

Prevalência de dislipidemia em adultos de meia-idade com polimorfismo do gene *NOS3* e baixa aptidão cardiorrespiratória

Prevalence of dyslipidemia in middle-aged adults with NOS3 gene polymorphism and low cardiorespiratory fitness

Pamella A. Malagrino¹, Carlos H. G. Sponton¹, Rodrigo D. Esposti¹, Carla F. Franco-Penteado², Romulo A. Fernandes¹, Marcos André C. Bezerra², Dulcinéia M. Albuquerque², Cynara M. Rodovalho³, Maurício Bacci³, Angelina Zanesco¹

RESUMO

Objetivo: Analisar a influência da associação dos polimorfismos do gene da sintase do óxido nítrico endotelial (*NOS3*) para as posições -786T>C, Glu298Asp e íntron 4b/a e a aptidão cardiorrespiratória sobre as concentrações de nitrito/nitrato, pressão arterial, perfil lipídico e prevalência de doenças cardiometabólicas em adultos. **Sujeitos e métodos:** Noventa e duas pessoas foram divididas de acordo com o genótipo: não polimórficas (NP) e polimórficas (P). Posteriormente, foram subdivididas pela aptidão cardiorrespiratória associada ao genótipo: alta (ANP e AP) ou baixa (BNP e BP). **Resultados:** Os indivíduos que apresentavam polimorfismo para as posições Glu298Asp+Íntron 4b/a e Glu298Asp+-786T>C e baixa aptidão cardiorrespiratória apresentaram maiores valores de colesterol total e maior prevalência de dislipidemia. **Conclusão:** Nossos dados demonstram que os polimorfismos do gene da *NOS3* para essas duas associações influenciam os níveis de colesterol plasmático, e essa associação foi mais claramente observada quando os indivíduos apresentavam menor nível de aptidão cardiorrespiratória. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2013;57(1):33-43

Descritores

Polimorfismos; aptidão cardiorrespiratória; dislipidemia; adultos

ABSTRACT

Objective: To evaluate the influence of the interaction between endothelial nitric oxide synthase gene (*NOS3*) polymorphisms at positions -786T>C, Glu298Asp and intron 4b/a, and cardiorespiratory fitness on plasma nitrite/nitrate levels, blood pressure, lipid profile, and prevalence of cardiometabolic disorders. **Subjects and methods:** Ninety-two volunteers were genotyped for *NOS3* polymorphisms at positions (-786T>C and Glu298Asp) and (intron 4b/a) and divided according to the genotype: non-polymorphic (NP) and polymorphic (P). After that, they were subdivided according to the cardiorespiratory fitness associated with genotype: high (HNP and HP) and low (LNP and LP). **Results:** The subjects with polymorphism for the interactions at positions Glu298Asp + intron 4b/a, and Glu298Asp+-786T>C showed the highest values in total cholesterol, as well as dyslipidemia. **Conclusion:** Our findings show that *NOS3* gene polymorphisms at positions -786T>C, Glu298Asp, and intron 4b/a exert negative effects on the lipid profile compared with those who do not carry polymorphisms. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2013;57(1):33-43

Keywords

Polymorphism; cardiorespiratory fitness; dyslipidemia; adults

¹Laboratório de Fisiologia Cardiovascular e Atividade Física, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rio Claro, SP, Brasil
²Centro de Hematologia e Hemoterapia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (FCM-Unicamp), Campinas, SP, Brasil
³Laboratório de Evolução Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rio Claro, SP, Brasil

Departamento de Educação Física, Instituto de Biociências, Unesp, Rio Claro, SP

Correspondência para:
Angelina Zanesco
Departamento de Educação Física
Av, 24 A, 1515
13506-900 – Rio Claro, SP, Brasil
azanesco@rc.unesp.br

Recebido em 2/Mar/2012
Aceito em 14/Dez/2012

INTRODUÇÃO

O óxido nítrico (NO) formado a partir da conversão da L-arginina pela ação da enzima sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS) possui papel central no controle do sistema cardiovascular. Além disso, o NO desempenha importante função na prevenção das doenças cardiometabólicas (1,2). Assim, diminuição da produção do NO pelas células endoteliais e/ou sua menor biodisponibilidade para os tecidos, fenômeno caracterizado por disfunção endotelial, podem acarretar importantes alterações metabólicas bem como alterações no estado redox (aumento do estresse oxidativo), contribuindo para a gênese e o desenvolvimento de doenças como a dislipidemia e a aterosclerose (3). Os mecanismos pelos quais ocorre menor produção de NO e/ou sua biodisponibilidade têm sido associados a alterações de glicemia, perfil lipídico, dieta hipercalórica e sedentarismo, entre outros (4). Mais recentemente, alterações genéticas (polimorfismo) no gene da enzima eNOS (*NOS3*) foram associadas à disfunção endotelial, mostrando que a presença de polimorfismo no gene da eNOS poderia ser um fator desencadeador de doenças cardiometabólicas (5).

Entre os polimorfismos do gene da eNOS, os mais estudados e clinicamente relevantes são os polimorfismo caracterizados pela substituição de um único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphism* – SNP), SNPs da região promotora (-786T>C), o polimorfismo do éxon 7 (Glu298Asp) e o VNTR localizado no íntron 4 com 27 pb repetidos (íntron 4a/b) (6). De fato, estudos prévios demonstraram que os polimorfismos do gene da *NOS3* para as posições -786T>C, caracterizado pela substituição da Timina (T) para citosina (C) na região promotora do gene; 894G>T (Glu298Asp), caracterizado pela substituição do aminoácido glutamato (Glu) para aspartato (Asp) na enzima eNOS e íntron 4b/a, caracterizado por quatro repetições em tandem de 27pb, estão associados ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares como hipertensão arterial, doença isquêmica cardíaca e acidente vascular encefálico, bem como doenças endocrinometabólicas (7,8).

A prática regular de exercício físico aeróbio de moderada intensidade promove efeitos benéficos tanto na prevenção quanto no tratamento das doenças cardiometabólicas, e esses efeitos foram associados à maior produção de NO e/ou sua biodisponibilidade (4). Assim, sabe-se que o aumento do fluxo sanguíneo desencadeado pelo exercício físico é um poderoso estímulo

para a produção de NO pelas células endoteliais e/ou aumento de sua biodisponibilidade pela maior atividade de enzimas antioxidantes (9,10).

Estudos prévios avaliaram a relação entre a presença de polimorfismos do gene da *NOS3* e a prática de atividade física (11), o nível de aptidão cardiorrespiratória (12), bem como o efeito do treinamento físico (13-16). No entanto, apenas um trabalho avaliou a influência do polimorfismo do gene da eNOS sobre parâmetros metabólicos em indivíduos treinados (16). Além disso, até o presente momento nenhum estudo avaliou a interação entre os polimorfismos do gene da *NOS3* (-786T>C, Glu298Asp e íntron 4b/a) e o nível de aptidão cardiorrespiratória. Portanto, o objetivo do presente estudo foi verificar a influência da interação entre os polimorfismos do gene *NOS3* para as posições -786T>C, Glu298Asp e íntron 4b/a sobre os parâmetros cardiovasculares e endocrinometabólicos em adultos de meia-idade. Avaliamos também a influência dos genótipos sobre a prevalência de doenças cardiometabólicas e de que forma a aptidão cardiorrespiratória poderia influenciar os diferentes parâmetros bioquímicos, como perfil lipídico, glicemia e concentração plasmática de nitrito/nitrato.

