

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO BIOMÉDICO
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA – PESQUISA CIENTÍFICA COM ÊNFASE EM
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

THALES COELHO BARBOSA

**INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DA ENZIMA ÓXIDO
NÍTRICO SINTASE ENDOTELIAL SOBRE O COMPORTAMENTO DA
FREQUÊNCIA CARDÍACA APÓS UM TESTE CARDIOPULMONAR DE
EXERCÍCIO**

NITERÓI
2010

THALES COELHO BARBOSA

**INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DA ENZIMA ÓXIDO
NÍTRICO SINTASE ENDOTELIAL SOBRE O COMPORTAMENTO DA
FREQUÊNCIA CARDÍACA APÓS UM TESTE CARDIOPULMONAR DE
EXERCÍCIO**

Trabalho de conclusão de curso para
obtenção do grau de bacharel em
Biomedicina – Habilitação em Pesquisa
Científica com Ênfase em Fisiologia e
Farmacologia, da Universidade Federal
Fluminense

Orientador: Prof. Dr. Antonio Claudio Lucas da Nóbrega

Coorientadora: Dra. Fabricia Junqueira das Neves

NITERÓI
2010

B238 Barbosa, Thales Coelho

Influência de polimorfismos genéticos da enzima óxido nítrico sintase endotelial sobre o comportamento da frequência cardíaca após um teste cardiopulmonar de exercício / Thales Coelho Barbosa. - Niterói: [s.n.], 2010
38 f.:il.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação em Biomedicina) - Universidade Federal Fluminense, 2010.

1. Frequência Cardíaca. 2. Exercício. 3. Óxido Nítrico.
I. Título.

CDD 574.191

THALES COELHO BARBOSA

INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO
SINTASE ENDOTELIAL SOBRE O COMPORTAMENTO DA FREQUÊNCIA
CARDÍACA APÓS UM TESTE CARDIOPULMONAR DE EXERCÍCIO

Trabalho de conclusão de curso para
obtenção do grau de bacharel – Habilitação
em Pesquisa Científica com Ênfase em
Fisiologia e Farmacologia, da Universidade
Federal Fluminense.

Aprovada em Julho de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Claudio Lucas da Nóbrega – Orientador
UFF

Prof. Dra. Georgina Severo Ribeiro
UFF

Prof. Dr. Pedro Paulo da Silva Soares
UFF

Prof. Dra. Karen de Jesus Oliveira
UFF

RESUMO

A disfunção autonômica constitui um mecanismo central no desenvolvimento e progressão de doenças do sistema cardiovascular, e é um marcador precoce de doença, assim como preditor de eventos cardiovasculares. A realização de exercício físico exige importantes respostas do sistema cardiovascular e uma adequada modulação autonômica da atividade do coração, essencial para a manutenção da homeostasia. Durante o exercício, ocorre aumento da atividade simpática e diminuição da atividade parassimpática sobre o coração, com consequente aumento da frequência cardíaca (FC). Imediatamente após o exercício, ocorre uma reativação parassimpática e retorno à FC pré-exercício. Uma reativação parassimpática de baixa magnitude está associada a desfechos clínicos desfavoráveis. Dois índices bastante usados para avaliar a atividade parassimpática são a recuperação da FC (FC_{rec}) e a variabilidade da FC (VFC). Estudos indicam que o óxido nítrico (NO) pode ter algum papel sobre a atividade autonômica e, conseqüentemente, sobre a FC. Alguns estudos mostram que polimorfismos do gene da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) diminuem a biodisponibilidade de NO mesmo em indivíduos saudáveis e poderiam explicar, ao menos em parte, as diferenças inter-individuais das respostas do sistema cardiovascular a estímulos fisiológicos e fisiopatológicos. O objetivo deste trabalho foi investigar a influência dos polimorfismos da região promotora e do exon 7 do gene da eNOS sobre a FC_{rec} e a VFC nos primeiros 5 min após um teste cardiopulmonar de exercício (TCPE). Foram incluídos no estudo 139 voluntários saudáveis, sedentários e não-fumantes. Foram submetidos a TCPE, com monitoramento da FC por eletrocardiograma e frequencímetro. Foram obtidos valores de FC no pico do esforço e após 1, 3 e 5 min de recuperação, para cálculo de $\Delta 1\text{min}$, $\Delta 3\text{min}$, $\Delta 5\text{min}$, respectivamente, além da cinética da FC e constante *Tau*. Também foi registrada a FC batimento a batimento, para cálculo do RMSSD e análise da VFC. Foi feita a genotipagem dos voluntários para os polimorfismos da região promotora e do exon 7. A divisão dos grupos para análise estatística foi feita segundo a ausência (selvagem) ou presença de pelo menos um alelo polimórfico (polimórfico), em relação a cada polimorfismo. Foi feita análise de haplótipos, incluindo indivíduos selvagens para ambos os polimorfismos em um grupo e homocigotos polimórficos para ambos os polimorfismos em outro. Não foram encontradas diferenças de FC_{rec} e VFC entre grupos para o polimorfismo da região promotora, nem para o exon 7, nem entre haplótipos, contrariando a hipótese inicial de que indivíduos polimórficos teriam menor reativação parassimpática, verificada pela FC_{rec} mais lenta e menor VFC.

Palavras-chave: frequência cardíaca; exercício; polimorfismos; óxido nítrico

ABSTRACT

Autonomic dysfunction is a central mechanism in the development and progression of cardiovascular diseases, and is a marker and predictor of cardiovascular events. Physical activity requires important responses of cardiovascular system and adequate autonomic regulation of cardiac activity, essential for maintaining homeostasis. During exercise, there is an increase of sympathetic activity and an impairment of parasympathetic activity in heart, which leads to an increase of heart rate (HR). Immediately after exercise, there is a parasympathetic reactivation and HR returns to similar values before exercise. A blunted parasympathetic reactivation is associated to poor clinical outcomes. There are two indexes that are used to assess parasympathetic activity: heart rate recovery (HRR) and heart rate variability (HRV). Some studies indicate that nitric oxide (NO) may have a role in autonomic function and HR and that endothelial nitric oxide synthase (eNOS) reduces NO bioavailability even in healthy individuals and could explain, at least in part, inter-individual differences in responses of cardiovascular system to physiological and pathophysiological stimuli. The aim of this study was to investigate the influence of promoter and exon 7 eNOS gene polymorphisms in HRR and HRV on the first 5 min after a cardiopulmonary exercise test (CPET). The subjects (139 volunteers) were healthy, sedentary and non-smokers. They underwent to a CPET, with monitoring of FC by electrocardiogram and HR monitor. HR values were obtained at peak exercise and after 1, 3 and 5 min of recovery, to calculate $\Delta 1\text{min}$, $\Delta 3\text{min}$, $\Delta 5\text{min}$, respectively. The kinetics of HR and Tau constant were also calculated with this HR values. The beat-to-beat HR was recorded to calculate RMSSD and analysis of HRV. Volunteers were genotyped for promoter and exon 7 eNOS gene polymorphisms. Subjects were classified into groups based on absence (wild) or presence of, at least, one polymorphic allele (polymorphic) for each polymorphism. Haplotype analysis was performed, including wild individuals for both polymorphisms in a group and polymorphic homozygous for both polymorphisms in other. There were no differences of HRR and HRV between groups neither of promoter nor exon 7 polymorphisms, or between haplotypes, contradicting the initial hypothesis that polymorphic subjects could have lower parasympathetic reactivation, evidenced by a slower HRR and lower HRV.

