**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA SOCIAL**

Roberta Fernanda da Silva

**Associação entre pressão arterial, polimorfismos da
sintase endotelial do óxido nítrico e do sistema renina
angiotensina aldosterona e nível de condicionamento
físico em idosos normotensos e hipertensos**

RIBEIRÃO PRETO

2016

Roberta Fernanda da Silva

**Associação entre pressão arterial, polimorfismos da
sintase endotelial do óxido nítrico e do sistema renina
angiotensina aldosterona e nível de condicionamento
físico em idosos normotensos e hipertensos**

Dissertação de mestrado apresentada como um dos
requisitos para obtenção do título de mestre ao
Programa de Pós-Graduação em Saúde da Comunidade
da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Área de concentração: Saúde na Comunidade

Orientador: Prof. Dr. Anderson Saranz Zago

RIBEIRÃO PRETO

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Roberta Fernanda da

Associação entre pressão arterial, polimorfismos da sintase endotelial do óxido nítrico e do sistema renina angiotensina aldosterona e nível de condicionamento físico em idosos normotensos e hipertensos / Roberta Fernanda da Silva; orientador: Anderson Saranz Zago, Ribeirão Preto, 2016.

81 f.: il. 30 cm.

Dissertação - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Departamento de Medicina Social. Área de concentração: Saúde na Comunidade.

1. Idoso. 2. Hipertensão Arterial. 4. Hereditariedade. 5. Polimorfismos. 6. Exercício Físico.

SILVA, R. F. **Associação entre pressão arterial, polimorfismos da sintase endotelial do óxido nítrico e do sistema renina angiotensina aldosterona e nível de condicionamento físico em idosos normotensos e hipertensos.** 2016. 79 f. Dissertação apresentada ao Departamento de Medicina Social da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, como requisito para a obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Saúde na Comunidade.

Aprovado em:

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho à minha MÃE,
Nora e à minha IRMÃ, Cibeli que não
pouparam esforços para que esse
sonho se tornasse real!*

A vocês, minha eterna gratidão e o meu amor incondicional!

AGRADECIMENTOS

Chegou o momento de expressar os meus sinceros agradecimentos!

- Agradeço primeiramente a Deus por ter iluminado essa minha trajetória. Senhor, obrigada pelo fim de mais essa etapa;
- À minha família, a base de tudo! Sem vocês eu não teria chegado até aqui. Obrigada pelo exemplo de respeito e honestidade. Amo muito vocês!!!
- Às “famílias de coração” e “amigas/irmãs”, um presente de Deus! Obrigada por todo carinho e apoio de sempre;
- Aos meus queridos e amados amigos e amigas, de perto e de longe, a minha eterna gratidão;
- Ao meu orientador Prof. Dr. Anderson Saranz Zago pela paciência, amizade, sabedoria e acima de tudo por ter acreditado em meu potencial. Muito obrigado Anderson;
- Aos colegas de laboratório, especialmente ao André Mourão Jacomini e ao Anderson Bernardino da Silva pela espontaneidade e alegria na troca de informações e materiais numa rara demonstração de amizade e solidariedade;
- Aos docentes que aceitaram compor minha banca e, dessa forma, contribuíram qualitativamente para este estudo;
- Ao Programa Saúde na Comunidade da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) e a todos os professores pela dedicação, entusiasmo demonstrado ao longo do curso.
- Ao Departamento de Educação Física da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” do Campus de Bauru, por ter disponibilizado o espaço físico para as coletas de dados, onde passei a maior parte do mestrado.

- Aos idosos que participaram desta pesquisa. Obrigada pela paciência e confiança.
- Ao Laboratório de Farmacologia do Departamento Farmacologia da FMRP, em especial ao Prof. Dr. José Eduardo dos Santos e ao Lucas Cezar Pinheiro pelo auxílio nas análises bioquímicas.
- Ao Laboratório de Farmacologia e Genética do Departamento de Ciências Biológicas da FOB/USP, em especial ao Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos e ao Thiago José Dionísio pela parceria nas análises sanguíneas.
- Agradeço, também, à CAPES pelo apoio financeiro.
- Finalmente, gostaria de agradecer a todos que direta ou indiretamente me ajudaram na realização deste trabalho, para que eu pudesse realizar este sonho que era a minha DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. Proporcionaram-me mais que a busca de conhecimento técnico e científico, mas uma LIÇÃO DE VIDA.
- Ninguém vence sozinho... OBRIGADA A TODOS!

