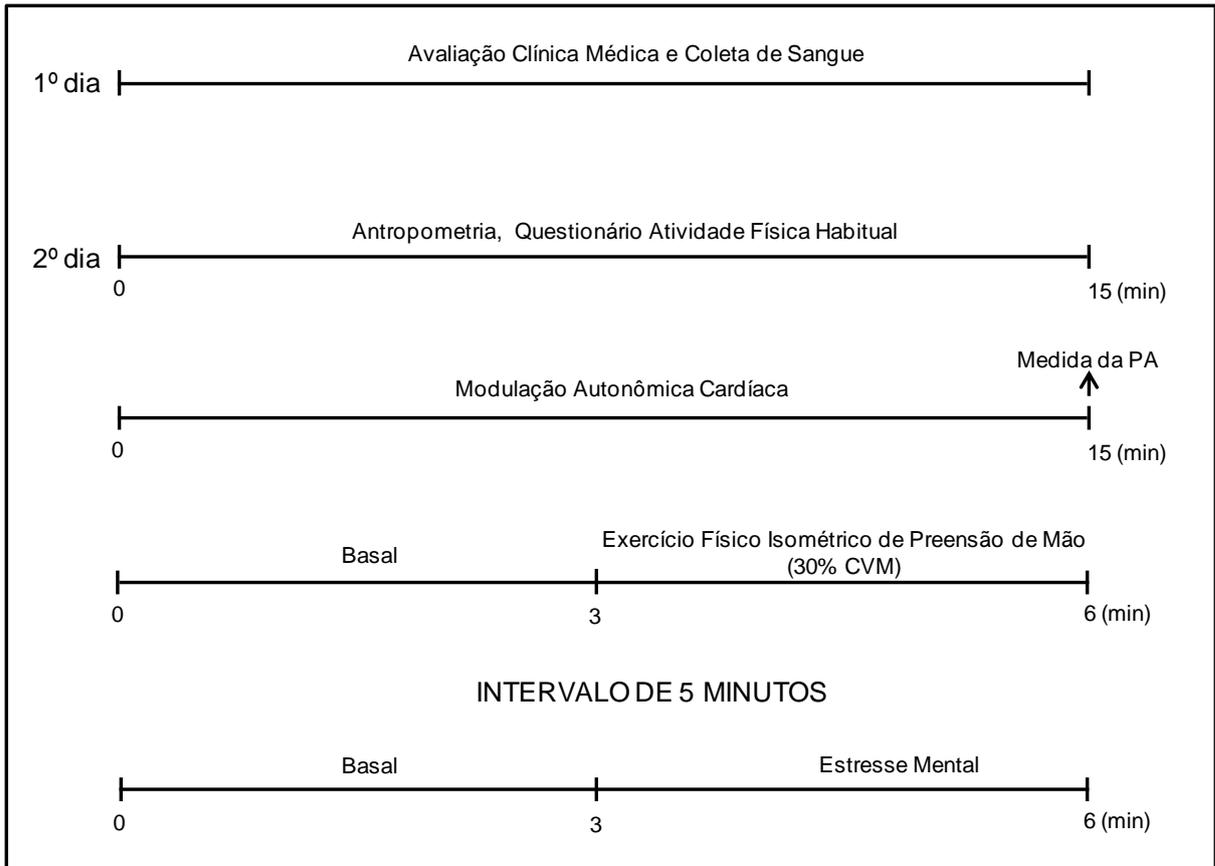
O protocolo experimental teve início no Ambulatório de Endocrinologia Infantil do Instituto da Criança e do Adolescente de Juiz de Fora, onde os voluntários foram avaliados clinicamente por uma médica endocrinologista. Após a avaliação clínica, foi realizada a coleta sanguínea, para a realização do lipidograma e da genotipagem.

Em seguida os voluntários foram encaminhados à Unidade de Avaliação Física do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora, onde foram realizadas as avaliações posteriores, sempre no período da tarde.

Todas as crianças e adolescentes que participaram deste estudo, estavam acompanhadas por seus representantes legais em todos os momentos da pesquisa.

Após a assinatura do termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foi realizada uma entrevista para investigar possíveis impedimentos para a realização do protocolo experimental. Em seguida, foi aplicado o questionário para avaliar a atividade física habitual seguido da antropometria. Logo após, o voluntário foi acomodado em posição supina e permaneceu em repouso por quinze minutos, então as variáveis hemodinâmicas de repouso (pressão arterial e frequência cardíaca) foram medidas.

Por fim, foram realizados os protocolos de exercício físico isométrico de preensão de mão e estresse mental. A figura 2, esquematiza a linha temporal do protocolo experimental.



**Figura 2.** Linha temporal do protocolo experimental. PA = pressão arterial, CVM = contração voluntária máxima.

#### 4.3.13 Divisão dos Grupos

Os voluntários foram divididos em dois grupos de acordo com a presença (grupo polimórfico) ou ausência (grupo selvagem) do genótipo polimórfico para o polimorfismo Glu289Asp. Assim, o grupo polimórfico para polimorfismo Glu289Asp foi constituído por indivíduos portadores do genótipo Glu/Asp, e pelos indivíduos portadores do genótipo Asp/Asp (Glu/Asp+Asp/Asp) e o grupo selvagem para o polimorfismo Glu289Asp por indivíduos portadores do genótipo Glu/Glu (Tabela 1).

**Tabela 1** - Distribuição e Frequência dos Genótipos do Polimorfismo Glu289Asp da Enzima Óxido Nítrico Sintase Endotelial

<b>Grupo</b>	<b>Frequência (n)</b>
Polimórfico (Glu/Asp + Asp/Asp)	32% (10)
Selvagem (Glu/Glu)	68 % (21)

#### 4.3.14 Análise Estatística

A distribuição dos genótipos para o polimorfismo Glu289Asp da eNOS foi testada para desvio de *Hardy-Weinberg equilibrium* por meio do teste qui-quadrado.