Key-words: heart rate; exercise; polymorphisms; nitric oxide

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Demonstração da constante Tau	17
Figura 2: Esquema de obtenção de dados e índices matemáticos para análise.....	18
Figura 3: Eletroforese e genotipagem região promotora	19
Figura 4: Eletroforese e genotipagem exon 7.....	21
Figura 5: RMSSD a cada 30 s de recuperação segundo polimorfismo Promotora ...	25
Figura 6: RMSSD a cada 30 s de recuperação segundo polimorfismo Exon 7	27
Figura 7: RMSSD a cada 30 s de recuperação segundo haplótipos	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Antropometria, características bioquímicas e funcionais da população do estudo	23
Tabela 2: Número de indivíduos selecionados por análise	23
Tabela 3: Antropometria, características bioquímicas e funcionais por grupo segundo polimorfismo Promotora	24
Tabela 4: Comparação FCrec segundo polimorfismo Promotora.....	24
Tabela 5: Antropometria, características bioquímicas e funcionais por grupo segundo polimorfismo Exon 7	26
Tabela 6: Comparação FCrec segundo polimorfismo Exon 7	26
Tabela 7: Antropometria, características bioquímicas e funcionais por grupo segundo haplótipos	28
Tabela 8: Comparação FCrec segundo haplótipos	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sulfato de amônio
C	Citosina
cGMP	Guanosina monofosfato cíclico
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FC	Frequência cardíaca
FCrec	Recuperação da frequência cardíaca
G	Guanina
HCl	Ácido clorídrico
IMC	Índice de massa corporal
KCl	Cloreto de potássio
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (low density protein)
L-NMMA	N ^G -monometil L-arginina
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
min	Minutos
NaCl	Cloreto de sódio
NO	Óxido nítrico
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction)
RMSSD	Raíz quadrados da soma de quadrados de diferenças sucessivas (root mean square of successive differences)
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
SNA	Sistema nervoso autônomo
T	Timina
TCPE	Teste cardiopulmonar de exercício
TE	Tris-EDTA
VFC	Variabilidade da frequência cardíaca

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO	8
OBJETIVO.....	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
MÉTODOS	14
AMOSTRA	14
PROTOCOLO	15
Primeira visita – Exames Laboratoriais Bioquímicos	15
Segunda visita – Avaliação Clínica.....	15
Terceira visita – Teste cardiopulmonar de exercício.....	15
Genotipagem	18
Haplótipos.....	20
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
RESULTADOS	23
COMPARAÇÕES POLIMORFISMO PROMOTORA.....	24
COMPARAÇÕES POLIMORFISMO EXON 7	26
COMPARAÇÕES HAPLÓTIPOS	28
DISCUSSÃO	30
CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

INTRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO

Doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade em muitos países, inclusive no Brasil. Independentemente dos fatores causais, a disfunção autonômica [1, 2] constitui um dos mecanismos centrais no desenvolvimento e progressão de doenças do sistema cardiovascular, e é marcador precoce de doença [3], bem como preditor de eventos cardiovasculares [4].

A modulação autonômica cardiovascular é fundamental para a manutenção da homeostasia [2] e o acometimento do sistema nervoso autônomo (SNA) nas doenças cardiovasculares tem sido objeto de intensas investigações nas últimas décadas [1-3].

A realização de exercício físico provoca importantes alterações no sistema cardiovascular, que exigem rápidas respostas adaptativas. O aumento e manutenção do fluxo sanguíneo nos grupamentos musculares recrutados pelo exercício requerem aumento do débito cardíaco, através de aumento da frequência cardíaca (FC) e do volume sistólico, dilatação dos leitos vasculares que estão com taxa metabólica aumentada e constrição em leitos de tecidos menos necessários durante o exercício, como a circulação esplâncnica e dos músculos em menor atividade. Estas respostas dependem da produção de substâncias vasodilatadoras pelo endotélio dos leitos vasculares de tecidos ativos e de uma modulação autonômica que promove, através do parassimpático, vasodilatação nos músculos em atividade e, através do simpático, vasoconstrição dos músculos inativos.

Durante o exercício, ocorre aumento da FC devido, entre outros fatores, ao predomínio do estímulo simpático sobre o parassimpático no coração. Imediatamente após o exercício, deve ocorrer uma reativação parassimpática e rápido retorno da FC a valores pré-exercício, aqui chamado de recuperação da FC

(FCrec). A análise da FCrec serve como índice da atividade parassimpática, em que uma recuperação mais rápida representa maior atividade parassimpática. Uma reativação parassimpática de menor magnitude leva a uma FCrec mais lenta e está associada a desfechos clínicos desfavoráveis [5].

A FC está constantemente submetida a flutuações da atividade autonômica determinadas pela ativação e/ou inibição simpática e parassimpática, em resposta a estímulos diversos. O estudo da variabilidade da FC (VFC) permite a análise de forma não-invasiva da modulação autonômica pelas flutuações que a FC sofre durante um período pré-determinado [6]. Estudos demonstraram que a VFC constitui um importante fator prognóstico para o aparecimento de eventos cardíacos [7], em que sua diminuição correlaciona-se ao aumento da incidência de eventos cardíacos isquêmicos [8]. Pode-se afirmar que, em uma análise simplificada no domínio do tempo, a VFC seja um marcador diretamente proporcional da atividade parassimpática, e a diminuição desta correlaciona-se à incidência de eventos isquêmicos.

A disfunção autonômica está associada ao estilo de vida do indivíduo e ao risco aumentado de desenvolvimento de doença cardiovascular. Várias intervenções tem sido investigadas para atenuá-la ou revertê-la. Estudos transversais [9, 10] e longitudinais [11, 12] tem mostrado que o treinamento físico aumenta a atividade parassimpática e diminui a simpática, o que, em parte, parece explicar a redução da morbidade e mortalidade cardiovascular em indivíduos com melhor condicionamento físico [1, 4, 13]. Considerando que a adaptação fisiológica ao treinamento consiste, inicialmente, na somação temporal de efeitos agudos e subagudos do exercício [14], a investigação dos mecanismos fisiológicos envolvidos nas respostas hemodinâmicas após uma sessão de exercício pode contribuir para o entendimento

do processo de diminuição do risco de doenças crônicas como resultado do treinamento físico.

A atividade física regular é uma poderosa medida de prevenção e tratamento de doenças crônicas e podem representar uma forma de promover saúde pública com baixos custos. Entretanto, existe grande variabilidade nas respostas ao treinamento físico, especificamente quanto às respostas da modulação autonômica, e grande parte desta variação pode ser atribuída a fatores genéticos.

Recentemente, após o término do sequenciamento do DNA humano pelos projetos Genoma e HapMap, tem sido possível caracterizar variações em genes (polimorfismos de nucleotídeos únicos) que estão associadas à variabilidade inter-individual nas respostas e adaptações a estímulos fisiológicos [15] e a desfechos clínicos [16, 17]. Estudos envolvendo polimorfismos do gene da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) tem despertado grande interesse da comunidade científica, visto que a produção adequada de óxido nítrico (NO) pela eNOS é fundamental para a homeostasia cardiovascular [18], devido, entre outros fatores, à sua participação na modulação da função autonômica [19-23].

Dois dos polimorfismos do gene da eNOS mais estudados até o momento são o -786T>C, na região promotora, e o 894G>T, no exon 7. No polimorfismo -786T>C, há uma troca de timina para citosina na região promotora, a uma distância de 786 pares de base do códon de iniciação da transcrição do gene. Este polimorfismo tem sido associado a espasmo coronariano [24], e já foi encontrada diferença de sua ocorrência entre atletas de potência e endurance [25]. No polimorfismo 894G>T, no exon 7, há uma troca de guanina para timina na posição 894 da sequência de pares de bases do gene, que provoca a substituição do aminoácido glutamato pelo aspartato na posição 298 da sequência de aminoácidos da eNOS. Este polimorfismo

tem sido associado a doenças como coronariopatia [26], infarto do miocárdio [27], hipertensão [28] e acidente vascular encefálico [29].

Alguns mecanismos moleculares envolvidos nos polimorfismos do gene da eNOS já foram identificados. Um grupo de pesquisadores japoneses mostrou menor atividade de transcrição da eNOS em indivíduos que apresentavam o polimorfismo da região promotora [24]. Um grupo de pesquisadores americanos mostrou que o polimorfismo do exon 7 provoca localização alterada da eNOS nas cavéolas das células endoteliais, levando a diminuição da resposta dependente do estresse de cisalhamento, assim como alteração da coordenação do ciclo regulatório da eNOS [30]. Em tese, estas alterações moleculares, e provavelmente outras que podem estar envolvidas, contribuem com o processo de desenvolvimento e progressão da disfunção autonômica. Até o momento, estudos funcionais em humanos mostraram disfunção autonômica mais avançada em pacientes com insuficiência cardíaca que apresentavam o polimorfismo da região promotora [31], além de redução dos níveis basais de óxido nítrico [32] em indivíduos com os polimorfismos da região promotora e/ou do exon 7.

Existe também interesse em investigar-se o efeito combinado da ocorrência de mais de um polimorfismo genético sobre as variáveis fisiológicas a que estão associados [33, 34]. Uma determinada combinação de genótipos de polimorfismos em um indivíduo é chamada de haplótipo. Alguns estudos sobre a eNOS também já fizeram análises de haplótipos para seus diversos polimorfismos [35, 36].

Considerando que polimorfismos genéticos da enzima eNOS parecem estar relacionados com a biodisponibilidade de NO, e que o NO parece ter importante participação na atividade autonômica, é possível que até mesmo indivíduos saudáveis com polimorfismo do gene da enzima eNOS apresentem respostas

diferentes de modulação autonômica, inclusive durante e após situações que envolvam estresse físico.