SUJEITOS E MÉTODOS

Sujeitos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa com seres humanos do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (Unesp/Rio Claro; Protocolo 6603). Os critérios de inclusão foram: idade ≥ 40 anos, não fumante, função renal normal (creatinina $< 1,4$ mg/dL) e índice de massa corporal $< 34,9$ kg/m². Os critérios de exclusão foram: presença de doenças cardiovasculares (angina, doença valvular e AVE); consumo de álcool ≥ 3 drinks por dia; problemas ortopédicos ou qualquer outra condição médica que influenciasse o desenvolvimento do estudo.

Antropometria, pressão arterial, perfil lipídico e glicemia

A massa corporal e a estatura foram medidas, e o índice de massa corporal (IMC) foi calculado pela divisão da massa corporal pela altura ao quadrado. A circunferência abdominal foi medida com uma fita metálica no ponto médio entre a crista ilíaca e a última costela. A pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial dias-

tólica (PAD) foram mensuradas com esfigmomanômetro aneróide (Tycos, USA). Após quinze minutos de repouso na posição sentada, as mensurações foram realizadas.

Após jejum de 12 horas, as amostras de sangue foram obtidas da veia antecubital (6 ml). A lipoproteína de baixa densidade – LDL-C (Wiener, Rosário, Argentina), lipoproteína de alta densidade – HDL-C, colesterol total – CT, triglicérides – TG, creatinina e glicemia foram avaliados enzimaticamente por meio de *kits* comerciais (LaborLab, São Paulo, Brazil).

Concentrações plasmáticas de nitrito/nitrato

Amostras de plasma foram utilizadas para determinação da produção endógena de NO por meio da quantificação dos ânions nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), produtos terminais da oxidação do NO. As amostras foram ultrafiltradas por meio de microfiltros (*Microcon Centrifugal Filter Units, 10 kDa; Millipore, Bedford, MA, USA*). Após esse procedimento, as concentrações de nitrito/nitrato (NOX^-) foram determinadas pelo *kit* comercial (*Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA*) seguindo as instruções do fabricante. As absorbâncias foram determinadas em ELISA com comprimento de onda (λ) de 540-550 nm. O coeficiente de variação do método é de 3,4% entre as amostras, e entre as duplicatas é de 2,7%. A sensibilidade do método é de 2,5 μM .

Aptidão cardiorrespiratória

O consumo máximo de oxigênio ($\text{VO}_{2\text{max}}$) foi determinado por meio do teste de uma milha de Rockport (17), o qual foi utilizado para a estratificação da aptidão cardiorrespiratória da população estudada. O nível de aptidão cardiorrespiratória foi determinado. Os participantes foram assim divididos após o teste de uma milha: AP – Moderada/Alta aptidão cardiorrespiratória; BNP – Regular/Baixa aptidão cardiorrespiratória.

Análises genotípicas

O DNA genômico foi extraído dos leucócitos pelo método fenol-clorofórmio. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com 1 ciclo de 96°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos repetidos de desnaturação a 96°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, terminando com uma extensão a 72°C por 5 minutos para identificação dos polimorfismos da

região promotora -786T>C, do éxon 7 Glu298Asp e do íntron 4b/a. Todas as avaliações genéticas foram realizadas no Laboratório do Professor Dr. Fernando Costa, Hemocentro da Universidade Estadual de Campinas.

-786T>C

A região promotora -786T>C do gene da eNOS foi amplificada com a utilização de *primers sense*: 5' CACC-CAGGCCACCCCAACT 3'; e *antisense*: 5' GCCG-CAGGTCGACAGAGAGACT 3'. Após a amplificação, os fragmentos foram digeridos por 5 minutos a 37°C utilizando 2 uL da enzima de restrição FastDigest® MspI seguida pela eletroforese de 3 horas em gel (2,5%) de agarose. O alelo T gera um fragmento de 394 pb e o alelo C gera fragmentos de 352 e 42 pb.

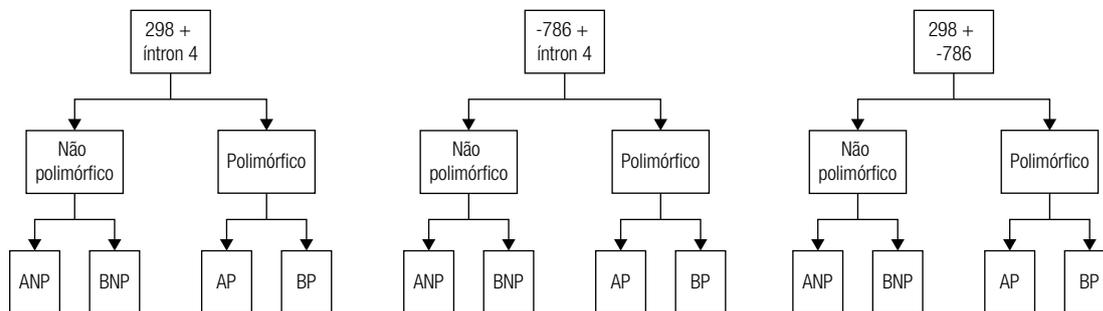
Glu298asp

A amplificação do éxon 7 do gene da eNOS Glu298Asp foi realizada por meio da utilização de *primers: sense*: 5' AAGGCAGGAGACAGTGGATGGA 3'; e *antisense*: 5' CCCAGTCAATCCCTTGGTGCTCA 3' (18). Após a amplificação, os fragmentos foram digeridos *overnight* a 37°C usando 2 uL da enzima de restrição *MboI* seguida pela eletroforese de 3 horas em gel (2,5%) de agarose. O alelo G gera um fragmento de 248 pb e o alelo T gera fragmentos de 190 e 58 pb.

Íntron 4 b/a

A amplificação dos fragmentos de 27pb em *tandem* do íntron 4b/a foi realizada por meio da utilização de *primers: sense*, 5' -FAM-AGGCCCTATGGTAGTGCCT-TG- 3'; e *antisense*, 5' -TCTCTTAGTGCTGTGG-TCACAG- 3' (18), modificado. A genotipagem foi realizada pelo sequenciador MegaBACE™ e os resultados foram analisados pelo *software* Fragment Profiler version 1.2. O alelo 4a gera um fragmento de 393pb e o alelo 4b, um fragmento de 420 pb. As análises genotípicas foram feitas de maneira duplo-cega. Os participantes foram então classificados como: polimórfico – presença de polimorfismos em um ou ambos os alelos para as posições -786T>C, Glu298Asp e íntron 4b/a agrupadas em pares; e não polimórfico – ausência de polimorfismos em ambos os alelos para as posições -786T>C, Glu298Asp e íntron 4b/a agrupadas em pares.

Após as avaliações cardiorrespiratória e genotípicas, os grupos foram subdivididos conforme o esquema a seguir:



ANP: moderada/alta aptidão cardiorrespiratória e ausência de polimorfismos em ambos os alelos para as posições -786T>C, Glu298Asp e íntron 4b/a agrupadas em pares; AP: moderada/alta aptidão cardiorrespiratória e presença de polimorfismos em um ou ambos os alelos para as posições -786T>C, Glu298Asp e íntron 4b/a agrupadas em pares; BNP: regular/baixa aptidão cardiorrespiratória e ausência de polimorfismos em ambos os alelos para as posições -786T>C, Glu298Asp e íntron 4b/a agrupadas em pares; BP: regular/baixa aptidão cardiorrespiratória e presença de polimorfismos em um ou ambos os alelos para as posições -786T>C, Glu298Asp e íntron 4b/a agrupadas em pares.