Para testar a normalidade, as variáveis foram submetidas ao teste de *Shapiro-Wilk*. Desta forma, o teste *t* de *Student* (variáveis com distribuição normal) ou o teste *Mann-Whitney* (variáveis sem distribuição normal) foram utilizados para testar as possíveis diferenças entre as características físicas, lipídicas, hemodinâmicas e autonômicas entre os grupos polimórfico e selvagem. A análise de variância de dois fatores (*Anova two-way*) para medidas repetidas foi utilizada para testar as possíveis diferenças nas variáveis hemodinâmicas, frente ao exercício físico isométrico de preensão de mão e estresse mental, e entre os grupos polimórfico e selvagem. Quando identificada diferença significativa, o teste *post hoc* de *Sheffé* foi aplicado. O teste qui-quadrado foi utilizado para testar as possíveis diferenças entre os grupos polimórfico e selvagem quanto ao grau de dificuldade do estresse mental. Para as análises do comportamento hemodinâmico foram consideradas a média aritmética dos três minutos do basal e o pico da resposta pressórica de cada teste, sendo o terceiro minuto no exercício físico isométrico de preensão de mão e segundo minuto no estresse mental.

Para todas essas análises foi adotado como significativo  $p \leq 0,05$  e os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão.

#### 4.4 Resultados

A frequência de distribuição dos genótipos para o polimorfismo Glu289Asp não mostrou desvio de *Hardy-Weinberg equilibrium* ( $p = 0,20$ ) (tabela 2).

**Tabela 2** - Frequência e Distribuição dos Genótipos do Polimorfismo Glu289Asp da Enzima Óxido Nítrico Sintase Endotelial

Região	Genótipos	Frequências (n)
<b>Glu289Asp</b>	Glu/Glu	68% (21)
	Glu/Asp	29% (9)
	Asp/Asp	3% (1)

Na tabela 3 são apresentadas as características físicas, lipídicas e hemodinâmicas dos grupos polimórfico (Glu/Asp+Asp/Asp) e selvagem (Glu/Glu). Como podemos observar, os grupos são semelhantes para idade, peso, altura, IMC percentil, percentual de gordura corporal, tempo dedicado a atividade física no último ano, a força correspondente a 30% da contração voluntária máxima, colesterol total, LDL, HDL, triglicérides, pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, pressão arterial média e frequência cardíaca.

Os dados referentes ao controle autonômico cardíaco basal são apresentados na tabela 4. As variáveis no domínio do tempo MNN, SDNN, RMSSD, pNN50, assim como as variáveis no domínio da frequência LF (ms<sup>2</sup>), HF (ms<sup>2</sup>), LF (un), HF (un), LF/HF, foram similares entre os grupos polimórfico e selvagem.

**Tabela 3** - Características Físicas, Lipídicas e Hemodinâmicas dos Grupos Polimórfico (Glu/Asp+Asp/Asp) e Selvagem (Glu/Glu) da Enzima Óxido Nítrico Sintase Endotelial

Variáveis	Polimórfico (Glu/Asp+Asp/Asp)	Selvagem (Glu/Glu)	p
<i>Características Físicas</i>			
Idade (anos)	12,9 ± 0,9	12,0 ± 0,6	0,405
Peso (Kg)	76,5 ± 3,9	72,6 ± 3,7	0,523
Altura (m)	1,59 ± 0,03	1,58 ± 0,03	0,843
IMC (percentil)	96,4 ± 0,6	96,0 ± 0,6	0,612
Gordura corporal (%)	46,3 ± 1,9	43,6 ± 1,9	0,388
Massa livre de gordura (kg)	40,9 ± 2,1	40,3 ± 1,9	0,861
Atividade Física (escore anual)	2885 ± 1155	4991 ± 1021	0,221
30% da CVM (Kgf)	8,4 ± 0,8	8,2 ± 0,6	0,795
<i>Características Lipídicas</i>			
Colesterol Total (mg/dl)	138,6 ± 11,8	164,0 ± 8,8	0,118
LDL (mg/dl)	83,4 ± 9,8	106,6 ± 8,4	0,123
HDL (mg/dl)	37,9 ± 2,8	38,4 ± 1,4	0,871
Triglicérides (mg/dl)	86,0 ± 13,0	95,2 ± 10,8	0,631
<i>Características Hemodinâmicas</i>			
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	118,4 ± 3,0	111,0 ± 2,3	0,065
Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	68,4 ± 3,9	66,3 ± 2,1	0,604
Pressão Arterial Média (mmHg)	85,1 ± 3,3	81,2 ± 1,7	0,253
Frequência Cardíaca (bpm)	77,2 ± 3,9	75,8 ± 2,0	0,726

Dados apresentados como média ± erro padrão. IMC = índice de massa corporal, CVM = contração voluntária máxima, LDL = lipoproteína de baixa densidade, HDL = lipoproteína de alta densidade

**Tabela 4** - Modulação Autonômica Cardíaca Basal dos Grupos Polimórfico (Glu/Asp+Asp/Asp) e Selvagem (Glu/Glu) da Enzima Óxido Nítrico Sintase Endotelial

Variáveis	Polimórfico (Glu/Asp+Asp/Asp)	Selvagem (Glu/Glu)	p
<i>Domínio do Tempo</i>			
MNN (ms)	811,5 ± 33,7	771,3 ± 21,4	0,333
SDNN (ms)	40,4 ± 5,5	53,7 ± 4,6	0,121
RMSSD (ms)	50,6 ± 8,9	60,4 ± 6,8	0,391
pNN50 (%)	28,0 ± 8,5	31,2 ± 4,9	0,775
<i>Domínio da Frequência</i>			
LF (ms <sup>2</sup> )	562,9 ± 133,8	1092,1 ± 166,7	0,081
HF (ms <sup>2</sup> )	1096,7 ± 413,2	1789,2 ± 363,2	0,193
LF (un)	40,7 ± 6,8	42,5 ± 4,3	0,819
HF (un)	59,3 ± 6,8	57,5 ± 4,3	0,819
LF/HF	0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,727