EPÍGRAFE

"Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda a prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar. Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda verificação experimental. Perceber os fenômenos, discernir as relações, comparar as analogias e as dessemelhanças, classificar as realidades, e induzir as leis, eis à ciência; eis, portanto, o alvo que a educação deve ter em mira. Espertar na inteligência nascente as faculdades cujo concurso se requer nesses processos de descobrir e assimilar a verdade."

Rui Barbosa

RESUMO

SILVA, R. F. **Associação entre pressão arterial, polimorfismos da sintase endotelial do óxido nítrico e do sistema renina angiotensina aldosterona e nível de condicionamento físico em idosos normotensos e hipertensos.** 2016. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Introdução: A hipertensão arterial (HA) tem tomado proporções significativas nas sociedades atuais, sendo uma das principais causas de mortalidade na população idosa. Alguns estudos têm mostrado que é devido ao alto grau de complexidade da HA e partindo do pressuposto que a variação interindividual dos valores da pressão arterial (PA) é, em parte, determinada geneticamente, algumas abordagens vêm sendo utilizadas para identificar os genes que participam da etiologia da HA. Essa estratégia baseia-se no princípio de que alterações genéticas, envolvidas em funções fisiológicas específicas, contribuem para a variação da PA. Alguns polimorfismos que têm sido estudados são os relacionados com os sistemas renina-angiotensina-aldosterona e o da sintase endotelial do óxido nítrico. Contrapondo-se aos efeitos dos polimorfismos, o exercício físico é considerado uma das principais ferramentas não farmacológicas para o controle da hipertensão. **Objetivo:** Desta forma, o objetivo deste estudo é investigar de forma integrada a relação dos polimorfismos sistemas renina-angiotensina e da síntese endotelial do óxido nítrico no controle da PA de idosos normotensos e hipertensos e, como esta relação pode ser modulada pelo nível de condicionamento físico (CF). **Método:** Trata-se de um estudo transversal realizado em Bauru, SP o qual participaram do estudo 155 idosos com idade média 66,94 (6,83) anos, que realizaram os seguintes testes: Bateria de testes para determinar nível de CF por meio do índice de aptidão funcional geral (IAFG), pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD), coleta de sangue para extração do DNA (QIAamp DNA Mini Kit) e posterior análise dos polimorfismos do gene da eNOS -786T>C; INTRON 4 e 894G>T e M235T do Gene do Angiotensinogênio; D/I do Gene da ECA; A1166C Gene do Receptor AT1 do SRAA e, quantificações da atividade da ECA (Ensaio fluorimétrico) e nitrito (Método da quimioluminescência). **Resultado e Conclusão:** O IAFG é a variável que parece exercer maior influência nas variáveis antropométrica, hemodinâmicas e humorais. Notou-se também uma associação entre os haplótipos dos genes do SRAA, MDA,

TIA e TIC, ao risco de HA. E ainda, identificou-se um modelo de interação significativo entre o gene eNOS e *AGT* em hipertensos comparados a normotensos obtidos pelo método MDR.

Palavras Chaves: Idoso; hipertensão arterial; hereditariedade; polimorfismos da eNOS e da SRAA; exercício físico.

ABSTRACT

SILVA, R.F **Association between blood pressure, polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase and the renin-angiotensin-aldosterone system and fitness level in normotensive and hypertensive elderly.** 2016. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Background: Hypertension (HA) has taken significant proportions in contemporary societies, one of the leading causes of mortality in the elderly population. Some studies have shown that it is due to the high complexity of HA, assuming that the interindividual variation in blood pressure (BP) are in part genetically determined. There are some approaches which have been used to identify genes that participate in the origin of HA. This strategy is based on the principle of genetic alterations involved in specific physiological functions that contribute to the variation of the BP. Some polymorphisms that have been studied are related to the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and the synthase of endothelial nitric oxide (eNOS). Opposed to the effects of polymorphisms, physical exercise is considered one of the main tools for non-pharmacological management for HA. **Objectives:** The purpose of this study was to investigate the relationship between eNOS and RAAS polymorphisms and the effect of these interaction in the BP control in hypertensive and normotensive elderly people, and, how this relationship can be modulated by the level of physical fitness. **Methods:** This is a cross-sectional study developed in Bauru-SP. Participated in this study 155 elderly (66.94 ± 6.83 years old), who underwent the following tests: battery test to determine the fitness level through the general functional fitness index (GFFI), systolic and diastolic blood pressure (SBP and DBP), blood collection for DNA extraction (QIAamp DNA Mini Kit) and subsequent analysis of polymorphisms of the eNOS gene -786T> C; INTRON 4 and 894G> T and M235T of angiotensinogen gene; D / I of the ACE gene; A1166C Gene AT1 Receptor RAAS and quantifications of ACE activity (fluorimetric assay) and nitrite concentration (chemiluminescence Method). **Results and Conclusion:** The GFFI is the variable that appears to exert greater influence on anthropometric, hemodynamic and humoral values. It was noted an association between the haplotypes of RAAS genes, MDA, TIA and TIC and the risk of hypertension. Additionally, it was identified a

significant interaction model between eNOS and AGT gene in hypertensive compared to normotensive obtained by MDR method.