Análise estatística

A análise descritiva para as variáveis contínuas foi determinada por valores de tendência central e indicadores de dispersão. Para determinação da normalidade amostral, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os valores foram expressos como média ± erro-padrão da média (EPM), respectivamente. A distribuição dos genótipos para cada polimorfismo (equilíbrio de *Hardy-Weinberg*) e patologias como hipertensão arterial, diabetes e dislipidemia foram avaliadas utilizando o teste de Qui-quadrado (χ^2). O teste *t* de Student não pareado foi utilizado para comparar todas as variáveis entre os grupos não polimórficos e polimórficos. A análise de variância (ANOVA) *one way* seguida pelo *post-hoc* de Tukey foi utilizada para comparação entre os grupos ANP, AP, BNP e BP. $P < 0,05$ foi aceito como estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Características gerais dos participantes

Noventa e dois voluntários (sessenta e nove mulheres e vinte e três homens) com idade média de 55,2 anos participaram do estudo. Em relação aos parâmetros antropométricos, a população estudada foi classificada com sobrepeso, apresentando valores de circunferência abdominal dentro dos limites recomendados (19). Do mesmo modo, os valores de pressão arterial, da glicemia e o perfil lipídico apresentaram valores de acordo com os limites recomendados (19) em todos os voluntários. Do total dos 92 participantes, 32 participantes apresentavam hipertensão arterial, 74 apresentavam dislipidemia e 8 sujeitos, diabetes melito. A tabela 1 resume esses dados.

Tabela 1. Características gerais dos voluntários do estudo

| Parâmetros | (n = 92) |
|---------------------------------|-------------|
| Idade (anos) | 55,2 ± 0,9 |
| IMC (kg/m ²) | 25,9 ± 0,3 |
| CA (cm) | 88,6 ± 1,0 |
| PAS (mmHg) | 115,5 ± 1,5 |
| PAD (mmHg) | 74,9 ± 1,0 |
| VO ₂ max (ml/kg/min) | 28,6 ± 0,9 |
| Glicemia (mg/dL) | 94,0 ± 2,7 |
| CT (mg/dL) | 200,5 ± 4,5 |
| LDL-C (mg/dL) | 126,1 ± 4,4 |
| HDL-C (mg/dL) | 49,5 ± 1,6 |
| TG (mg/dL) | 131,7 ± 7,7 |
| NOX- (µmol/L) | 22,4 ± 1,5 |
| Creatinina (mg/dL) | 0,99 ± 0,02 |

IMC: índice de massa corporal; CA: circunferência abdominal; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; VO₂max: consumo máximo de oxigênio; CT: colesterol total; LDL-C: lipoproteína de baixa densidade; HDL-C: lipoproteína de alta densidade; TG: triglicerídeos; NOX-: concentração plasmática de nitrato/nitrato. Os dados estão expressos em média ± EPM.

Avaliação genotípica do gene da eNOS (NOS3)

A distribuição dos genótipos para os polimorfismos do gene da eNOS seguiu o equilíbrio de Hardy-Weinberg, apresentando frequência alélica de: -786 (T: 0,40 e C: 0,13), íntron 4 (b: 0,76 e a: 0,01) e 298 (G: 0,54 e T: 0,06). Não foram observadas diferenças significativas em relação à idade para as associações Glu298Asp + íntron 4b/a; -786T>C + íntron 4b/a; Glu298Asp + -786T>C (Tabela 2).

Quanto aos parâmetros antropométricos, também não foram observadas diferenças significativas entre os grupos não polimórficos e polimórficos para o IMC e circunferência abdominal para as associações Glu298Asp + íntron 4b/a, -786T>C + íntron 4b/a;

Tabela 2. Parâmetros antropométricos, bioquímicos e prevalência de doenças cardiometabólicas para as posições -786T>C, Glu298Asp e íntron 4b/a do gene da NOS3 em adultos

| Parâmetros | Glu298Asp e íntron 4b/a | | -786T<C e íntron 4b/a | | Glu298Asp e -786T<C | |
|---------------------------------|-------------------------|--------------|-----------------------|--------------|---------------------|--------------|
| | NP (n = 35) | P (n = 57) | NP (n = 58) | P (n = 34) | NP (n = 28) | P (n = 64) |
| Idade (anos) | 53,1 ± 1,5 | 56,5 ± 1,1 | 54,3 ± 1,7 | 55,7 ± 1,1 | 52,8 ± 1,8 | 56,3 ± 1,1 |
| IMC (kg/m ²) | 25,6 ± 0,6 | 26,1 ± 0,4 | 26,0 ± 0,6 | 25,9 ± 0,4 | 25,8 ± 0,6 | 26,0 ± 0,4 |
| CA (cm) | 86,6 ± 1,7 | 89,9 ± 1,2 | 88,0 ± 1,9 | 89,0 ± 1,1 | 87,0 ± 1,9 | 89,3 ± 1,1 |
| Glicemia (mg/dL) | 90,5 ± 3,8 | 96,2 ± 3,6 | 91,3 ± 4,2 | 95,7 ± 3,5 | 92,1 ± 4,6 | 94,9 ± 3,3 |
| TG (mg/dL) | 117,8 ± 7,6 | 140,3 ± 11,5 | 123,8 ± 7,2 | 136,4 ± 11,6 | 120,9 ± 7,5 | 136,5 ± 10,6 |
| HDL-C (mg/dL) | 53,1 ± 2,8 | 47,3 ± 1,8 | 52,7 ± 2,7 | 47,6 ± 1,9 | 53,1 ± 3,1 | 47,9 ± 1,8 |
| VO ₂ max (ml/kg/min) | 31,2 ± 1,7 | 27,0 ± 0,9 | 31,2 ± 1,7 | 27,0 ± 0,9 | 31,0 ± 1,7 | 27,6 ± 1,0 |
| Patologias (%) | | | | | | |
| Hipertensão arterial | 22,9 | 40,4 | 32,4 | 34,5 | 32,1 | 34,4 |
| Diabetes | 11,4 | 8,8 | 11,8 | 8,6 | 10,7 | 9,4 |
| Dislipidemia | 68,6 | 87,7* | 76,5 | 82,8 | 71,4 | 84,4 |

Os dados estão expressos em média ± EPM. Todos os dados foram analisados pelo teste *t* de Student não pareado; *: *p* < 0,05.

Glu298Asp + -786T>C. Do mesmo modo, em relação aos parâmetros bioquímicos, não foram observadas diferenças significativas para os triglicerídeos, HDL-colesterol e glicemia para as associações Glu298Asp + íntron 4b/a, -786T>C + íntron 4b/a e Glu298Asp + -786T>C. A aptidão cardiorrespiratória, valores de VO₂max, não foi diferente entre os grupos avaliados segundo o genótipo. Os dados estão sumarizados na tabela 2.

Quanto à prevalência de doenças cardiometabólicas, não foram observadas associações significativas entre hipertensão arterial/diabetes melito tipo II e a presença de polimorfismos para as associações -786T>C + íntron 4b/a e Glu298Asp + -786T>C. No entanto, uma associação significativa foi observada entre a prevalência de dislipidemia nos participantes com polimorfismo para o gene da eNOS para a associação Glu298Asp + íntron 4b/a (87,7%) em comparação àqueles sem polimorfismo para essa associação (68,6%) (Tabela 2).

Os valores de pressão arterial sistólica e diastólica também não diferiram entre os genótipos analisados para o gene da eNOS (Figura 1). Por outro lado, os valores de colesterol total (Δ : 12,4%; Δ : 13,5%) e LDL-colesterol (Δ : 17,2%; Δ : 17,9%) foram significativamente maiores nos participantes com polimorfismo para o gene da eNOS para as associações Glu298Asp + íntron 4b/a e Glu298Asp + -786T>C. Nenhuma diferença foi encontrada na associação -786T>C + íntron 4b/a para esses parâmetros bioquímicos (Figura 2).