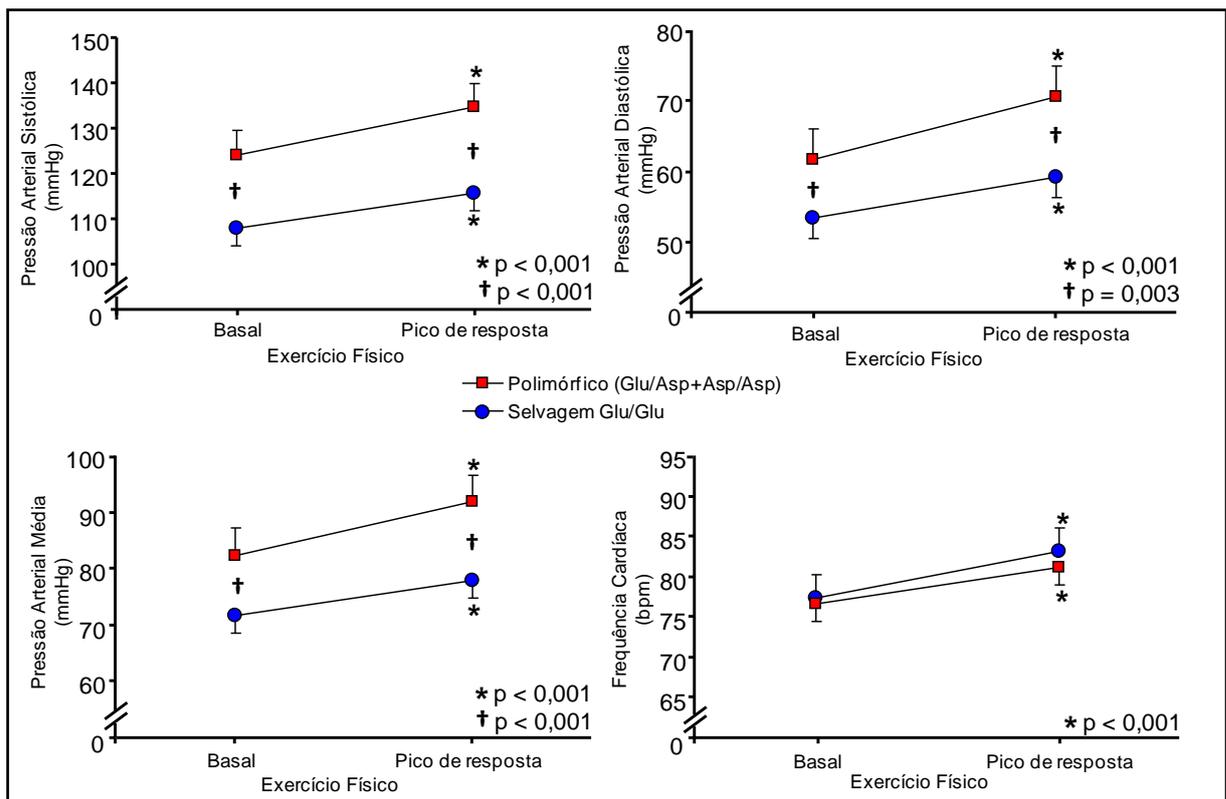
Dados apresentados como média ± erro padrão. MNN = média dos intervalos NN, SDNN = desvio padrão dos intervalos NN, RMSSD = raiz média quadrática das diferenças de batimentos sucessivos, pNN50 = proporção entre os intervalos NN sucessivos com diferença de duração superior a 50 ms e o número total de intervalos NN, LF = banda de baixa frequência (0,04-0,15 Hz), HF = banda de alta frequência (0,15-0,4 Hz), PT = potência total.

#### *Exercício Físico Isométrico de Preensão de Mão*

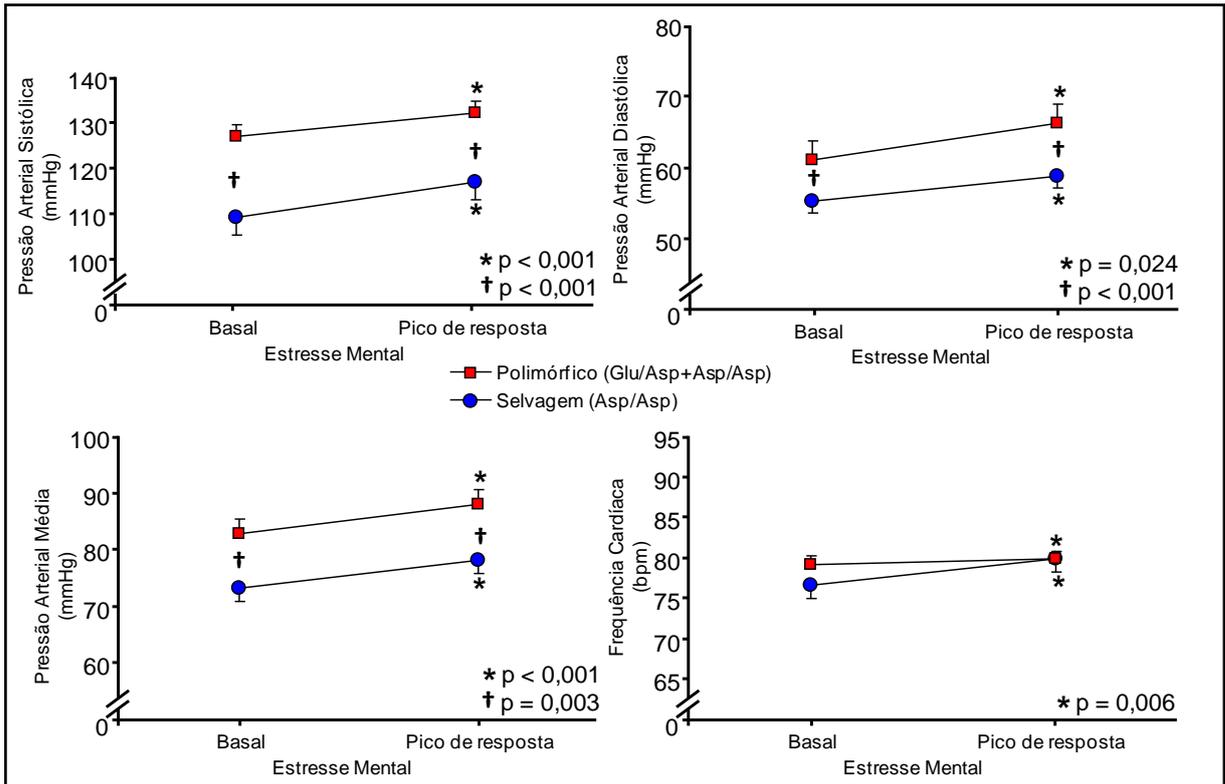
No período basal os valores de pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e pressão arterial média foram significativamente maiores no grupo polimórfico quando comparado ao grupo selvagem. E, quando comparado o pico de resposta com o basal, os valores da pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e pressão arterial média aumentaram significativamente em ambos os grupos. No pico de resposta, os níveis de pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e pressão arterial média foram significativamente maiores no grupo polimórfico quando comparados ao grupo selvagem. A frequência cardíaca aumentou significativamente e similarmente entre os grupos (Figura 3).