Visto que a disfunção autonômica faz parte da história natural das doenças cardiovasculares [37], sendo considerada potente preditora de mortalidade [4], e que ainda não estão claras na literatura as possíveis alterações funcionais decorrentes de polimorfismos da eNOS, este trabalho pretende testar a hipótese de que indivíduos portadores de algum destes polimorfismos apresentem menor reativação e modulação parassimpática após o exercício, evidenciadas por uma FCrec mais lenta e menor VFC neste período de recuperação.

OBJETIVO

Investigar a influência de polimorfismos do gene da eNOS sobre o comportamento da FC após um teste cardiopulmonar de exercício (TCPE).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a FC_{rec} e a VFC nos primeiros 5 min após um TCPE de grupos de diferentes genótipos para o polimorfismo -786T>C da região promotora do gene da eNOS.
- Comparar a FC_{rec} e a VFC nos primeiros 5 min após um TCPE de grupos de diferentes genótipos para o polimorfismo 894G>T do exon 7 do gene da eNOS.
- Comparar a FC_{rec} e a VFC nos primeiros 5 min após um TCPE de grupos de diferentes haplótipos para os polimorfismos da região promotora e do exon 7 do gene da eNOS.

MÉTODOS

AMOSTRA

O recrutamento de voluntários e coleta de dados foi feito ao longo de três anos. Foram incluídos no estudo 139 voluntários, na faixa etária entre 18 e 49 anos, de ambos os sexos, que apresentaram exame físico e bioquímico normal.

Os critérios de exclusão foram:

- Índice de massa corporal (IMC) inferior a $18,5 \text{ kg/m}^2$ (desnutrição) ou superior a $34,9 \text{ kg/m}^2$ (obesidade grau II e III) [38];
- Glicemia de jejum $\geq 100 \text{ mg/dL}$ [39];
- Colesterol total $\geq 240 \text{ mg/dL}$ e/ou LDL-colesterol $\geq 160 \text{ mg/dL}$ e/ou triglicérides $\geq 200 \text{ mg/dL}$ [40];
- Pressão arterial sistólica (PAS) $\geq 140 \text{ mmHg}$ e/ou pressão arterial diastólica (PAD) $\geq 90 \text{ mmHg}$ [41];
- Doenças em curso de qualquer etiologia;
- Uso de medicações (exceto anticoncepcional);
- Mulheres em esquema de reposição hormonal ou que estivessem em período gestacional;
- Tabagistas;
- Praticantes de atividade física regular ou ex-praticantes de atividade física regular por menos de 3 meses.

Todos os indivíduos selecionados para participar do projeto foram esclarecidos quanto aos procedimentos adotados no estudo, seus potenciais riscos e medidas de precaução e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética da instituição (CEP-CCM/HUAP 005/07). O recrutamento dos voluntários foi realizado por mídia impressa e eletrônica.

PROTOCOLO

A avaliação completa incluiu três visitas no período da manhã. Os voluntários foram orientados a não realizar qualquer tipo de atividade física, bem como a abster-se de bebidas alcoólicas e cafeinadas nas 24 horas anteriores a cada visita.

Primeira visita – Exames Laboratoriais Bioquímicos

Após um período de jejum de 12 horas, foi coletada uma amostra inicial de sangue para a realização das seguintes dosagens: glicose basal, insulina plasmática, colesterol total e frações, triglicerídeos, proteína C reativa quantitativa e leptina.

Segunda visita – Avaliação Clínica

Exame clínico e histórico médico

Um profissional médico realizou o exame clínico completo, com avaliação da história médica pregressa e história familiar, além da medida de pressão arterial (PA) de repouso com esfigmomanômetro manual e eletrocardiograma (ECG) de repouso. Também foram feitas as medidas do peso, da altura e o cálculo do IMC dos voluntários.

Coleta de sangue para genotipagem

Foi coletada uma amostra de sangue da veia cubital (1 tubo com EDTA de 4 mL) para extração do DNA e análise dos genótipos dos polimorfismos da eNOS.

Terceira visita – Teste cardiopulmonar de exercício

O TCPE foi realizado em esteira rolante (Inbramed, Porto Alegre – Brasil) segundo um protocolo de intensidade máxima e continuamente progressivo (protocolo

de rampa sintoma-limitado) estabelecido individualmente, com o intuito de atingir a capacidade funcional máxima estimada de 8 a 12 min de teste [42].

Os voluntários passaram por um período de repouso antes do teste. Foram levados à esteira e preparados para o teste, com a fixação de eletrodos para ECG (WelchAllyn Cardioperfect Workstation – EUA), colocação da cinta de monitor cardíaco ou frequencímetro (Polar Electro Oy, Kempele, Finlândia), e escolha da interface para coleta de dados ventilatórios (máscara ou bocal). Na sequência, foram esclarecidos quanto aos procedimentos, medidas de segurança etc.

Todos os testes foram precedidos de um aquecimento com caminhada a 3,0 km/h e inclinação zero, durante 3 min. Após este período, iniciava-se a fase de rampa do teste, em que ocorriam sucessivos incrementos de velocidade e inclinação a cada minuto. Estas taxas de incremento foram determinadas individualmente, de acordo com gênero, IMC e idade do voluntário, para propiciar que o mesmo atingisse o nível máximo de exercício com 8 a 12 min de teste. O teste somente era encerrado quando o voluntário afirmasse estar exausto, ou se fossem detectadas anormalidades e sintomas adversos. Após o voluntário atingir o nível máximo de esforço, foi feita recuperação ativa por 5 min, a 4,0 km/h e inclinação zero. Para este estudo, somente foram incluídos os dados dos testes em que fossem atingidas a FC máxima prevista e uma razão de troca respiratória de 1,15 ou superior. Foram excluídos os testes com anormalidades eletrocardiográficas.

Simultaneamente com o exercício e durante a recuperação, foi feita coleta dos dados referentes à ventilação e gases expirados, obtidos por um analisador metabólico digital (Ultima, MedGraphics, EUA) acoplado a um computador, monitorização pelo ECG em 12 derivações e registro da FC batimento a batimento pelo frequencímetro. Através do ECG, foram obtidos os valores da FC a cada minuto após o término do

teste, que foram usados pra determinar a magnitude da FC_{rec}. Foram escolhidos para esta análise os seguintes valores: Diferença entre a FC no pico do esforço e aquela após 1, 3 e 5 min de recuperação, aqui chamados de $\Delta 1\text{min}$, $\Delta 3\text{min}$ e $\Delta 5\text{min}$, respectivamente. Com os mesmos valores, também foi calculada a cinética da FC através de regressão monoexponencial, que gera uma constante chamada *Tau*, que determina o tempo necessário para a obtenção de 63% da resposta esperada de um fenômeno, neste caso, o decaimento da FC.

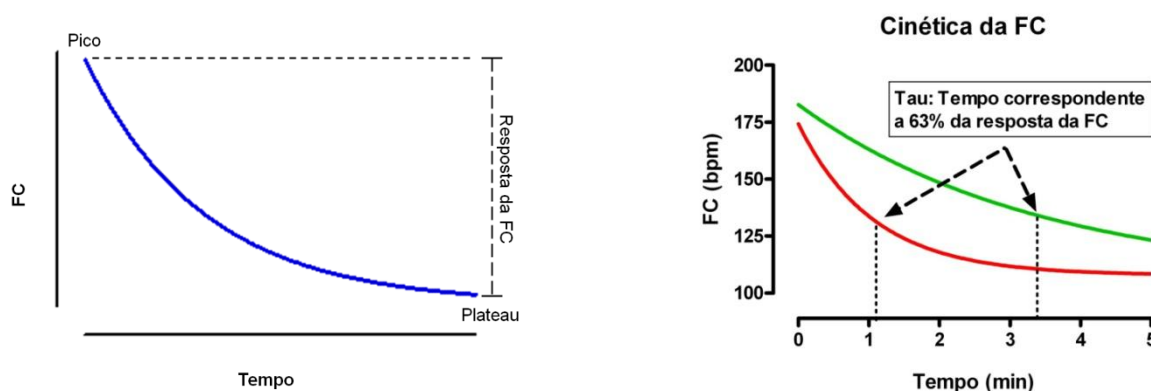


Figura 1: Demonstração da constante Tau

Através do registro de FC batimento a batimento feito pelo frequencímetro, foram obtidos os intervalos R-R, que são os intervalos de tempo entre cada batimento do coração, geralmente expressos em milissegundos. Com estes valores, foi feita a análise da VFC, pelo cálculo do RMSSD (raiz quadrada da soma de quadrados de diferenças sucessivas) dos intervalos R-R [43] a cada 30 segundos, através de rotina desenvolvida no programa MatLab R12 (Mathworks Inc., EUA) (Figura 1).