Em relação às concentrações plasmáticas de nitrito/nitrato (NOX⁻), não foram observadas diferenças signi-

ficativas entre os grupos não polimórficos e polimórficos independentemente das associações analisadas (Figura 2).

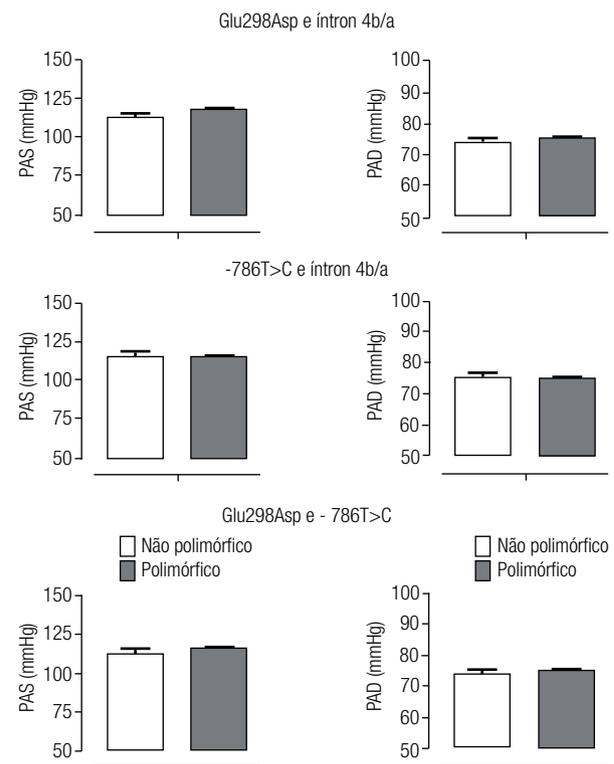


Figura 1. Valores de pressão arterial sistólica e diastólica de voluntários adultos de meia-idade subdivididos pelos polimorfismos do gene NOS3 para as posições -786T>C, Glu298Asp e íntron 4b/a. Os dados estão expressos em média ± EPM.

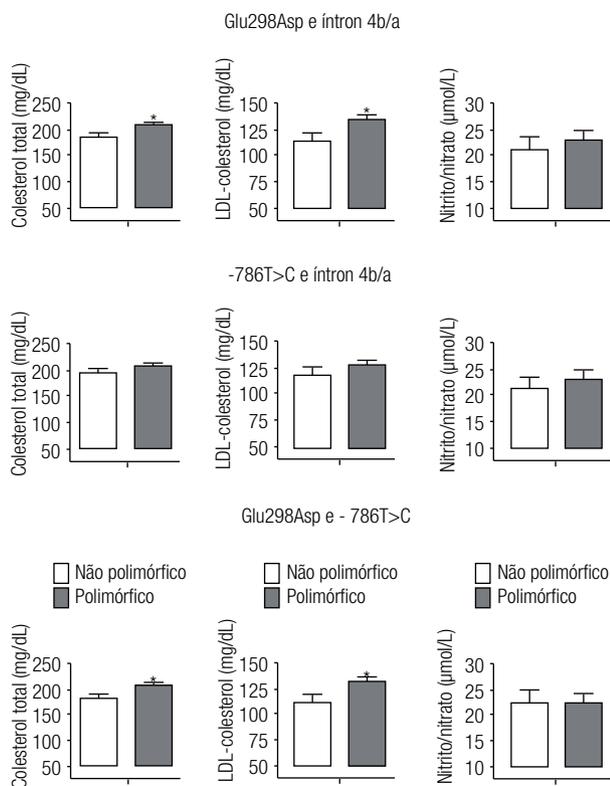


Figura 2. Níveis de colesterol total, LDL-colesterol e de nitrito/nitrato em voluntários adultos de meia-idade subdivididos pelos polimorfismos do gene *NOS3* para as posições -786T>C, Glu298Asp e intron 4b/a. Os dados estão expressos em média ± EPM; * p < 0,05.

Associação entre genótipo Glu298Asp + intron 4b/a e aptidão cardiorrespiratória

A tabela 3 mostra a associação entre o genótipo Glu298Asp + intron 4b/a e a aptidão cardiorrespiratória sobre os parâmetros antropométricos (IMC e CA), bio-

químicos (glicemia, triglicerídeos e HDL-colesterol) e prevalência de doenças cardiometabólicas. Foram observadas diferenças significativas em relação à idade entre os grupos com moderada/alta (ANP) e baixa/regular (BP) aptidão cardiorrespiratória para o grupo polimórfico da associação Glu298Asp + intron 4b/a. Em relação aos parâmetros antropométricos, os participantes com baixa aptidão cardiorrespiratória apresentaram maiores valores de IMC e CA quando comparados àqueles com maior aptidão cardiorrespiratória independente da presença de polimorfismo para o gene da eNOS para as associações Glu298Asp + intron 4b/a (Tabela 3). Os valores de glicemia, triglicerídeos e HDL-colesterol não apresentaram qualquer diferença entre os grupos (Tabela 3).

Quanto à prevalência de patologias, observaram-se valores de associação significativa apenas para os participantes com baixa aptidão cardiorrespiratória e com polimorfismo para as posições Glu298Asp + intron 4 b/a (grupo BP) em relação à hipertensão arterial (43,8%) e dislipidemia (93,8%) quando comparados aos demais grupos. Os dados estão sumarizados na tabela 3.

Com relação à terapia farmacológica, não observamos diferença entre o uso de anti-hipertensivos entre os grupos para a associação Glu298Asp + intron 4 b/a (ANP: 22,5; AP: 32; BNP: 36,4; BP: 31,3%). Todavia, os participantes com baixa aptidão cardiorrespiratória e presença de polimorfismo para o gene da eNOS para a associação Glu298Asp + intron 4 b/a (grupo BP) apresentaram maior porcentagem de uso de medicamentos hipolipemiantes (21,9%) quando comparados aos demais grupos (ANP: 4,2; AP: 8; BNP: 0%).

Tabela 3. Associação entre aptidão cardiorrespiratória e a interação das posições Glu298Asp e intron 4b/a do gene da *NOS3* sobre os parâmetros antropométricos, bioquímicos e prevalência de doenças cardiometabólicas em adultos

| | Glu298Asp e intron 4b/a | | | |
|--------------------------|-------------------------|--------------|--------------------------|-------------------------|
| | ANP (n = 24) | AP (n = 25) | BNP (n = 11) | BP (n = 32) |
| Idade (anos) | 51,1 ± 1,6 | 55,0 ± 1,3 | 57,3 ± 2,9 | 57,7 ± 1,7 ^a |
| IMC (kg/m ²) | 23,9 ± 0,5 | 25,2 ± 0,7 | 29,3 ± 0,6 ^{ab} | 26,8 ± 0,5 ^a |
| CA (cm) | 83,5 ± 1,9 | 88,3 ± 1,9 | 93,9 ± 2,0 ^a | 91,0 ± 1,4 ^a |
| Glicemia (mg/dL) | 90,8 ± 4,3 | 98,2 ± 5,8 | 90,0 ± 8,3 | 94,7 ± 4,7 |
| TG (mg/dL) | 114,0 ± 9,5 | 129,7 ± 16,5 | 126,2 ± 12,8 | 148,6 ± 16,0 |
| HDL-C (mg/dL) | 53,5 ± 3,3 | 47,1 ± 2,8 | 52,1 ± 5,3 | 47,4 ± 2,5 |
| Patologias (%) | | | | |
| Hipertensão arterial | 16,7 | 36 | 36,4 | 43,8* |
| Diabetes | 8,3 | 8,0 | 18,2 | 9,4 |
| Dislipidemia | 70,8 | 80 | 63,6 | 93,8* |

ANP: moderada/alta aptidão cardiorrespiratória e ausência de polimorfismos; AP: moderada/alta aptidão cardiorrespiratória e presença de polimorfismos; BNP: regular/baixa aptidão cardiorrespiratória e ausência de polimorfismos; BP: regular/baixa aptidão cardiorrespiratória e presença de polimorfismos para as posições do gene da eNOS analisadas. Os dados estão expressos em média ± EPM; ANOVA *one way* seguida pelo *post-hoc* de Tukey; o teste de χ^2 foi utilizado para a associação entre as patologias e os medicamentos e os grupos ANP, AP, BNP e BP; *, p < 0,05; a: p < 0,05 em relação ao grupo ANP; b = p < 0,05 em relação ao grupo AP.