### Estresse Mental

No período basal os valores de pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e pressão arterial média foram significativamente maiores no grupo polimórfico, quando comparado ao grupo selvagem. E, quando comparado o pico de resposta com o basal, os valores da pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e pressão arterial média aumentaram significativamente em ambos os grupos. No pico de resposta, os níveis de pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e pressão arterial média foram significativamente maiores no grupo polimórfico quando comparados ao grupo selvagem. A frequência cardíaca aumentou significativamente e similarmente entre os grupos (Figura 4). O grau de dificuldade do estresse mental foi semelhante entre os grupos polimórfico ( $1 \pm 0,2$ ) e selvagem ( $1 \pm 0,2$ ) ( $p = 0,941$ ).



**Figura 3.** Controle hemodinâmico durante o exercício físico isométrico de preensão de mão dos grupos polimórfico (Glu/Asp+Asp/Asp) e selvagem (Glu/Glu) da enzima óxido nítrico sintase endotelial. \* = diferença vs. basal; † = diferença polimórfico vs. selvagem.



**Figura 4.** Controle hemodinâmico durante o estresse mental dos grupos polimórfico (Glu/Asp+Asp/Asp) e selvagem (Glu/Glu) da enzima óxido nítrico sintase endotelial. \* diferença vs. basal; † = diferença polimórfico vs. selvagem.

## 4.5 Discussão

Os principais achados deste estudo foram que crianças e adolescentes obesos normotensos carreadores do genótipo polimórfico (Glu/Asp+Asp/Asp) para o polimorfismo Glu289Asp, apresentaram maiores níveis de pressão arterial ao longo do exercício físico isométrico de preensão de mão e estresse mental quando comparada a seus pares, portadores do genótipo selvagem (Glu/Glu).

Estes resultados estão parcialmente de acordo com o observado por outros autores, que verificaram que adultos jovens obesos, portadores do polimorfismo Glu289Asp, apresentam resposta pressórica hiperreativa no estresse mental (MALHOTRA; 2004). Contudo nesse estudo, a etnia foi outro fator de interação na determinação do comprometimento hemodinâmico, enquanto que em nosso estudo apenas o genótipo diferenciava os grupos. Além disso, a pressão arterial basal não foi diferente entre os grupos polimórfico e selvagem como visto em nossa amostra.

O polimorfismo Glu289Asp, provoca mudança na estrutura da eNOS e consequentemente associa-se a reduzida atividade enzimática e alteração em sua localização celular. Isto reduz a capacidade das células portadoras do polimorfismo, em liberar NO frente ao *shear stress* (JOSHI, 2007). Isto poderia explicar, pelo menos em parte, a elevada pressão arterial observada no grupo polimórfico durante o exercício físico e estresse mental, uma vez que, em condições normais, essas situações dinâmicas provocam aumento na síntese de NO, vasodilatação, menor resistência vascular periférica e, consequentemente, menores elevações pressóricas.

De fato, o polimorfismo Glu289Asp apresenta em adultos saudáveis, impacto negativo na vasodilatação muscular periférica durante o exercício físico isométrico de preensão de mão (DIAS, 2009). E, este comprometimento, realmente é mediado por redução na síntese de NO, uma vez que o bloqueio de sua síntese por L-NMMA não provoca no grupo polimórfico nenhuma redução adicional na vasodilatação, o que indica que a síntese de NO neste grupo já estava comprometida. Neste estudo, os autores indicaram que apenas o polimorfismo em homozigose, ou seja, os indivíduos com genótipo Asp/Asp para o polimorfismo Glu289Asp estavam comprometidos hemodinamicamente. Porém, em nosso estudo a presença de um

único alelo polimórfico foi suficiente para promover comprometimento hemodinâmico.

Contudo, foi visto que a obesidade infantil também reduz a vasodilatação muscular periférica. E, que os níveis pressóricos durante o exercício físico isométrico de preensão de mão e estresse mental são maiores em crianças e adolescentes obesos quando comparados a seus pares eutróficos (RIBEIRO, 2005; GOLDBACHER, 2005). Porém, em nosso estudo, ambos os grupos apresentam as mesmas características físicas, como peso, altura, classificação de obesidade e percentual de gordura corporal.

Outro fator que poderia explicar a elevação da pressão arterial, principalmente em obesos, é o aumento da atividade nervosa simpática. Pois segundo Scherrer e colaboradores (1994), a gordura corporal é o maior determinante da elevação da descarga simpática. Contudo, em nosso estudo o controle autonômico cardíaco de repouso, avaliado de forma indireta por meio da variabilidade da frequência cardíaca não identificou diferença entre os grupos polimórfico e selvagem. Além disso, o fato de ambos os grupos serem obesos, em nosso entendimento, também exclui este fator de confusão.