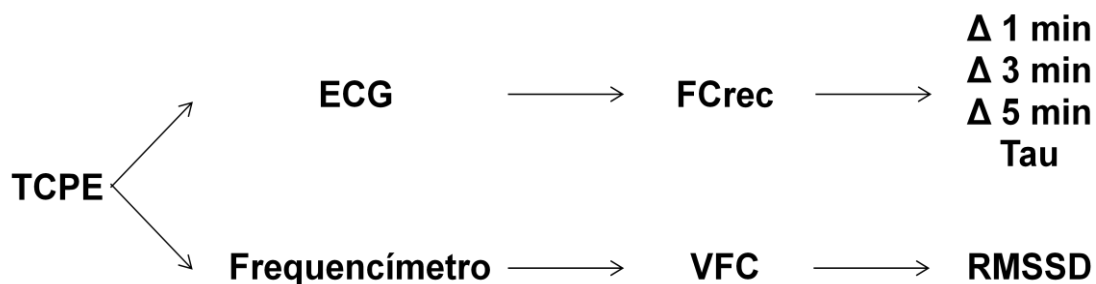


Figura 2: Esquema de obtenção de dados e índices matemáticos para análise

Genotipagem

Extração de DNA

A extração de DNA genômico a partir de sangue total foi realizada por método manual de precipitação salina. Resumidamente, na técnica manual, as amostras são submetidas à lise celular com 12 mL do tampão Tris-1 (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, KCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 2 mM pH 8,0) contendo Triton X-100 a 2,5%. Após centrifugação a 3.000 rpm por 5 min, os núcleos celulares são lisados com 500 µL do tampão Tris-2 (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, KCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 2 mM pH 8,0, NaCl 0,4 M) contendo SDS a 1%. As proteínas são removidas por precipitação salina com 80 µL de NaCl 5 M. O DNA presente no sobrenadante é isolado por precipitação etanólica e finalmente, ressuspensão em 100 µL do tampão TE (Tris-HCl 10 mM e 1 mM EDTA, pH 8,0), mantido a -20°C, até o momento do uso [44].

Genotipagem do polimorfismo da região promotora

Para a detecção do polimorfismo -786T>C na região promotora do gene da eNOS, foi realizada amplificação da região específica do gene que pode conter o polimorfismo via reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os *primers* 5'-ATG CTC CCA CCA GGG CAT CA-3' (sense) e 5'-GTC CTT GAG TCT GAC ATT AGG G-3' (antisense). As amostras foram preparadas para o PCR da seguinte forma: 28,8

μL de água Mili-Q, 1,5 μL de DNA genômico e diversos reagentes de kits industriais (5,0 μL de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5,0 μL de dNTP, 5,0 μL de DMSO, 4,0 μL de MgCl_2 , 1,0 μL de *primer* sense, 1,0 μL de *primer* antisense e 0,2 μL de enzima Taq polimerase). Após o preparo das amostras, estas foram colocadas no termociclador para a execução do PCR. O programa utilizado foi: 94°C/30 s, 51°C/40 min e 72°C/1 min, repetido 35 vezes. Após a finalização da programação do PCR, foi preparado um mix de enzima de restrição, do qual foram utilizados 8,0 μL em cada amostra, compostos por 0,8 μL de NgoMIV (New England Biolabs), 1,4 μL de tampão NEBuffer 4 e 5,8 μL de água Mili-Q. Em seguida, as amostras foram incubadas durante um período de 12 a 16 horas em câmara úmida à 37°C. Após esse processo, as amostras foram acrescidas de tampão de amostra (30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol e 0,25% xileno cianol) e analisadas por eletroforese (100 V constante, durante 40 min) em gel de agarose a 2%, marcado com brometo de etídio (1,0 mg/mL). Por último, foi feita a visualização por transiluminação ultravioleta dos fragmentos obtidos, os quais tem: 237 pb para o alelo selvagem, contendo o nucleotídeo T, e 204 pb e 33 pb para o alelo polimórfico, contendo o nucleotídeo C [45]. Os indivíduos foram agrupados segundo a ausência ou presença do alelo polimórfico da seguinte forma: TT

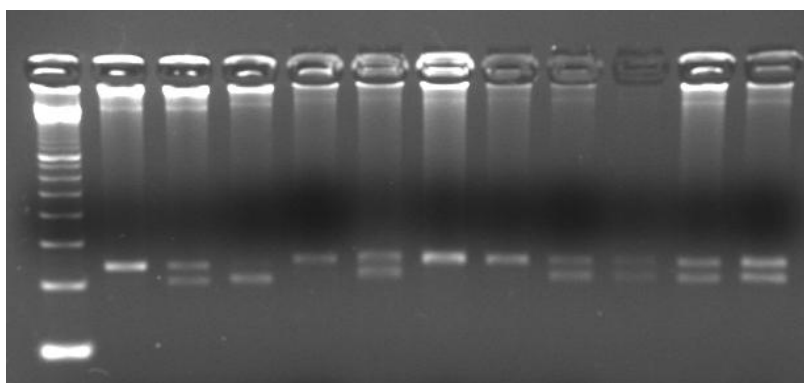


Figura 3: Eletroforese e genotipagem região promotora

(selvagem), CT e CC (polimórficos).

Genotipagem do polimorfismo do exon 7

As variantes genéticas do polimorfismo 894G>T, que está localizado no exon 7 do gene da eNOS, foram determinadas pela PCR, usando os *primers* 5'-AAG GCA GGA GAC AGT GGA TGG A-3' (sense) e 5'-CCC AGT CAA TCC CTT TGG TGC TCA-3' (antisense). As amostras foram preparadas para o PCR da seguinte forma: 28,8 µL de água Mili-Q, 0,9 µL de DNA genômico e diversos reagentes de kits industriais (5,0 µL de (NH₄)₂SO₄, 5,0 µL de dNTP, 5,0 µL de DMSO, 4,0 µL de MgCl₂, 0,5 µL de *primer* sense, 0,5 µL de *primer* antisense e 0,2 µL de enzima Taq polimerase). Após o preparo das amostras, estas foram colocadas no termociclador para a execução do PCR. O programa utilizado foi: 92°C/30 s, 62°C/1 min e 72°C/1 min, repetido 35 vezes. Após a finalização da programação do PCR, foi preparado um mix de enzima de restrição, do qual foram utilizados 8,0 µL em cada amostra, compostos por 0,6 µL de enzima de restrição BanII (New England Biolabs), 1,4 µL de tampão NEBuffer 4 (New England Biolabs) e 6,0 µL de água Mili-Q. Em seguida, as amostras foram incubadas durante um período de 12 a 16 horas em câmara úmida à 37°C. Após esse processo, as amostras foram acrescidas de tampão de amostra (30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol e 0,25% xileno cianol) e analisadas por eletroforese (100 V constante, durante 30 min) em gel de agarose a 2%, marcado com brometo de etídio (1,0 mg/mL). Por último, foi feita a visualização por transiluminação ultravioleta dos fragmentos obtidos, os quais tinham: 248 pb para o alelo selvagem, contendo o nucleotídeo G, e 158 pb e 90 pb para o alelo polimórfico, contendo o nucleotídeo T [46]. Os indivíduos foram agrupados segundo a ausência ou presença do alelo polimórfico da seguinte forma: GG (selvagem), GT e TT (polimórficos).

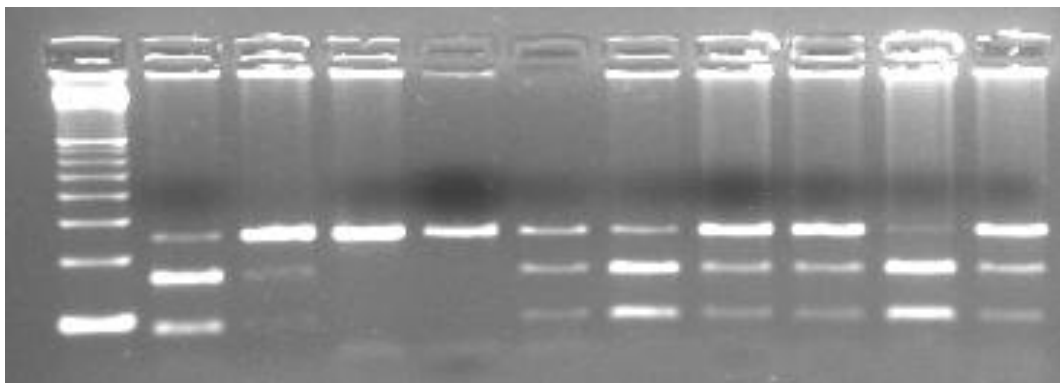


Figura 4: Eletroforese e genotipagem exon 7

Haplótipos

Com a intenção de avaliar o possível efeito combinado da presença dos dois polimorfismos, foi feita uma análise de haplótipos, isto é, uma comparação entre grupos considerando a presença ou ausência dos dois polimorfismos. Escolheu-se comparar apenas os indivíduos homocigotos, isto é, um grupo com indivíduos selvagens para ambos polimorfismos (Promotora: TT e Exon 7: GG) *versus* indivíduos homocigotos polimórficos para ambos polimorfismos (Promotora: CC e Exon 7: TT)

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando necessário, foi realizada transformação logarítmica, visando obter uma distribuição normal para a aplicação de testes paramétricos. A comparação entre os resultados obtidos nos grupos com e sem polimorfismo foi realizada utilizando o teste t de *Student* não-pareado no caso de variáveis com distribuição normal, e teste de Mann-Whitney no caso de variáveis não-paramétricas. Variáveis descontínuas foram analisadas utilizando o teste qui-quadrado. Os dados são apresentados como média \pm desvio-padrão ou mediana \pm diferença interquartílica nas estatísticas descritivas, e média \pm erro-padrão ou mediana \pm diferença interquartílica nas comparações entre grupos,

conforme apropriado. A significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$. A regressão monoexponencial para obter a cinética da FC foi feita no programa GraphPad Prism 5. As análises foram realizadas através dos programas STATISTICA 8.0 e Microsoft Office Excel 2007.