Copyright © ABE5M todos os direitos reservados.

Associação entre genótipo -786T>C + íntron 4b/a e aptidão cardiorrespiratória

A tabela 4 mostra a associação entre a presença ou não de polimorfismo para o gene da eNOS nas posições -786T>C + íntron 4b/a e a aptidão cardiorrespiratória sobre os parâmetros antropométricos, bioquímicos e prevalência de doenças cardiometabólicas.

Podemos observar que os participantes com baixa aptidão cardiorrespiratória (grupo BNP e BP) apresentam maiores valores de IMC e CA quando comparados aos grupos com melhor aptidão cardiorrespiratória (grupos ANP e AP), independente da presença de polimorfismo para as posições -786T>C + íntron 4b/a do gene da eNOS (Tabela 4).

Quando avaliada a prevalência de patologias cardiometabólicas, observamos que, para as posições -786T>C + íntron 4b/a do gene da NOS3, a prevalência de hipertensão arterial, diabetes melito tipo II e dislipidemia não difere entre os grupos analisados (Tabela 4). No entanto, os participantes com baixa aptidão cardiorrespiratória e presença de polimorfismo (BP) apresentam maior porcentagem de uso de medicamentos hipolipemiantes (25%, $P < 0,05$) em relação aos demais grupos (ANP: 5,3; AP: 6,7; BNP: 0%). Não houve diferença entre os grupos para os valores de glicemia, triglicerídeos, HDL-colesterol e uso de medicação anti-hipertensiva.

Associação entre genótipo Glu298Asp + -786T>C e aptidão cardiorrespiratória

A tabela 5 mostra a associação entre a presença ou não de polimorfismo para o gene da NOS3 nas posições Glu298Asp + -786T>C e a aptidão cardiorrespiratória

sobre os parâmetros antropométricos, bioquímicos e prevalência de doenças cardiometabólicas. Podemos observar que, de modo similar às avaliações feitas anteriormente, os participantes com baixa aptidão cardiorrespiratória (grupos BNP e BP) apresentam valores de IMC e circunferência abdominal (CA) maiores quando comparados àqueles com moderada/alta aptidão cardiorrespiratória (grupos ANP e AP), independente da presença de polimorfismo ou não. Nesta associação em particular, nenhuma diferença foi encontrada para os valores de glicemia, triglicerídeos, HDL-colesterol e prevalência de doenças cardiometabólicas entre os grupos estudados (Tabela 5). O uso de medicamentos anti-hipertensivos (ANP: 22,5; AP: 22,6; BNP: 40; BP: 30,3%) e hipolipemiantes (ANP: 5,6; AP: 6,5; BNP: 10; BP: 18%) também não foi diferente entre os grupos estudados.

A figura 3 ilustra a influência do polimorfismo do gene NOS3 associado à aptidão cardiorrespiratória sobre os valores de pressão arterial sistólica e diastólica nas três associações analisadas. Podemos observar que os participantes que possuíam baixa aptidão cardiorrespiratória apresentavam maiores valores de pressão arterial sistólica e diastólica independente do genótipo. Por outro lado, as concentrações plasmáticas de colesterol total foram maiores nos participantes que possuíam polimorfismo para o gene da NOS3 nas associações Glu298Asp + íntron4b/a e Glu298Asp + -786T>C e baixa aptidão cardiorrespiratória (BP, $\Delta\%$ = 15,1 e 17,3, respectivamente) quando comparados aos outros grupos. Os níveis de LDL-colesterol e nitrito/nitrato não foram diferentes entre os grupos analisados (Figura 4).

Tabela 4. Associação entre a aptidão cardiorrespiratória e a interação das posições -786T>C e íntron 4b/a do gene da NOS3 sobre os parâmetros antropométricos, bioquímicos e prevalência de doenças cardiometabólicas em adultos

| | -786T>C e íntron 4b/a | | | |
|--------------------------|-----------------------|--------------|--------------------------|-------------------------|
| | ANP (n = 19) | AP (n = 30) | BNP (n = 15) | BP (n = 28) |
| Idade (anos) | 52,2 ± 2,1 | 53,6 ± 1,1 | 56,9 ± 2,7 | 57,9 ± 1,8 |
| IMC (kg/m ²) | 23,8 ± 0,6 | 25,0 ± 0,6 | 28,7 ± 0,5 ^{ab} | 26,8 ± 0,6 ^a |
| CA (cm) | 83,2 ± 2,3 | 87,7 ± 1,6 | 94,4 ± 2,0 ^a | 90,3 ± 1,4 ^a |
| Glicemia (mg/dL) | 90,8 ± 5,0 | 96,9 ± 5,0 | 91,8 ± 7,2 | 94,4 ± 4,9 |
| TG (mg/dL) | 118,9 ± 10,6 | 123,9 ± 14,3 | 130,0 ± 9,3 | 149,7 ± 18,3 |
| HDL-C (mg/dL) | 54,2 ± 3,7 | 47,7 ± 2,7 | 50,8 ± 3,9 | 47,4 ± 2,8 |
| Patologias (%) | | | | |
| Hipertensão arterial | 21,1 | 30 | 46,7 | 39,3 |
| Diabetes | 5,3 | 10 | 20 | 7,1 |
| Dislipidemia | 73,7 | 76,7 | 80 | 89,3 |

ANP: moderada/alta aptidão cardiorrespiratória e ausência de polimorfismos para as posições do gene da eNOS analisadas; AP: moderada/alta aptidão cardiorrespiratória e presença de polimorfismos para as posições do gene da eNOS analisadas; BNP: regular/baixa aptidão cardiorrespiratória e ausência de polimorfismos para as posições do gene da NOS3 analisadas; BP: regular/baixa aptidão cardiorrespiratória e presença de polimorfismos para as posições do gene da eNOS analisadas. Os dados estão expressos em média ± EPM; ANOVA *one way* seguida pelo *post hoc* de Tukey; o teste de χ^2 foi utilizado para a associação entre as patologias e medicamentos e os grupos ANP, AP, BNP e BP; *: $p < 0,05$; a: $p < 0,05$ em relação ao grupo ANP; b: $p < 0,05$ em relação ao grupo AP.