A pressão arterial clínica, não diferiu entre os grupos avaliados em nosso estudo. O que está de acordo com outros autores, que avaliaram a influência do polimorfismo Glu289Asp da eNOS na incidência de hipertensão em crianças e adolescentes obesos, e também não evidenciaram associação de forma isolada deste polimorfismo com os níveis pressóricos clínicos (BARÁTH, 2007; SOUZA-COSTA, 2010).

No entanto, em nossa amostra, no período basal, que precedeu os protocolos de exercício físico isométrico de preensão de mão e de estresse mental, a pressão arterial sistólica, a pressão arterial diastólica e a pressão arterial média, foram significativamente maiores no grupo polimórfico. Este achado, indica que o período que antecedeu a conhecida situação de estresse fisiológico, denominada resposta antecipatória (SHERWOOD, 1996), mediada pelo comando central, foi suficiente para promover alterações na pressão arterial do grupo polimórfico. A hipereatividade cardiovascular na fase antecipatória ao exercício físico ou ao estresse mental, segundo Jackson e colaboradores (1983) e Everson e colaboradores (1996) é fato importante na etiologia da hipertensão. Como este fenômeno não foi observado no estudo 1 (dados não publicados), que avaliou crianças e adolescentes eutróficos,

acreditamos que a obesidade possa ter se agregado ao efeito deletério do polimorfismo, comprometendo ainda mais o controle hemodinâmico.

Portanto, com base nesses dados, sugerimos que os níveis pressóricos elevados observados no grupo portador do polimorfismo Glu289Asp, estão associados ao comprometimento funcional da eNOS em crianças e adolescentes obesos normotensos portadores do alelo 289Asp. E, a associação entre o genótipo polimórfico e o fenótipo de obesidade demonstrou potencializar o dano ao sistema cardiovascular. Uma vez que, em nosso estudo 1 (dados não publicados), crianças e adolescentes saudáveis portadoras do polimorfismo Glu289Asp apresentaram resposta pressórica elevada no exercício físico, enquanto que nesse estudo, a resposta pressórica mostrou-se elevada também no estresse mental e no basal.

## 4.6 Limitações

A avaliação do fluxo sanguíneo muscular e/ou a dosagem dos metabólitos do óxido nítrico durante todo o protocolo experimental poderiam esclarecer os mecanismos fisiológicos envolvidos na resposta pressórica das crianças e adolescentes carreadores do genótipo polimórfico. Mas, avaliação da pressão arterial realizada nesse estudo, nos fornece inferências sobre a resistência vascular periférica.

Assim, acreditamos que investigar a funcionalidade da alteração provocada pelos polimorfismos da eNOS e o esclarecimento dos mecanismos fisiológicos envolvidos na gênese da resposta pressórica exacerbada no grupo polimórfico ainda são necessários. Além disso, neste estudo percebemos que o ambiente desfavorável (obesidade) também exerce importante impacto sobre o genótipo. Assim investigar o contrário, se o ambiente favorável é capaz de inibir o efeito deletério do genótipo de risco se faz extremamente importante.

#### **4.7 Implicações Clínicas**

Foi visto que a resposta pressórica exacerbada ao exercício físico e estresse mental, bem como a hipereatividade pressórica na fase antecipatória ao exercício físico e estresse mental é fator preditivo para o desenvolvimento de hipertensão arterial e doenças cardiovasculares (CHIDA, 2010; EVERSON, 1996; MATTHEWS, 2003; SHARABI, 2001). Em nosso estudo, verificamos que mesmo na infância a presença do polimorfismo Glu289Asp da eNOS, determinou maiores níveis pressóricos no período pré e durante o exercício físico e estresse mental, indicando que crianças e adolescentes em situações de risco (portador de polimorfismo e obesidade) podem necessitar de intervenção preventiva mais agressiva, tendo em vista os malefícios que a instalação precoce de patologias como a hipertensão arterial podem trazer para esta população.

#### **4.8 Conclusão**

Em crianças e adolescentes obesos o polimorfismo Glu289Asp determinou maiores níveis pressóricos no exercício físico e estresse mental, sugerindo pior prognóstico cardiovascular.

## 4.9 Referências

1. KUCZMARSKI, R.J. et al. CDC growth charts: United States. **Advance Data** 314:1-27, 2000.
2. AGUILAR, A. et al. Elevated Ambulatory Blood Pressure in a Multi-Ethnic Population of Obese Children and Adolescents. **The Journal of Pediatrics** 156:930-935, 2010.
3. SOROF, J., DANIELS, S.R. Obesity hypertension in children. A problem of epidemic proportions. **Hypertension** 40:441-447, 2002.
4. DANIELS, S.R. et al. American Heart Association Childhood Obesity Research Summit Report. **Circulation** 119:e489-e517, 2009.
5. GOLDBACHER, E.M., MATTHEWS, K.A., SALOMON, K. Central adiposity is associated with cardiovascular reactivity to stress in adolescents. **Health Psychology** 24:375-384, 2005.
6. RIBEIRO, M.M. et al. Diet and exercise training restore blood pressure and vasodilatory responses during physiological maneuvers in obese children. **Circulation** 111:1915-1923, 2005.
7. CHIDA, Y., STEPOE, A. Greater cardiovascular responses to laboratory mental stress are associated with poor subsequent cardiovascular risk status. A meta-analysis of prospective evidence. **Hypertension** 55:1026-1032, 2010.
8. SHARABI, Y., BEM-CNAAN, HANIN, A. The significance of hypertensive response to exercise as a predictor of hypertension and cardiovascular disease. **Journal of Human Hypertension** 15:353-356, 2001.
9. WOO, K.S. et al. Overweight in children is associated with arterial endothelial dysfunction and intima-media thickening. **International Journal of Obesity** 28:852-857, 2004.
10. GRUBER, H.J., MAYER, C., MANGGE, H., et al. Obesity reduces the bioavailability of nitric oxide in juveniles. **International Journal of Obesity** 32:826-831, 2008.
11. JOSHI, M.S. et al. Biochemical consequences of the NOS3 Glu289Asp variation in human endothelium: altered caveolar localization and impaired response to shear. **The FASEB Journal** 21:2655-2663, 2007.