RESULTADOS

A tabela 1 apresenta a descrição de todos os indivíduos incluídos no estudo. Devido à baixa qualidade de alguns dados e problemas durante as análises, não foi possível incluir todos os indivíduos em todas as análises. A tabela 2 mostra o número de indivíduos selecionados para cada análise.

Tabela 1: Antropometria, características bioquímicas e funcionais da população do estudo

Variáveis	
N (% mulheres)	139 (79%)
Idade (anos)*	32 ± 15
Peso (kg)*	69,8 ± 17,3
IMC (kg.m ²)*	25,8 ± 5,5
Colesterol (mg.dL ⁻¹)	177 ± 33
HDL (mg.dL ⁻¹)*	53 ± 18
LDL (mg.dL ⁻¹)*	105 ± 41
VLDL (mg.dL ⁻¹)*	16 ± 11
Triglicerídeos (mg.dL ⁻¹)*	81 ± 53
Glicose (mg.dL ⁻¹)*	86 ± 11
Insulina (uUI.mL ⁻¹)*	6,67 ± 5,97
HOMA*	1,37 ± 1,32
PCR (mg.dL ⁻¹)*	0,3 ± 0,3
Leptina (ng.mL ⁻¹)*	13,3 ± 14,4
PAS (mmHg)	115 ± 11
PAD (mmHg)*	72 ± 10
VO ₂ máx relativo (mL.kg ⁻¹ .min ⁻¹)*	28,8 ± 9,5

Média ± desvio-padrão; (*)Mediana ± diferença interquartilica;
 IMC: índice de massa corporal; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; HOMA: índice de resistência à insulina;
 PCR: proteína C reativa; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; VO₂ máx: consumo de oxigênio máximo

Tabela 2: Número de indivíduos selecionados por análise

	FCrec	VFC
Exon 7	138	68
Promotora	133	68
Haplótipos	31	20

FCrec: Recuperação da frequência cardíaca; VFC: Variabilidade da frequência cardíaca

COMPARAÇÕES POLIMORFISMO PROMOTORA

Os grupos foram semelhantes quanto às variáveis antropométricas, bioquímicas, PA, capacidade funcional e percentual de mulheres (Tabela 3). Não foi encontrada diferença significativa para nenhuma das variáveis relativas à FCrec (Tabela 4). Também não houve diferença nos valores de RMSSD a cada 30s (Figura 2).

Tabela 3: Antropometria, características bioquímicas e funcionais por grupo segundo polimorfismo Promotora

Variáveis	Selvagem	Polimórfico	P-Valor
N (% mulheres)	67 (88%)	66 (77%)	0,100
Idade (anos)*	32 ± 14	30 ± 17	0,722
Peso (kg)	69,2 ± 1,6	69,8 ± 1,4	0,776
IMC (kg.m ²)*	26,3 ± 5,7	25,4 ± 5,5	0,463
Colesterol (mg.dL ⁻¹)	179 ± 4	176 ± 4	0,601
HDL (mg.dL ⁻¹)*	53 ± 16	53 ± 22	0,789
LDL (mg.dL ⁻¹)	108 ± 3	105 ± 4	0,551
VLDL (mg.dL ⁻¹)*	17 ± 11	15 ± 11	0,824
Triglicérides (mg.dL ⁻¹)*	84 ± 50	76 ± 57	0,772
Glicose (mg.dL ⁻¹)*	85 ± 11	86 ± 12	0,998
Insulina (uUI.mL ⁻¹)*	6,70 ± 5,76	6,92 ± 6,08	0,993
HOMA*	1,29 ± 1,27	1,40 ± 1,30	0,937
PCR (mg.dL ⁻¹)*	0,3 ± 0,4	0,3 ± 0,3	0,340
Leptina (ng.mL ⁻¹)*	13,5 ± 14,9	13,3 ± 15,2	0,424
PAS (mmHg)*	114 ± 14	116 ± 14	0,253
PAD (mmHg)*	70 ± 14	72 ± 10	0,278
VO ₂ máx relativo (mL.kg ⁻¹ .min ⁻¹)*	28,2 ± 8,8	29,1 ± 9,1	0,285

Média ± erro-padrão; (*)Mediana ± diferença interquartílica;

Selvagem: TT; Polimórfico: CT/CC

IMC: índice de massa corporal; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; HOMA: índice de resistência à insulina; PCR: proteína C reativa; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; VO₂ máx: consumo de oxigênio máximo

Tabela 4: Comparação FCrec segundo polimorfismo Promotora

	Selvagem	Polimórfico	P-Valor
FCpico (bpm)	184±2	184±1	0,738
Δ1min (bpm)	22±1	22±1	0,909
Δ3min (bpm)	50±1	50±1	0,938
Δ5min (bpm)	57±1	56±1	0,813
Tau (min:s)*	2:06±1:14	2:06±1:11	0,566

Média ± erro-padrão; (*)Mediana ± diferença interquartílica;

Selvagem: TT; Polimórfico: CT/CC

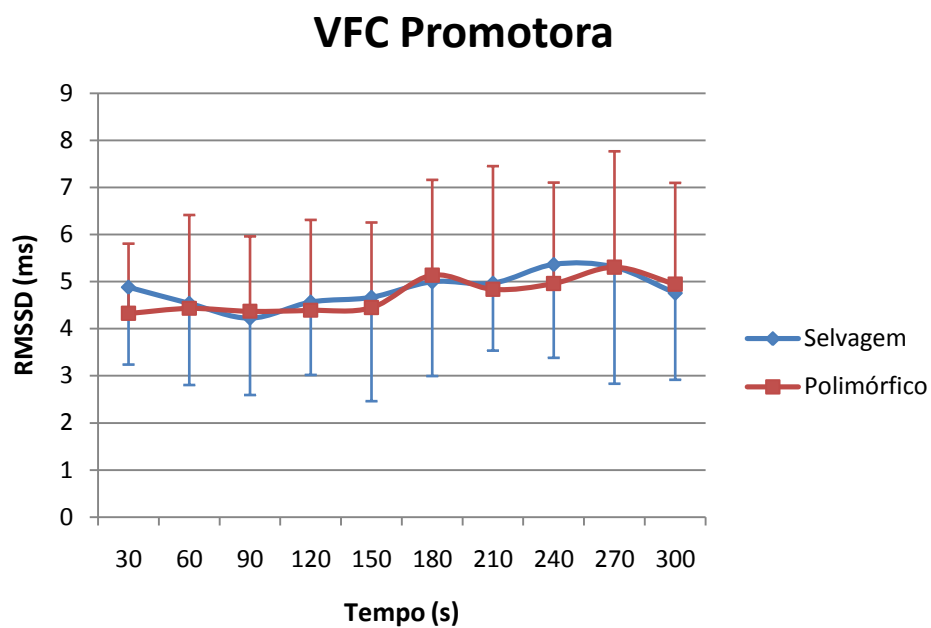


Figura 5: RMSSD a cada 30 s de recuperação segundo polimorfismo Promotora
Mediana \pm diferença interquartílica
Selvagem: TT n=31; Polimórfico: CT/CC n=37

COMPARAÇÕES POLIMORFISMO EXON 7

Os grupos foram semelhantes quanto às variáveis antropométricas, bioquímicas, PA, capacidade funcional e percentual de mulheres (Tabela 5). Não foi encontrada diferença significativa para nenhuma das variáveis relativas à FCrec (Tabela 6). Também não houve diferença nos valores de RMSSD a cada 30s (Figura 3).