Tabela 5. Associação entre a aptidão cardiorrespiratória e a interação das posições - Glu298Asp +-786T>C do gene da NOS3 sobre os parâmetros antropométricos, bioquímicos e prevalência de doenças cardiometabólicas em adultos

| | Glu298Asp e -786T>C | | | |
|--------------------------|---------------------|--------------|--------------------------|--------------------------|
| | ANP (n = 31) | AP (n = 18) | BNP (n = 10) | BP (n = 33) |
| Idade (anos) | 52,6 ± 1,4 | 53,9 ± 1,5 | 56,3 ± 3,1 | 57,9 ± 1,7 |
| IMC (kg/m ²) | 24,1 ± 0,6 | 24,8 ± 0,6 | 28,8 ± 0,5 ^{ab} | 27,0 ± 0,5 ^{ab} |
| CA (cm) | 83,3 ± 2,3 | 87,5 ± 1,7 | 94,2 ± 2,1 ^a | 91,0 ± 1,4 ^a |
| Glicemia (mg/dL) | 92,5 ± 5,3 | 95,8 ± 4,9 | 91,4 ± 9,0 | 94,1 ± 4,6 |
| TG (mg/dL) | 117,2 ± 10,2 | 124,7 ± 14,1 | 127,4 ± 11,0 | 147,6 ± 15,7 |
| HDL-C (mg/dL) | 54,9 ± 3,8 | 47,6 ± 2,6 | 50,0 ± 5,7 | 48,2 ± 2,5 |
| Patologias (%) | | | | |
| Hipertensão arterial | 27,8 | 25,8 | 40 | 43,8 |
| Diabetes | 5,6 | 9,7 | 20 | 9,1 |
| Dislipidemia | 72,2 | 77,4 | 70 | 90,9 |

ANP: moderada/alta aptidão cardiorrespiratória e ausência de polimorfismos para as posições do gene da eNOS analisadas; AP: moderada/alta aptidão cardiorrespiratória e presença de polimorfismos para as posições do gene da eNOS analisadas; BNP: regular/baixa aptidão cardiorrespiratória e ausência de polimorfismos para as posições do gene da eNOS analisadas; BP: regular/baixa aptidão cardiorrespiratória e presença de polimorfismos para as posições do gene da eNOS analisadas. Os dados estão expressos em média ± EPM; a análise de variância ANOVA *one way* seguida pelo *post hoc* de Tukey; o teste de χ^2 foi utilizado para a associação entre as patologias e medicamentos e os grupos ANP, AP, BNP e BP; a: $p < 0,05$ em relação ao grupo ANP; b: $p < 0,05$ em relação ao grupo AP.

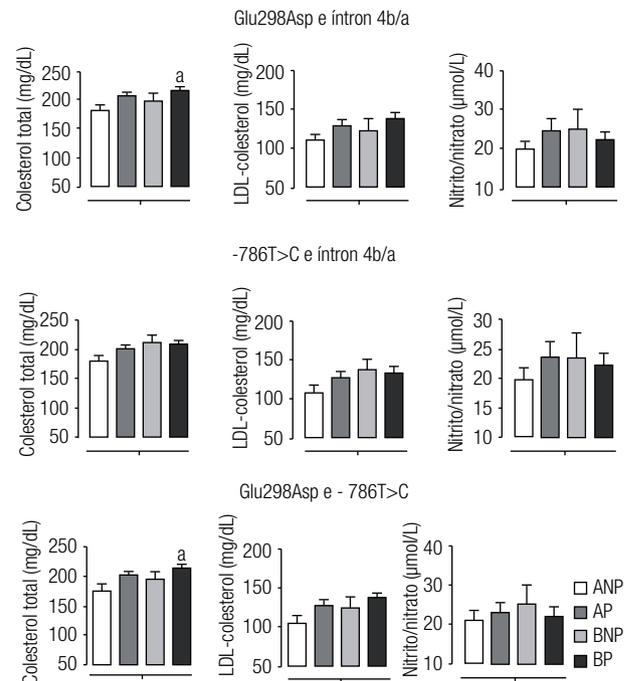
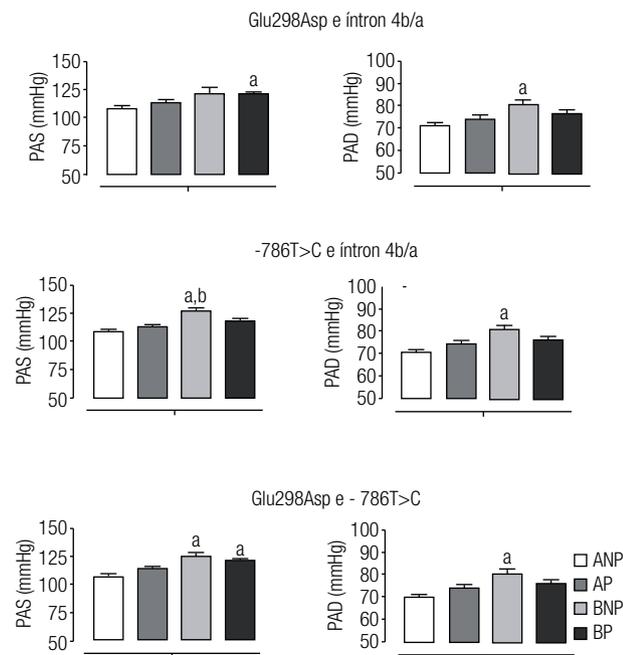


Figura 3. Valores de pressão arterial sistólica e diastólica de voluntários adultos de meia-idade divididos pelos polimorfismos do gene da eNOS para as posições -786T>C, Glu298Asp e intron 4b/a, e subdivididos conforme avaliação da aptidão cardiorrespiratória (ANP: moderada/alta aptidão + ausência de polimorfismos para as posições -786T>C, Glu298Asp e intron 4b/a; AP: moderada/alta aptidão + presença de polimorfismos para as posições -786T>C, Glu298Asp e intron 4b/a; BNP: regular/baixa aptidão + ausência de polimorfismos para as posições -786T>C, Glu298Asp e intron 4b/a; BP: regular/baixa aptidão + presença de polimorfismos para as posições -786T>C, Glu298Asp e intron 4b/a). Os dados estão expressos em média ± EPM; a: $p < 0,05$ em relação ao grupo ANP; b: $p < 0,05$ em relação ao grupo AP.

Figura 4. Níveis de colesterol total, LDL-colesterol e de nitrito/nitrato em voluntários adultos de meia-idade divididos pelos polimorfismos do gene NOS3 para as posições -786T>C, Glu298Asp e intron 4b/a, e subdivididos conforme avaliação da aptidão cardiorrespiratória (ANP: moderada/alta aptidão + ausência de polimorfismos para as posições -786T>C, Glu298Asp e intron 4b/a; AP: moderada/alta aptidão + presença de polimorfismos para as posições -786T>C, Glu298Asp e intron 4b/a; BNP: regular/baixa aptidão + ausência de polimorfismos para as posições -786T>C, Glu298Asp e intron 4b/a; BP: regular/baixa aptidão + presença de polimorfismos para as posições -786T>C, Glu298Asp e intron 4b/a). Os dados estão expressos em média ± EPM; a: $p < 0,05$ em relação ao grupo ANP.

Copyright © ABESEM todos os direitos reservados.

DISCUSSÃO

Entre as isoformas constitutivas da enzima NO sintase (nNOS e eNOS), a eNOS (*NOS3*) é considerada a mais importante devido ao seu papel no controle da pressão arterial e seus efeitos antitrombóticos, por meio da sua ação enzimática sobre a L-arginina levando à formação do NO. Assim, a redução em sua expressão e/ou em sua atividade pode resultar em disfunção endotelial. Diversos fatores podem afetar a expressão e/ou a atividade de *NOS3*, entre eles, deficiência de cofatores para sua atividade enzimática, bem como a presença de polimorfismos no gene *NOS3* (5). De fato, trabalhos prévios demonstraram que a presença de polimorfismo nas posições -786T>C, Glu298Asp e íntron 4 b/a está associada à redução na expressão e atividade da enzima *NOS3* (20,21), menor produção de nitrito/nitrato (que reflete indiretamente a produção de NO), bem como menor resposta relaxante dependente do endotélio (22). No entanto, a maioria desses trabalhos avaliou essas três posições, que são consideradas clinicamente relevantes, de maneira isolada, ou seja, a presença ou não do polimorfismo do gene da *NOS3* em cada posição e sua influência nos diferentes parâmetros cardiovasculares e endocrinometabólicos. Assim, o presente trabalho buscou avaliar a interação entre a presença do polimorfismo do gene da *NOS3* com parâmetros antropométricos, cardiovasculares e bioquímicos. Nossos dados demonstram que a presença dos polimorfismos do gene da *NOS3* analisados para as posições -786T>C, Glu298Asp e íntron b/a não influencia os parâmetros antropométricos. Como esperado, os menores valores de IMC e circunferência abdominal foram encontrados nos participantes com maior aptidão cardiorrespiratória, independentemente da presença ou ausência desses polimorfismos.