12. SENTHIL, D. et al. Genotype-dependent expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and its regulatory proteins in cultured endothelial cells. **DNA and Cell Biology** 24:218-224, 2005.
13. TESAURO, M. et al. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary disease: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.** 97:2832-2835, 2000.
14. MYIAMOTO, Y. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. **Hypertension** 32:3-8, 1998.
15. DIAS, R.G. et al. Glu289Asp eNOS gene polymorphism causes attenuation in nonexercising muscle vasodilation. **Physiological Genomics** 37:99-107, 2009.
16. NEVES, F.J. et al. Effect of the 894G>T polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase on vascular reactivity following maximal dynamic exercise. **Journal of Hypertension** 28:764-770, 2010.
17. SLAUGHTER, M. H. et al. Skinfold equations for estimation of body fatness in children and youth. **Human Biology** 60:709-723, 1988.
18. FRIEDEWALD, W.T., LEVY, R.L., FREDRICKSON, D.S. Estimation the concentration low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry** 18:499-502, 1972.
19. SAMBROOK, J., RUSSEL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
20. SOUZA-COSTA, D.C. et al. eNOS haplotype associated with hypertension in obese children and adolescents. **International Journal of Obesity In Press**, 2010.
21. FLORINDO, A.A. et al. Desenvolvimento e validação de um questionário de avaliação da atividade física para adolescentes. **Revista de Saúde Pública** 40:1-8, 2006.
22. LOPES, F.L. et al. Redução da variabilidade da frequência cardíaca em indivíduos de meia idade e o efeito do treinamento de força. **Revista Brasileira de Fisioterapia** 11:113-119, 2007.
23. SHULTZ, D.M. et al. Cardiovascular effects of spinal cord stimulation in hypertensive patients. **Pain Physician** 14:1-14, 2011.

24. TARVAINEN, M.P., RANTA-AHO, P.O., KARJALAINEN, P.A. An advanced detrending method with application to HRV analysis. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering** 49:172-175, 2002.
25. MALIK, M., CAMM, A.J. **Heart Rate Variability**. 1 ed. New York: Futura Publishing Company, 1995.
26. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** 89:e24-e79, 2007.
27. STROOP, J.R. Studies of interference in serial verbal reactions. **Journal of Experimental Psychology** 18:643-662, 1935.
28. MIDDLEKAUFF, H.R. et al. Impact of acute mental stress on sympathetic nerve activity and regional blood flow in advanced heart failure. **Circulation** 96:1835-1842, 1997.
29. MALHOTRA, S. et al. Effects of NOS3 Glu289Asp polymorphism on hemodynamic reactivity to stress: Influences of ethnicity and obesity. **Hypertension** 44:866-871, 2004.
30. JOSHI, M.S. et al. Biochemical consequences of the NOS3 Glu289Asp variation in human endothelium: altered caveolar localization and impaired response to shear. **The FASEB Journal** 21:2655-2663, 2007.
31. SHERRER, U. et al. Body fat and sympathetic nerve activity in health subjects. **Circulation** 89:2634-2640, 1994.
32. BARÁTH, A. et al. Endothelin-1 gene and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in adolescents with juvenile and obesity-associated hypertension. **Acta Physiologica Hungarica** 94:49-66, 2007.
33. SHERWOOD, A., TURNER, J.R. **A conceptual and methodologic overview of cardiovascular reactivity research**. In: Turner JR, Sherwood A, Light KC, eds. Individual Differences in Cardiovascular Response to Stress. New York, NY: Plenum Press;1992:3-32.
34. JACKSON, A.S. et al. Prediction of future resting hypertension from exercise blood pressure. **Journal of Cardiac Rehabilitation** 3:263-268, 1983.
35. EVERSON, S.A. et al. Anticipatory Blood Pressure Response to Exercise Predicts Future High Blood Pressure in Middle-aged Men. **Hypertension** 27:1059-1064, 1996.
36. MATTHEWS, K.A. et al. Cardiovascular reactivity to stress predicts future blood pressure in adolescence. **Psychosomatic Medicine** 65:410-415, 2003.

## Anexos

### Anexo I Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



CEP – Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário/UFJF

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO – UNIDADE SANTA CATARINA

Rua Catulo Breviglieri S/N – 36036.110

Tel.: (32) 4009-5108

**Faculdade de Educação Física e Desportos – UFJF**

#### Responsáveis:

Prof. Dr. Mateus Camaroti Laterza (orientador)  
 Profa. Carla Márcia Moreira Lanna (colaboradora)  
 Prof. Dr. Jorge Roberto Perrout de Lima (co-orientador)  
 Josiane Aparecida de Miranda (orientanda)

**Endereço do Pesquisador Responsável:** Laboratório de Avaliação Motora – UFJF – Faculdade de Educação Física e Desportos –FAEFID – Campus Universitário – Bairro Martelos, Juiz de Fora – MG. Cep: 36030-900

**Telefone de contato do pesquisador:** (32) 2102-3287.

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu,....., na qualidade de representante legal de

idade....., concordo que meu filho(a) participe como voluntário do estudo “Efeito dos Polimorfismos da eNOS na Resposta Pressórica de Crianças e Adolescentes Obesos”, que tem como objetivo avaliar a influência da obesidade e dos polimorfismos genéticos na resposta da pressão arterial em situações de estresse mental e exercício físico. Para isto será realizada avaliação antropométrica (peso, altura, percentual de gordura), avaliação do nível de atividade física (questionário), registro dos batimentos cardíacos, avaliação de força (teste de prensão de mão) e teste de estresse mental (teste de confusão de cores). Todas as avaliações serão realizadas por um educador físico, os batimentos cardíacos e a pressão arterial serão monitorados em repouso, durante a execução de um exercício de prensão de mão (apertar um aparelho similar ao freio de uma bicicleta por três minutos) e durante um teste de confusão de cores, que se assemelha a um jogo com palavras coloridas. O risco dos testes é mínimo e serão realizados em uma única visita ao HU/CAS-UFJF.