Tabela 5: Antropometria, características bioquímicas e funcionais por grupo segundo polimorfismo Exon 7

Variáveis	Selvagem	Polimórfico	P-Valor
N (% mulheres)	72 (81%)	66 (79%)	0,797
Idade (anos)*	32 ± 17	31 ± 13	0,755
Peso (kg)*	69 ± 21	71 ± 13	0,722
IMC (kg.m ²)*	25,2 ± 6,1	26,0 ± 4,6	0,936
Colesterol (mg.dL ⁻¹)	178 ± 4	177 ± 4	0,822
HDL (mg.dL ⁻¹)*	51 ± 13	55 ± 20	0,281
LDL (mg.dL ⁻¹)	107 ± 3	105 ± 4	0,735
VLDL (mg.dL ⁻¹)*	17 ± 10	15 ± 11	0,554
Triglicerídeos (mg.dL ⁻¹)*	85 ± 50	75 ± 53	0,565
Glicose (mg.dL ⁻¹)*	85 ± 12	86 ± 11	0,683
Insulina (uUI.mL ⁻¹)*	6,47 ± 5,13	7,52 ± 6,16	0,692
HOMA*	1,26 ± 1,22	1,47 ± 1,42	0,736
PCR (mg.dL ⁻¹)*	0,30 ± 0,32	0,30 ± 0,30	0,475
Leptina (ng.mL ⁻¹)*	13,0 ± 12,7	13,4 ± 16,7	0,893
PAS (mmHg)*	114 ± 13	116 ± 14	0,854
PAD (mmHg)*	70 ± 13	72 ± 11	0,309
VO ₂ máx relativo (mL.kg ⁻¹ .min ⁻¹)*	29,7 ± 10,4	28,6 ± 8,9	0,605

Média ± erro-padrão; (*)Mediana ± diferença interquartílica;

Selvagem: GG; Polimórfico: GT/TT

IMC: índice de massa corporal; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; HOMA: índice de resistência à insulina; PCR: proteína C reativa; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; VO₂ máx: consumo de oxigênio máximo

Tabela 6: Comparação FCrec segundo polimorfismo Exon 7

	Selvagem	Polimórfico	P-Valor
FCpico (bpm)	184±1	184±1	0,879
Δ1min (bpm)	22±1	22±1	0,726
Δ3min (bpm)	50±1	51±1	0,500
Δ5min (bpm)	57±1	57±1	0,876
Tau (min:s)*	2:02±1:15	2:05±1:12	0,770

Média ± erro-padrão; (*)Mediana ± diferença interquartílica

Selvagem: GG; Polimórfico: GT/TT

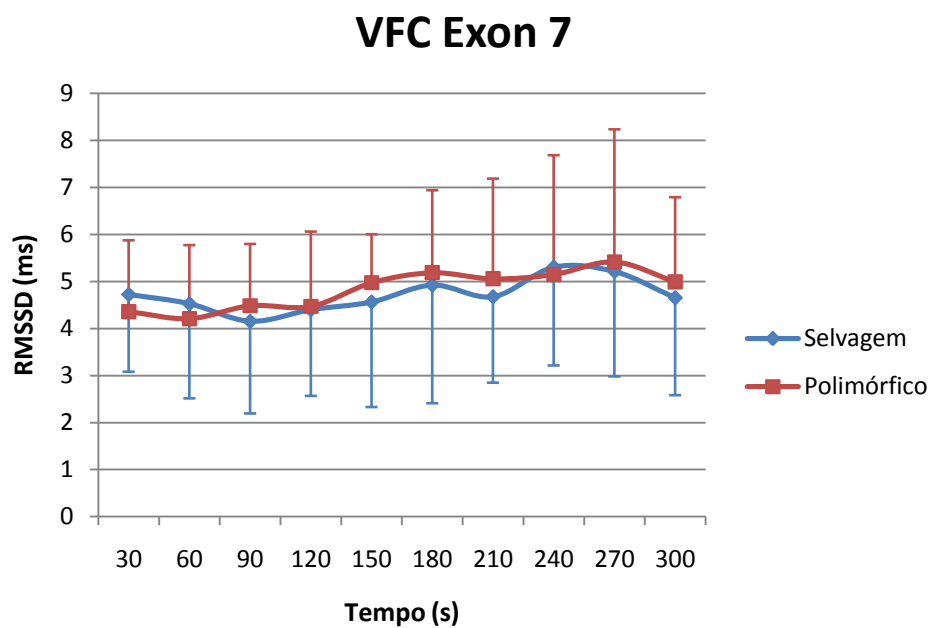


Figura 6: RMSSD a cada 30 s de recuperação segundo polimorfismo Exon 7

Mediana \pm diferença interquartílica

Selvagem: GG n=39; Polimórfico: GT/TT n=29

COMPARAÇÕES HAPLÓTIPOS

Os grupos foram semelhantes quanto às variáveis antropométricas, bioquímicas, PA, capacidade funcional e percentual de mulheres (Tabela 7). Não foi encontrada diferença significativa para nenhuma das variáveis relativas à FCrec (Tabela 8). Também não houve diferença nos valores de RMSSD a cada 30s (Figura 4).

Tabela 7: Antropometria, características bioquímicas e funcionais por grupo segundo haplótipos

Variáveis	Selvagem	Polimórfico	P-Valor
N (% mulheres)	23 (91%)	8 (75%)	0,236
Idade (anos)	33 ± 2	31 ± 3	0,513
Peso (kg)*	65,3 ± 23,5	68,1 ± 5,1	0,794
IMC (kg.m ²)	26,9 ± 1,0	24,1 ± 0,8	0,131
Colesterol (mg.dL ⁻¹)	183 ± 5	173 ± 8	0,344
HDL (mg.dL ⁻¹)	51 ± 2	51 ± 4	0,865
LDL (mg.dL ⁻¹)	112 ± 5	106 ± 8	0,542
VLDL (mg.dL ⁻¹)	20 ± 2	16 ± 2	0,171
Triglicerídeos (mg.dL ⁻¹)	102 ± 9	79 ± 9	0,165
Glicose (mg.dL ⁻¹)	82 ± 2	82 ± 3	0,926
Insulina (uUI.mL ⁻¹)*	6,19 ± 5,52	4,55 ± 7,88	0,679
HOMA*	1,16 ± 1,30	0,89 ± 1,49	0,794
PCR (mg.dL ⁻¹)*	0,60 ± 0,46	0,40 ± 0,48	0,249
Leptina (ng.mL ⁻¹)*	13,4 ± 15,2	8,3 ± 21,2	0,299
PAS (mmHg)*	112 ± 12	113 ± 14	0,924
PAD (mmHg)*	72 ± 6	69 ± 10	0,849
VO ₂ máx relativo (mL.kg ⁻¹ .min ⁻¹)*	26,9 ± 7,2	33,1 ± 12,4	0,095

Média ± erro-padrão; (*)Mediana ± diferença interquartílica;

Selvagem: Promotora TT e Exon 7 GG; Polimórfico: Promotora CC e Exon 7 TT

IMC: índice de massa corporal; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; HOMA: índice de resistência à insulina; PCR: proteína C reativa; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; VO₂ máx: consumo de oxigênio máximo

Tabela 8: Comparação FCrec segundo haplótipos

	Selvagem	Polimórfico	P-Valor
FCpico (bpm)	184±3	185±4	0,894
Δ1min (bpm)	23±2	26±5	0,547
Δ3min (bpm)	51±3	54±6	0,545
Δ5min (bpm)	56±2	59±5	0,620
Tau (min:s)*	1:55±1:08	2:05±1:20	0,728

Média ± erro-padrão; (*)Mediana ± diferença interquartílica

Selvagem: Promotora TT e Exon 7 GG; Polimórfico: Promotora CC e Exon 7 TT

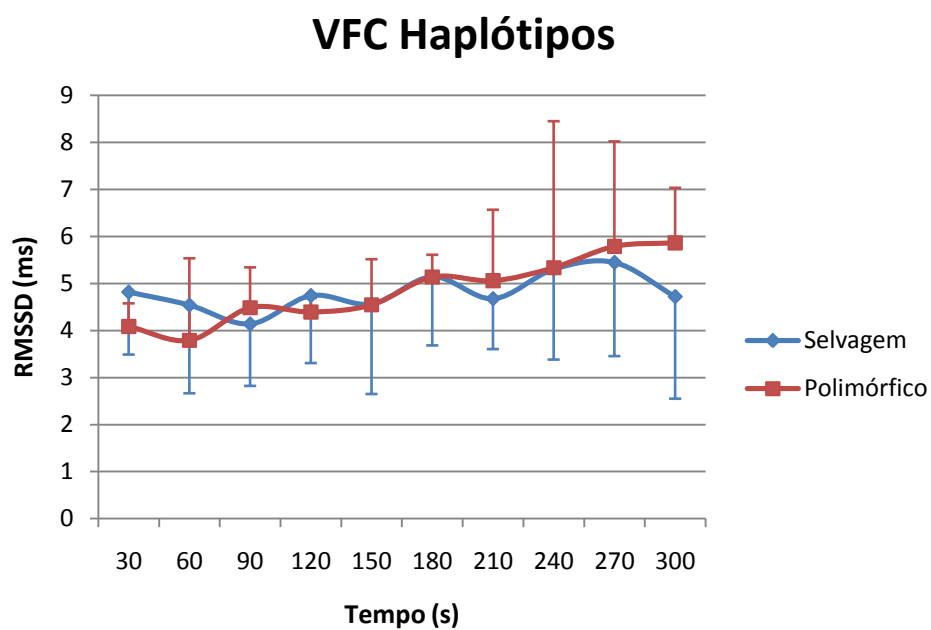


Figura 7: RMSSD a cada 30 s de recuperação segundo haplótipos

Mediana \pm diferença interquartílica

Selvagem: Promotora TT e Exon 7 GG n=15; Polimórfico: Promotora CC e Exon 7 TT n=5

DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou os efeitos da presença dos polimorfismos -786T>C (promotora) e 894G>T (exon 7) do gene da enzima eNOS, assim como o efeito combinado da presença de ambos sobre o comportamento da FC durante os primeiros 5 min após um TCPE. Não foram encontradas diferenças na FCrec nem na VFC nesse período entre grupos de diferentes genótipos para os polimorfismos da região promotora e do exon 7, bem como entre haplótipos envolvendo estes polimorfismos, contrariando a hipótese inicial de que indivíduos polimórficos teriam menor reativação parassimpática, verificada pela FCrec mais lenta e menor VFC.

Alguns estudos fizeram abordagens metodológicas semelhantes a este. Sears *et al.* [47] realizou estimulação adrenérgica artificial em tecido cardíaco de cobaias, simulando a condição de exercício, seguida de estímulo vagal ou aplicação de acetilcolina, comparando as condições com ou sem inibição da produção de NO por L-NMMA. Em seus resultados, afirmou que NO contribui para a diminuição da FC, acelerando a resposta do coração à estimulação vagal. O mesmo grupo também propôs um mecanismo molecular, em que o NO aumenta a produção de cGMP e, possivelmente, a liberação de acetilcolina [48]. Entretanto, ainda restam dúvidas sobre as respostas fisiológicas *in vivo*.

Em humanos, Binkley *et al.* [31] encontrou que pacientes com insuficiência cardíaca homozigotos para o polimorfismo da região promotora tiveram pior modulação autonômica, identificada por diferenças de VFC em relação aos homozigotos selvagens e heterozigotos. A análise no domínio da frequência revelou que os indivíduos polimórficos apresentaram aumento da variabilidade de baixa frequência e diminuição da variabilidade de alta frequência, o que indica alta

atividade simpática e baixa atividade parassimpática. Estes resultados, porém, foram obtidos em repouso e em pacientes cardíacos graves.

As alterações decorrentes de polimorfismos da eNOS são mais evidentes em indivíduos homozigotos para o polimorfismo em comparação com heterozigotos [49], em indivíduos que são homozigotos para mais de um polimorfismo da eNOS [49], ou ainda, em indivíduos que possuem algum polimorfismo associado a fatores fenotípicos que provocam aumento do estresse oxidativo [50], e, portanto, maior degradação de NO. Assim, espera-se que repercussões funcionais de polimorfismos da eNOS expressem-se de maneira mais importante e evidente em determinados indivíduos, frente a situações fisiológicas nas quais há maior estresse de cisalhamento e, portanto, aumento da demanda de NO, ou em situações fisiopatológicas, nas quais há aumento da degradação de NO. No entanto, é importante ressaltar que as associações entre polimorfismos da eNOS com desfechos clínicos explicam apenas uma parte da etiologia complexa e multifatorial das doenças cardiovasculares.

As ações do NO sobre o SNA e a FC ainda não estão bem esclarecidas. Historicamente, tem sido observado que a administração clínica de substâncias doadoras de NO para promover vasodilatação em pacientes com angina promove, também, aumento da FC [51]. A causa mais provável seria uma resposta barorreflexa à vasodilatação, porém também se passou a especular que parte dessa resposta seja por ação direta do NO no SNA [52] e no coração [53-55]. Outros estudos demonstraram o NO agindo no sentido de minimizar os efeitos simpáticos e maximizar efeitos parassimpáticos sobre o coração [56]. Acredita-se que o NO participe da modulação da liberação de alguns neurotransmissores [57-59], sendo a ação do NO possivelmente regulada pela disponibilidade e sensibilidade dos alvos

moleculares [60], pela isoforma (neuronal ou endotelial) da enzima NOS envolvida [61, 62] e pela proximidade espacial com o alvo molecular [63].

A análise da FCrec é uma abordagem frequente e válida de avaliação da atividade autonômica [4, 64, 65], assim como o estudo da VFC pós-exercício [43, 66]. Por sua vez, ao comparar grupos segundo polimorfismos de eNOS, espera-se que existam diferenças quanto à biodisponibilidade de NO em níveis fisiológicos. Possivelmente, a diferença de biodisponibilidade de NO entre grupos selvagem e polimórfico destes polimorfismos não seja suficiente para modificar o padrão de resposta de FC na recuperação do exercício máximo, diante dos ajustes esperados da atividade simpática e parassimpática. Deve-se enfatizar, também, que não foram encontrados estudos associando todos estes fatores, isto é, exercício em humanos, reativação parassimpática e polimorfismos de NO.

CONCLUSÃO

Baseado nestes dados, não se pode afirmar que indivíduos portadores dos polimorfismos -786T>C e/ou 894G>T do gene da enzima eNOS apresentem menor reativação e modulação parassimpática após um TCPE, analisadas através da FCrec e da VFC no período de recuperação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Buch, A.N., J.H. Coote, and J.N. Townend, *Mortality, cardiac vagal control and physical training--what's the link?* Exp Physiol, 2002. **87**(4): p. 423-35.
2. Lombardi, F., *Chaos theory, heart rate variability, and arrhythmic mortality.* Circulation, 2000. **101**(1): p. 8-10.
3. Lillie, E.O. and D.T. O'Connor, *Early phenotypic changes in hypertension: a role for the autonomic nervous system and heredity.* Hypertension, 2006. **47**(3): p. 331-3.
4. Cole, C.R., et al., *Heart-rate recovery immediately after exercise as a predictor of mortality.* N Engl J Med, 1999. **341**(18): p. 1351-7.
5. Buchheit, M., P.B. Laursen, and S. Ahmadi, *Parasympathetic reactivation after repeated sprint exercise.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(1): p. H133-41.
6. *Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology.* Circulation, 1996. **93**(5): p. 1043-65.
7. La Rovere, M.T., et al., *Short-term heart rate variability strongly predicts sudden cardiac death in chronic heart failure patients.* Circulation, 2003. **107**(4): p. 565-70.
8. Tsuji, H., et al., *Impact of reduced heart rate variability on risk for cardiac events. The Framingham Heart Study.* Circulation, 1996. **94**(11): p. 2850-5.
9. Shin, K., et al., *Autonomic differences between athletes and nonathletes: spectral analysis approach.* Med Sci Sports Exerc, 1997. **29**(11): p. 1482-90.
10. Bowman, A.J., et al., *Baroreflex function in sedentary and endurance-trained elderly people.* Age Ageing, 1997. **26**(4): p. 289-94.
11. Iellamo, F., et al., *Effects of a residential exercise training on baroreflex sensitivity and heart rate variability in patients with coronary artery disease: A randomized, controlled study.* Circulation, 2000. **102**(21): p. 2588-92.
12. Laterza, M.C., et al., *Exercise training restores baroreflex sensitivity in never-treated hypertensive patients.* Hypertension, 2007. **49**(6): p. 1298-306.
13. Myers, J., et al., *Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing.* N Engl J Med, 2002. **346**(11): p. 793-801.
14. da Nobrega, A.C., *The subacute effects of exercise: concept, characteristics, and clinical implications.* Exerc Sport Sci Rev, 2005. **33**(2): p. 84-7.
15. Rankinen, T., et al., *The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes.* Med Sci Sports Exerc, 2001. **33**(6): p. 855-67.
16. Todd, J.A., *Interpretation of results from genetic studies of multifactorial diseases.* Lancet, 1999. **354** Suppl 1: p. S15-6.
17. Todd, J.A., *Statistical false positive or true disease pathway?* Nat Genet, 2006. **38**(7): p. 731-3.