Diferentemente de trabalhos prévios que observaram menores concentrações plasmáticas de nitrito/nitrato em pacientes com polimorfismo para o gene da eNOS (23,24), no presente estudo não foram observadas diferenças em relação às concentrações de nitrito/nitrato independente das associações entre os polimorfismos ou nível de aptidão cardiorrespiratória. De fato, estudo anterior realizado em nosso laboratório demonstrou que as concentrações basais de nitrito/nitrato não diferem entre indivíduos com polimorfismo e sem polimorfismo para a posição -786T>C do gene da eNOS em mulheres na pós-menopausa (15). Entretanto, quando essas mulheres foram submetidas a 24 semanas de treinamento físico aeróbio, observamos

maiores incrementos nas concentrações de nitrito/nitrato e maior redução de pressão arterial para o grupo não polimórfico em comparação aos indivíduos com polimorfismo (15). Assim, confirmando resultados prévios de nosso laboratório, no qual se analisou apenas uma posição para o polimorfismo do gene da *NOS3*, o presente trabalho mostra que, em condições basais, a presença de polimorfismo para o gene da *NOS3*, combinado dois a dois, não interfere com as concentrações plasmáticas basais de nitrito/nitrato, que indiretamente refletem a produção de NO, em adultos de meia-idade. De maneira similar, observamos que os valores de pressão arterial não foram associados à presença de polimorfismo para as posições estudadas e suas interações. No entanto, participantes com baixa aptidão cardiorrespiratória apresentaram maiores valores de pressão arterial quando comparados àqueles com maior aptidão cardiorrespiratória, independente do genótipo, reforçando a importância da prática de atividade física para a manutenção da saúde cardiovascular. De fato, estudos prévios demonstraram, de maneira sistemática, que a aptidão cardiorrespiratória é inversamente relacionada com a pressão arterial e perfil lipídico (25), sendo esse um importante e independente preditor de risco cardiovascular (26). Além disso, um estudo mostrou que um decréscimo de 5% no VO_2 max resulta em 56% de incremento no risco cardiovascular (27). Por outro lado, cada 1 ml/kg/min de incremento no VO_2 max resulta em uma diminuição de aproximadamente 15% no risco de morte por todas as causas (28). Portanto, nossos dados reforçam os efeitos benéficos da prática de atividade física sobre o sistema cardiovascular em indivíduos adultos de meia-idade.

Com relação ao perfil lipídico e glicemia, nosso estudo mostrou que os níveis de colesterol total e LDL-colesterol foram significativamente superiores para os grupos polimórficos em comparação àqueles que não apresentavam polimorfismo para as associações Glu298Asp + íntron 4b/a e Glu298Asp + 786T>C (maiores detalhes, veja Figura 2). Quando associamos os genótipos e o nível de aptidão cardiorrespiratória, nossos dados mostram mais claramente que indivíduos que apresentavam polimorfismo para o gene da *NOS3* para as posições Glu298Asp + íntron 4b/a e Glu298Asp + 786T>C e tinham baixos níveis de aptidão cardiorrespiratória apresentam maiores valores de colesterol total, bem como maior prevalência de dislipidemias, cerca de 93,8% (veja maiores detalhes na Figura 4 e Tabela 3). De fato, trabalhos prévios mostraram

associação entre os polimorfismos do gene da eNOS para as posições -786T>C, Glu298Asp e íntron 4b/a e a prevalência de dislipidemia (29,30). Além disso, um estudo mostrou aumento nas concentrações plasmáticas de LDL-colesterol, LDL-colesterol modificado por malondialdeído (MDA-LDL-C) e níveis de insulina em jejum em indivíduos polimórficos para a posição Glu298Asp do gene da NOS3. Esses autores verificaram também redução das concentrações de HDL-C, apolipoproteína I, e consequente redução na vasodilatação dependente de endotélio (31). Assim, parece-nos que o elo comum entre dislipidemia e polimorfismo no gene da NOS3 esteja na posição Glu298Asp, onde o glutamato é substituído pelo aspartato na enzima eNOS, modificando sua atividade enzimática e/ou menor ativação por estímulos físicos, como o *shear stress*. De fato, um estudo observou que a presença do polimorfismo localizado no éxon 7 (Glu298Asp) resultava em alterada localização da enzima eNOS no espaço caveolar, acarretando menor resposta ao *shear stress* (32). Além disso, esses autores observaram que essa variação polimórfica está relacionada a uma reduzida dissociação da enzima eNOS (35%) do complexo eNOS/Caveolina-1, levando essa condição a uma redução da atividade enzimática e formação de nitro/nitrato. Estudo recente realizado no nosso laboratório demonstrou menor magnitude de redução do colesterol total e LDL-colesterol em resposta a oito semanas de treinamento físico aeróbico em mulheres com polimorfismo para as posições -786T>C e Glu298Asp do gene da eNOS em comparação àquelas que não apresentavam polimorfismo para essas posições, que foram estudadas de maneira isolada (16). Os possíveis mecanismos pelos quais a presença de polimorfismo para o gene da NOS3 estaria relacionada à maior prevalência de dislipidemia poderiam ser devido ao papel do NO sobre o metabolismo do colesterol. Evidências mostram que o NO possui efeitos hipocolesterolêmicos em modelos animais, nos quais se observou que a administração de doadores de NO promove significativa redução dos níveis plasmáticos de LDL-colesterol em coelhos (2). No entanto, em nosso estudo os níveis plasmáticos de nitrito/nitrato não apresentaram diferença estatística entre os grupos estudados. Diferentemente, estudos em nosso laboratório mostram que os níveis teciduais de nitrito/nitrato estão aumentados em músculo esquelético de ratos treinados, sem qualquer alteração desses metabólitos no plasma (33). Além disso, sabe-se que o músculo esquelético é um dos tecidos que mais utili-

za a gordura como substrato energético, por meio da oxidação de ácidos graxos (34). Assim, nossos dados mostram claramente que a presença de polimorfismo para o gene da NOS3 (interação Glu298Asp + íntron 4b/a e Glu298Asp + 786T>C) associado à menor aptidão cardiorrespiratória determina maior prevalência de dislipidemia em adulto de meia-idade.

Em conclusão, nossos dados demonstram que os polimorfismos do gene da NOS3 para as posições -786T>C, Glu298Asp e íntron 4b/a influenciam os níveis de colesterol plasmático quando comparados aos seus congêneres não polimórficos, e essa associação foi mais claramente observada quando os indivíduos apresentavam menor nível de aptidão cardiorrespiratória. Considerando a importância das doenças cardiometabólicas (dislipidemia/aterosclerose) para o sistema de saúde, nossos resultados poderiam ser utilizados para criar estratégias para a prevenção dessas patologias, bem como para evitar as complicações advindas destas, como a doença arterial coronariana e acidente vascular encefálico, entre outras.

A principal limitação do presente estudo foi o reduzido número de voluntários constituindo cada grupo analisado. Por outro lado, seria interessante que os diferentes grupos de pesquisa existentes no país buscassem estratégias para formar bancos de dados com o objetivo de estudar grandes grupos populacionais e assim obter resultados com maior poder estatístico das análises genéticas da população brasileira, que possui características singulares no que se refere à etnia.