Key Words: elderly, hypertension, heredity, polymorphisms of eNOS and RAAS; physical exercise.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema ilustrativo da síntese, liberação e ação do NO e o papel da eNOS na sua produção (ZAGO, A. S.; ZANESCO, 2006).....	22
Figura 2 - Ilustração do Sistema renina angiotensina aldosterona (adaptado de (RUSH; AULTMAN, 2008).....	24
Figura 3 Fórmula do cálculo amostral retirado de Bolfarine e Bussab, (2005).....	30
Figura 4 - Desenho do Experimental do estudo.....	31
Figura 5 - Ilustração gráfica do teste de coordenação (GOBBI, VILLAR e ZAGO, 2005, adaptada de OSNESS et al., 1990).....	36
Figura 6 - Ilustração gráfica do teste de flexibilidade (GOBBI, VILLAR e ZAGO, 2005, adaptada de OSNESS et al., 1990).....	37
Figura 7 - Ilustração do teste de Força muscular e resistência de membros superiores.....	38
Figura 8 - Ilustração gráfica do teste de agilidade e equilíbrio dinâmico (GOBBI, VILLAR e ZAGO, 2005, adaptada de OSNESS et al., 1990).....	38
Figura 9 - Ilustração do teste de Força muscular e resistência de membros superiores.....	39
Figura 10 - Fotografia do Gel de agarose da análise do Intron 4 da eNOS.....	43

Figura 11 - Fotografia do Gel de agarose da análise da ECA.....	44
--	----

Figura 12 - Interações entre polimorfismos no modelo significativo da Tabela 9. As distribuições de hipertensos (barras da esquerda) e normotensos (barras da direita) são ilustradas para cada uma das combinações entre os diferentes genótipos dos polimorfismos dos genes <i>eNOS</i> (-786T>C) e <i>AGT</i> (M235T). Células sombreadas em cinza-escuro são consideradas combinações de alto risco para hipertensão. Células sombreadas em cinza-claro são consideradas combinações de baixo risco, ou seja, mais frequentes em normotensos.....	56
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição da coleta de dados.....	32
Tabela 2 - Caracterização da amostra de acordo com o nível da pressão arterial (normotenso e hipertenso).....	47
Tabela 3 - Apresentação das variáveis: idade, antropométrica, hemodinâmica, aptidão física e bioquímica em relação ao Índice de Aptidão Funcional Geral – IAFG.....	48
Tabela 4 - Distribuição dos genótipos, alelos e haplótipos para o gene da eNOS em idosos normotensos e hipertensos.....	49
Tabela 5 - Distribuição dos genótipos, alelos e haplótipos para o gene da SRAA em idosos normotensos e hipertensos.....	51
Tabela 6 - Genótipos, alelos e haplótipos para o gene da eNOS, concentração do óxido nítrico e valores bruto do índice de aptidão funcional geral em idosos normotensos e hipertensos.....	53
Tabela 7 - Genótipos, alelos e haplótipos para o gene da SRAA, concentração do óxido nítrico e valores bruto do índice de aptidão funcional geral em idosos normotensos e hipertensos.....	54
Tabela 8 - Apresentação das variáveis: hemodinâmica e bioquímica em relação ao Índice de Aptidão Funcional Geral – IAFG da população de risco para desenvolver HA.....	55
Tabela 9 - Modelo de interação entre polimorfismos dos genes eNOS (-786T>C) e AGT (M235T) em hipertensos comparados a normotensos obtido pelo método MDR.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAHPERD American Alliance for Health Physical Education Recreation and Dance

AGT Angiotensinogênio

ANOVA Análise de Variância

AT1 Receptor Tipo 1 da Angiotensina II

AT2 Receptor Tipo 2 da Angiotensina II

CC circunferência da cintura

CEDEE Centro de Estudos de Doenças Não Transmissíveis, Envelhecimento e Exercício Físico

CF Condicionamento Físico

CVC Cross-Validation

DAC Doença Arterial Coronariana

DCV Doenças Cardiovasculares

DNA Ácido Desoxirribonucleico

dNTP São nucleotídeos do DNA formados por: Uma base azotada (Adenina, Citosina, Guanina e Timina), um açúcar (desoxirribose) e 3 grupos fosfato.