Para participar deste estudo o(a) senhor(a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. O(a) senhor(a) será esclarecido sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou não participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A participação de seu filho(a), sob sua responsabilidade, é voluntária e a recusa em participar não acarretará nenhuma penalidade ou prejuízo.

O pesquisador irá tratar a identidade de seu filho(a), com padrões profissionais de sigilo. Os resultados da pesquisa estarão a sua disposição quando finalizada. O(a) senhor(a), ou o menor sob sua responsabilidade, não serão identificados em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Como benefícios em participar da pesquisa, estão incluídos a avaliação física detalhada, com avaliação da quantidade de gordura corporal, avaliação do nível de atividade física (questionário) e avaliação da pressão arterial.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável e a outra será fornecida ao senhor(a). Se porventura houver alguma intercorrência clínica ou eventuais danos à saúde durante a realização dos testes, ao voluntário será garantido atendimento médico no HU/CAS-UFJF, bem como indenização por danos à saúde decorrente da pesquisa.

Declaro que fui informado(a) dos objetivos do estudo "Efeito dos Polimorfismos da eNOS na Resposta Pressórica de Crianças e Adolescentes Obesos", de forma clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar do estudo, se assim o desejar.

Declaro que concordo com participação de meu filho(a) neste estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Juiz de Fora, .....de .....de..... .

Nome do Representante Legal:.....

Assinatura do Representante Legal:.....

Nome do pesquisador:.....

Assinatura do pesquisador:.....

Nome da testemunha:.....

Assinatura da testemunha:.....

Nome da testemunha:.....

Assinatura da testemunha:.....

Em caso de dúvidas sobre os aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário/UFJF

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO – UNIDADE SANTA CATARINA

Rua Catulo Breviglieri S/Nº - 36036-110

Tel.: (32) 4009-5108

## Anexo II Questionário de Atividade Física Habitual

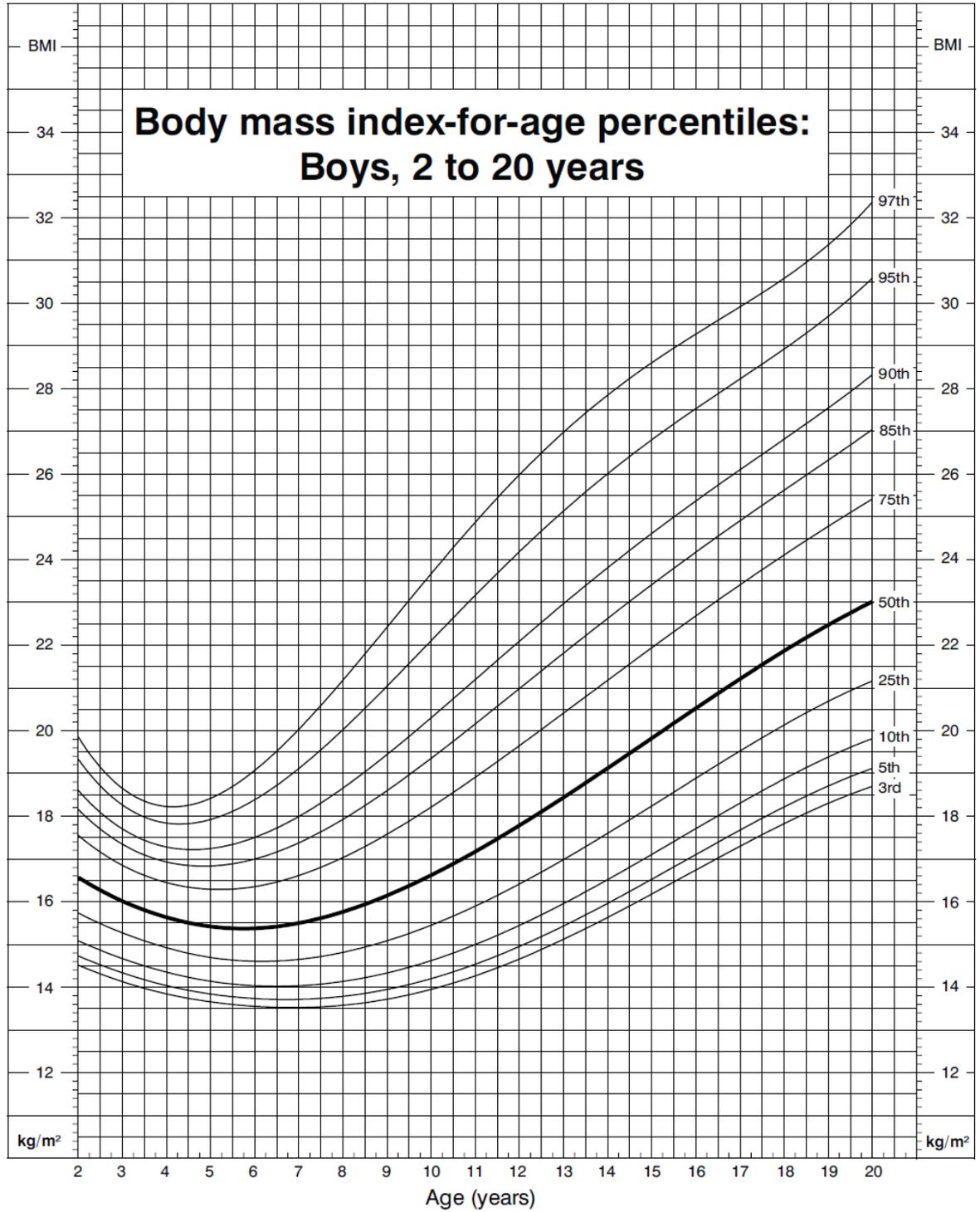
### Questionário de Atividade Física Habitual