Agradecimentos: os autores são gratos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo apoio financeiro.

Declaração: os autores declaram não haver conflitos de interesse científico neste estudo.

REFERÊNCIAS

1. Moncada S, Higgs EA. Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol*. 2006;176:213-54.
2. Jobgen WS, Fried SK, Fu WJ, Meininger CJ, Wu G. Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *J Nutr Biochem*. 2006;17(9):571-88.
3. Balligand JL, Feron O, Dessy C. eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiol Rev*. 2009;89(2):481-534.
4. Zanesco A, Antunes E. Effects of exercise training on the cardiovascular system: pharmacological approaches. *Pharmacol Ther*. 2007;114(3):307-17.
5. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829-37, 837a-837d.

6. Casas JP, Cavalleri GL, Bautista LE, Smeeth L, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2006;164(10):921-35.
7. Sandrim VC, Yugar-Toledo JC, Desta Z, Flockhart DA, Moreno H Jr, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase haplotypes are related to blood pressure elevation, but not to resistance to antihypertensive drug therapy. *J Hypertens*. 2006;24(12):2393-7.
8. Sandrim VC, de Syllos RW, Lisboa HR, Tres GS, Tanus-Santos JE. Influence of eNOS haplotypes on the plasma nitric oxide products concentrations in hypertensive and type 2 diabetes mellitus patients. *Nitric Oxide*. 2007;16(3):348-55.
9. Zarus PR, Pires CE, Bacci M Jr, Moraes C, Zanesco A. Effect of 6-months of physical exercise on the nitrate/nitrite levels in hypertensive postmenopausal women. *BMC Womens Health*. 2009;19:9-17.
10. Claudino MA, Delbin MA, Franco-Penteado CF, Priviero FB, De Nucci G, Antunes E, et al. Exercise training ameliorates the impairment of endothelial and nitric corpus cavernosum responses in diabetic rats. *Life Sci*. 2011;31(88):272-7.
11. Kimura T, Yokoyama T, Matsumura Y, Yoshiike N, Date C, Muramatsu M, et al. NOS3 genotype-dependent correlation between blood pressure and physical activity. *Hypertension*. 2003;41(2):355-60.
12. Sarzynski MA, Rankinen T, Sternfeld B, Fornage M, Sidney S, Bouchard C. SNP-by-fitness and SNP-by-BMI interactions from seven candidate genes and incident hypertension after 20 years of follow-up: the CARDIA Fitness Study. *J Hum Hypertens*. 2011;25(8):509-18.
13. Rankinen T, Rice T, Pérusse L, Chagnon YC, Gagnon J, Leon AS, et al. NOS3 Glu298Asp genotype and blood pressure response to endurance training: the HERITAGE family study. *Hypertension*. 2000;36(5):885-9.
14. Negrao MV, Alves CR, Alves GB, Pereira AC, Dias RG, Laterza MC, et al. Exercise training improves muscle vasodilatation in individuals with T786C polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene. *Physiol Genomics*. 2010;42A(1):71-7.
15. Sponton CH, Rezende TM, Mallagrino PA, Franco-Penteado CF, Bezerra MA, Zanesco A. Women with TT genotype for eNOS gene are more responsive in lowering blood pressure in response to exercise. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2010;17(6):676-81.
16. Esposti RD, Sponton CH, Malagrino PA, Carvalho FC, Peres E, Puga GM, et al. Influence of eNOS gene polymorphism on cardiometabolic parameters in response to physical training in postmenopausal women. *Braz J Med Biol Res*. 2011;44(9):855-63.
17. Kline GM, Porcari JP, Hintermeister R, Freedson PS, Ward A, McCarron RF, et al. Estimation of VO₂max from a one-mile track walk, gender, age, and body weight. *Med Sci Sports Exerc*. 1987;19(3):253-9.
18. Pulkkinen A, Viitanen L, Kareinen A, Lehto S, Vauhkonen I, Laakso M. Intron 4b/a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with elevated blood pressure in type 2 diabetic patients with coronary heart disease. *J Mol Med*. 2000;78(7):372-9.
19. IV Brazilian Guideline for Dyslipidemia and Atherosclerosis prevention. *Arq Bras Cardiol*. 2007;88(Suppl 1):2-19.
20. Cattaruzza M, Guzik TJ, Słodowski W, Pelvan A, Becker J, Halle M, et al. Shear stress insensitivity of endothelial nitric oxide synthase expression as a genetic risk factor for coronary heart disease. *Circ Res*. 2004;95(8):841-7.
21. Dosenko VE, Zagoriy VY, Haytovich NV, Gordok OA, Moibenko AA. Allelic polymorphism of endothelial NO-synthase gene and its functional manifestations. *Acta Biochim Pol*. 2006;53:299-302.
22. Wang XL, Wang J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Mol Genet Metab*. 2000;70:241-51.
23. Miyamoto Y, Saito Y, Nakayama M, Shimasaki Y, Yoshimura T, Yoshimura M, et al. Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T→C mutation associated with coronary spastic angina. *Hum Mol Genet*. 2000;9(18):2629-37.
24. Tesaro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP, Moss J. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;14(6):2832-5.
25. Lakoski SG, Barlow CE, Farrell SW, Berry JD, Morrow JR Jr, Haskell WL. Impact of body mass index, physical activity, and other clinical factors on cardiorespiratory fitness (from the Cooper Center longitudinal study). *Am J Cardiol*. 2011;108(1):34-9.
26. Gupta S, Rohatgi A, Ayers CR, Willis BL, Haskell WL, Khera A, et al. Cardiorespiratory fitness and classification of risk of cardiovascular disease mortality. *Circulation*. 2011;5(13):1377-83.
27. Aspenes ST, Nilsen TI, Skaug EA, Bertheussen GF, Ellingsen Ø, Vatten L, et al. Peak oxygen uptake and cardiovascular risk factors in 4631 healthy women and men. *Med Sci Sports Exerc*. 2011;43(8):1465-73.
28. Keteyian SJ, Brawner CA, Savage PD, Ehrman JK, Schairer J, Divine G, et al. Peak aerobic capacity predicts prognosis in patients with coronary heart disease. *Am Heart J*. 2008;156(2):292-300.
29. Han Y, Xu W, Zhang W, Liu N, Ji Y. T786C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with increased risk of coronary artery disease in a Chinese population. *Pharmacology*. 2010;85(4):211-6.
30. Hoffmann IS, Tavares-Mordwinkin R, Castejon AM, Alfieri AB, Cubeddu LX. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism, nitric oxide production, salt sensitivity and cardiovascular risk factors in Hispanics. *J Hum Hypertens*. 2005;19(3):233-40.
31. Imamura A, Takahashi R, Murakami R, Kataoka H, Cheng XW, Numaguchi Y, et al. The effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on endothelial function and metabolic risk factors in healthy subjects: the significance of plasma adiponectin levels. *Eur J Endocrinol*. 2008;158(2):189-95.
32. Joshi MS, Mineo C, Shaul PW, Bauer JA. Biochemical consequences of the NOS3 Glu298Asp variation in human endothelium: altered caveolar localization and impaired response to shear. *FASEB J*. 2007;21(11):2655-63.
33. Zanesco A, Silva CP, Delbin MA, La Guardia PG, Davel AP, Priviero FB. Mitochondrial biogenesis and redox state in gastrocnemius muscle from trained rats supplemented with L-arginine. *Free Radic Biol Med*. 2011;51(Suppl 1).
34. Frayn KN, Fielding BA, Karpe F. Adipose tissue fatty acid metabolism and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*. 2005;16(4):409-15.