18. Godecke, A., et al., *Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice*. *Circ Res*, 1998. **82**(2): p. 186-94.
19. Chavoshan, B., et al., *Nitric oxide-dependent modulation of sympathetic neural control of oxygenation in exercising human skeletal muscle*. *J Physiol*, 2002. **540**(Pt 1): p. 377-86.
20. Chowdhary, S., et al., *Nitric oxide and cardiac parasympathetic control in human heart failure*. *Clin Sci (Lond)*, 2002. **102**(4): p. 397-402.
21. Chowdhary, S., et al., *Nitric oxide and cardiac autonomic control in humans*. *Hypertension*, 2000. **36**(2): p. 264-9.
22. Keaney, J.F., Jr., et al., *Inhibition of nitric oxide synthase augments myocardial contractile responses to beta-adrenergic stimulation*. *Am J Physiol*, 1996. **271**(6 Pt 2): p. H2646-52.
23. Ma, R., I.H. Zucker, and W. Wang, *Reduced NO enhances the central gain of cardiac sympathetic afferent reflex in dogs with heart failure*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(1 Pt 2): p. H19-26.
24. Nakayama, M., et al., *T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm*. *Circulation*, 1999. **99**(22): p. 2864-70.
25. Gomez-Gallego, F., et al., *The -786 T/C polymorphism of the NOS3 gene is associated with elite performance in power sports*. *Eur J Appl Physiol*, 2009. **107**(5): p. 565-9.
26. Erbs, S., et al., *Both T-786C and G894T polymorphism of endothelial nitric oxide synthase affect in-vitro endothelium-dependent relaxation of internal mammary artery rings from patients with coronary artery disease*. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 2006. **13**(5): p. 826-31.
27. Casas, J.P., et al., *Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects*. *Circulation*, 2004. **109**(11): p. 1359-65.
28. Hingorani, A.D., *Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and hypertension*. *Curr Hypertens Rep*, 2003. **5**(1): p. 19-25.
29. Hassan, A., et al., *Endothelial nitric oxide gene haplotypes and risk of cerebral small-vessel disease*. *Stroke*, 2004. **35**(3): p. 654-9.
30. Joshi, M.S., et al., *Biochemical consequences of the NOS3 Glu298Asp variation in human endothelium: altered caveolar localization and impaired response to shear*. *FASEB J*, 2007. **21**(11): p. 2655-2663.
31. Binkley, P.F., et al., *A polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase promoter is associated with an increase in autonomic imbalance in patients with congestive heart failure*. *Am Heart J*, 2005. **149**(2): p. 342-8.
32. Veldman, B.A., et al., *The Glu298Asp polymorphism of the NOS 3 gene as a determinant of the baseline production of nitric oxide*. *J Hypertens*, 2002. **20**(10): p. 2023-7.
33. Saunders, C.J., et al., *Dipsogenic genes associated with weight changes during Ironman Triathlons*. *Hum Mol Genet*, 2006. **15**(20): p. 2980-7.

34. Saunders, C.J., et al., *The bradykinin beta 2 receptor (BDKRB2) and endothelial nitric oxide synthase 3 (NOS3) genes and endurance performance during Ironman Triathlons*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(6): p. 979-87.
35. Holla, L.I., et al., *Haplotype analysis of the endothelial nitric oxide synthase gene in asthma*. Hum Immunol, 2008. **69**(4-5): p. 306-13.
36. Vimalaswaran, K.S., et al., *Habitual energy expenditure modifies the association between NOS3 gene polymorphisms and blood pressure*. Am J Hypertens, 2008. **21**(3): p. 297-302.
37. Harris, K.F. and K.A. Matthews, *Interactions between autonomic nervous system activity and endothelial function: a model for the development of cardiovascular disease*. Psychosom Med, 2004. **66**(2): p. 153-64.
38. *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation*. World Health Organ Tech Rep Ser, 2000. **894**: p. i-xii, 1-253.
39. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2006. **29 Suppl 1**: p. S43-8.
40. *Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report*. Circulation, 2002. **106**(25): p. 3143-421.
41. Chobanian, A.V., et al., *The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report*. Jama, 2003. **289**(19): p. 2560-72.
42. Fletcher, G.F., et al., *Exercise standards for testing and training: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association*. Circulation, 2001. **104**(14): p. 1694-740.
43. Goldberger, J.J., et al., *Assessment of parasympathetic reactivation after exercise*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(6): p. H2446-52.
44. Salazar, L.A., et al., *Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing*. Clin Chem, 1998. **44**(8 Pt 1): p. 1748-50.
45. 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*. Thromb Res, 2007. **119**(5): p. 579-85.
46. McNamara, D.M., et al., *Effect of the Asp298 variant of endothelial nitric oxide synthase on survival for patients with congestive heart failure*. Circulation, 2003. **107**(12): p. 1598-602.
47. Sears, C.E., J.K. Choate, and D.J. Paterson, *Inhibition of nitric oxide synthase slows heart rate recovery from cholinergic activation*. J Appl Physiol, 1998. **84**(5): p. 1596-603.
48. Sears, C.E., J.K. Choate, and D.J. Paterson, *NO-cGMP pathway accentuates the decrease in heart rate caused by cardiac vagal nerve stimulation*. J Appl Physiol, 1999. **86**(2): p. 510-6.

49. Sandrim, V.C., et al., *Influence of eNOS haplotypes on the plasma nitric oxide products concentrations in hypertensive and type 2 diabetes mellitus patients.* Nitric Oxide, 2007. **16**(3): p. 348-55.
50. Leeson, C.P., et al., *Glu298Asp endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism interacts with environmental and dietary factors to influence endothelial function.* Circ Res, 2002. **90**(11): p. 1153-8.
51. Paton, J.F., S. Kasparov, and D.J. Paterson, *Nitric oxide and autonomic control of heart rate: a question of specificity.* Trends Neurosci, 2002. **25**(12): p. 626-31.
52. Tassorelli, C., et al., *The effects on the central nervous system of nitroglycerin-putative mechanisms and mediators.* Prog Neurobiol, 1999. **57**(6): p. 607-24.
53. Hogan, N., et al., *Effect of exogenous nitric oxide on baroreflex function in humans.* Am J Physiol, 1999. **277**(1 Pt 2): p. H221-7.
54. Hogan, N., B. Casadei, and D.J. Paterson, *Nitric oxide donors can increase heart rate independent of autonomic activation.* J Appl Physiol, 1999. **87**(1): p. 97-103.
55. Chowdhary, S., et al., *Chronotropic effects of nitric oxide in the denervated human heart.* J Physiol, 2002. **541**(Pt 2): p. 645-51.
56. Paterson, D., *Nitric oxide and the autonomic regulation of cardiac excitability. The G.L. Brown Prize Lecture.* Exp Physiol, 2001. **86**(1): p. 1-12.
57. Ohkuma, S. and M. Katsura, *Nitric oxide and peroxynitrite as factors to stimulate neurotransmitter release in the CNS.* Prog Neurobiol, 2001. **64**(1): p. 97-108.
58. Kiss, J.P. and E.S. Vizi, *Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission.* Trends Neurosci, 2001. **24**(4): p. 211-5.
59. Herring, N. and D.J. Paterson, *Nitric oxide-cGMP pathway facilitates acetylcholine release and bradycardia during vagal nerve stimulation in the guinea-pig in vitro.* J Physiol, 2001. **535**(Pt 2): p. 507-18.
60. Prast, H. and A. Philippu, *Nitric oxide as modulator of neuronal function.* Prog Neurobiol, 2001. **64**(1): p. 51-68.
61. Paton, J.F., et al., *Adenoviral vector demonstrates that angiotensin II-induced depression of the cardiac baroreflex is mediated by endothelial nitric oxide synthase in the nucleus tractus solitarii of the rat.* J Physiol, 2001. **531**(Pt 2): p. 445-58.
62. Klatt, P., et al., *Inhibitors of brain nitric oxide synthase. Binding kinetics, metabolism, and enzyme inactivation.* J Biol Chem, 1994. **269**(3): p. 1674-80.
63. Prevot, V., *Glial-neuronal-endothelial interactions are involved in the control of GnRH secretion.* J Neuroendocrinol, 2002. **14**(3): p. 247-55.
64. Buchheit, M. and C. Gindre, *Cardiac parasympathetic regulation: respective associations with cardiorespiratory fitness and training load.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(1): p. H451-8.

65. Pierpont, G.L., D.R. Stolpman, and C.C. Gornick, *Heart rate recovery post-exercise as an index of parasympathetic activity*. J Auton Nerv Syst, 2000. **80**(3): p. 169-74.
66. Buchheit, M., et al., *Monitoring endurance running performance using cardiac parasympathetic function*. Eur J Appl Physiol. **108**(6): p. 1153-67.