Florindo *et al*, 2006

---

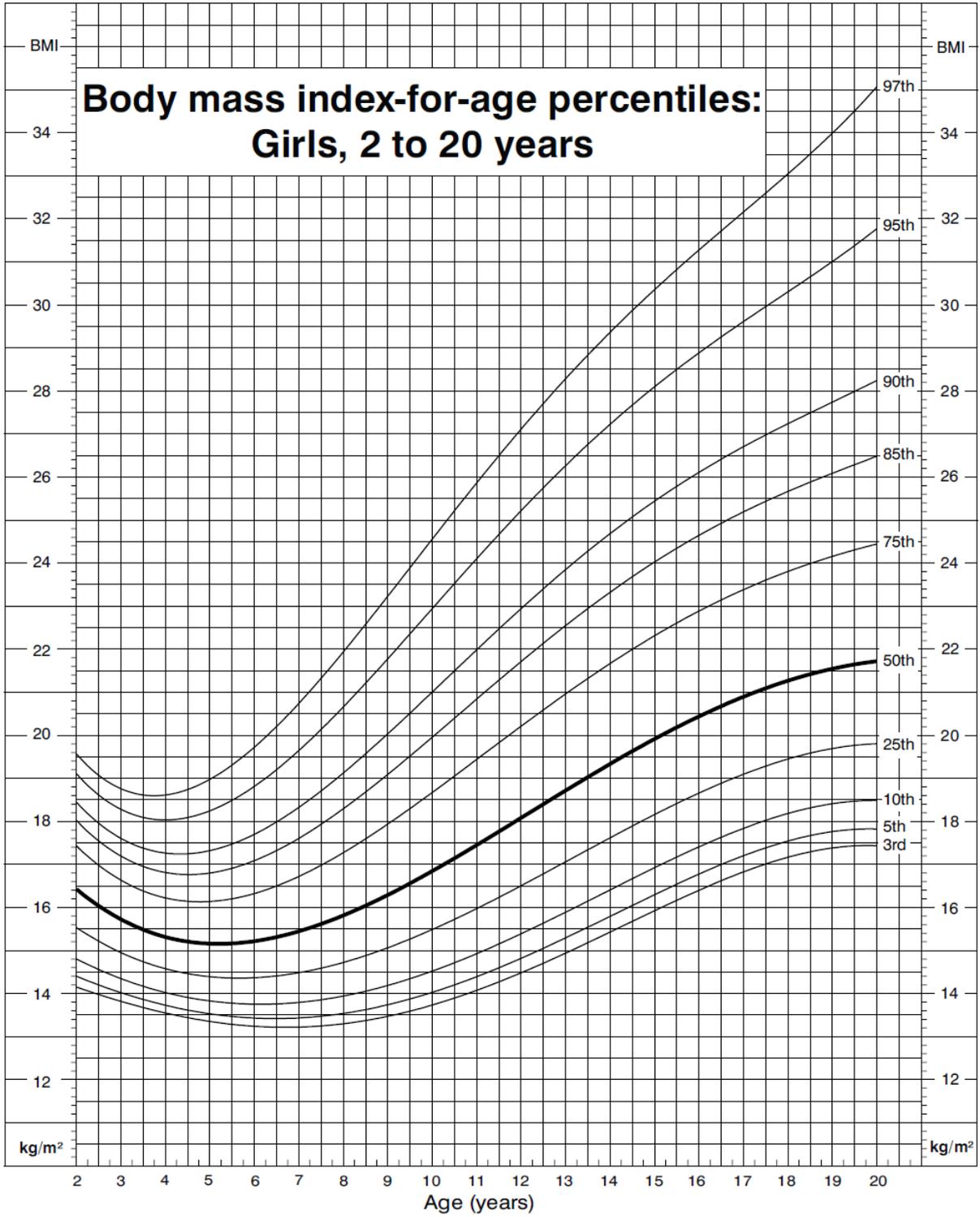
1. Você praticou esporte ou exercício físico em clubes, academias, escolas de esportes, parques, ruas ou em casa nos últimos 12 meses? 1. Sim            2. Não
  2. Qual esporte ou exercício você praticou mais frequentemente?  
\_\_\_\_\_
  3. Quantas horas por dia você praticou? \_\_\_\_\_
  4. Quantas vezes por semana você praticou? \_\_\_\_\_
  5. Quantos meses por ano você praticou? \_\_\_\_\_
  6. Você praticou um segundo esporte ou exercício físico? 1. Sim            2. Não
  7. Qual esporte ou exercício físico você praticou? \_\_\_\_\_
  8. Quantas horas por dia você praticou? \_\_\_\_\_
  9. Quantas vezes por semana você praticou? \_\_\_\_\_
  10. Quantos meses por ano você praticou? \_\_\_\_\_
  11. Você praticou um terceiro esporte ou exercício físico? 1. Sim            2. Não
  12. Qual esporte ou exercício físico você praticou? \_\_\_\_\_
  13. Quantas horas por dia você praticou? \_\_\_\_\_
  14. Quantas vezes por semana você praticou? \_\_\_\_\_
  15. Quantos meses por ano você praticou? \_\_\_\_\_
  16. Você costuma ir de bicicleta ou a pé para a escola? 1. Sim            2. Não
  17. Quantas horas por dia você gasta nessas atividades? \_\_\_\_\_
-

Anexo III Tabela de Classificação do IMC Para Menores de 18 Anos



SOURCE: Developed by the National Center for Health Statistics in collaboration with the National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (2000).





SOURCE: Developed by the National Center for Health Statistics in collaboration with the National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (2000).