ECA Enzima Conversora da Angiotensina

eNOS Sintase Endotelial do Óxido Nítrico

FC Frequência Cardíaca

FRC Fatores de Riscos Clássicos

G1 Grupo com Nível de Condicionamento Físico “FRACO”

G2 Grupo com Nível de Condicionamento Físico “REGULAR”

G3 Grupo com Nível de Condicionamento Físico “BOM”

HA Hipertensão Arterial

IAFG Índice de Aptidão Funcional Geral

IAM Infarto Agudo do Miocárdio

IMC Índice de Massa Corporal

KS Komologorov Smirmov

MDR Multifactor Dimensionality Reduction

N Número de participantes
NO Óxido Nítrico
NO₂ Nitrito
OR Odds Ratio
PA Pressão Arterial
PAD Pressão Arterial Diastólica
PAS Pressão Arterial Sistólica
PCR Reação em Cadeia Polimerase em Tempo Real
RCQ Relação Cintura-Quadril
SCA Síndrome Coronariana
SESC Serviço Social do Comércio
SNP Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SRAA Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UBS Unidade Básica de Saúde
UNESP Universidade Estadual de São Paulo
USP Universidade de São Paulo
VO_{2MAX} Volume de Oxigênio Máximo
X² Chi Quadrado

ALELOS

A Adenina
C Citosina
D Deleção
G Guanina
I Inserção
M Metionina
T Timina
T Treonina

GENÓTIPOS

TT Homozigoto ancestral do polimorfismo T786C do gene da eNOS
TC Heterozigoto do polimorfismo T786C do gene da eNOS

CC Homozigoto mutado do polimorfismo T786C do gene da eNOS
bb Homozigoto ancestral do polimorfismo INTRON 4 do gene da eNOS
ba Heterozigoto do polimorfismo INTRON 4 do gene da eNOS
aa Homozigoto mutado do polimorfismo INTRON 4 do gene da eNOS
GG Homozigoto ancestral do polimorfismo Glu298Asp do gene da eNOS
GT Heterozigoto do polimorfismo Glu298Asp do gene da eNOS
TT Homozigoto mutado do polimorfismo Glu298Asp do gene da eNOS
MM Homozigoto ancestral do polimorfismo AGT gene do SRAA
MT Heterozigoto do polimorfismo AGT gene do SRAA
TT Homozigoto mutado do polimorfismo AGT gene do SRAA
II Homozigoto ancestral do polimorfismo da ECA gene do SRAA
ID Heterozigoto do polimorfismo da ECA gene do SRAA
DD Homozigoto mutado do polimorfismo da ECA gene do SRAA
AA Homozigoto ancestral do polimorfismo RECEPTOR AT1 gene do SRAA
AC Heterozigoto do polimorfismo RECEPTOR AT1 gene do SRAA
CC Homozigoto mutado do polimorfismo RECEPTOR AT1 gene do SRAA

MEDIDAS

µl Microlitro
µM Micrômetro
µmol/L Micromol por Litro
cm Centímetros
g Gramas
kb Kilo bases
Kg Quilograma
Kg/min Quilograma por Minuto
Kg/min² Quilograma por Minuto ao Quadrado
Km/h - Quilômetro por Hora
mg Miligrama
mg/dl Miligrama por decilitro
mg/proteína Miligrama por proteína
min Minuto
ml Mililitro

ml/kg/min Mililitros de Oxigênio por Quilograma por Minuto

mmH Milímetros de Mercúrio

mol/L Quantidade de matéria do soluto (*mol*) pelo volume de solução
(em litros)

ng Nanograma

nM Nanómetro

nmol/L Nanomol por Litro

nmols/min/mL Nanomol por Minuto por Mililitro

°C Graus Celsius

pb Pares de bases

rep Repetições

rpm Rotações por Minuto

s Segundos

U Unidade de Massa Atômica

V Volt - Tensão Elétrica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVO	29
3. MÉTODO	30
3.1. Delineamento	30
3.2. Participantes e Amostragem	30
3.3. Critério de Inclusão	31
3.4. Critério de Exclusão	32
3.5. Coleta de Dados	32
3.5.1. Questionário	33
3.5.2. Pressão Arterial	33
3.5.3. Avaliação Antropométrica	33
3.5.4. Avaliação Física	34
3.5.5. Avaliação Bioquímica	40
3.6. Análise Estatística	46
4. RESULTADOS	47
5. DISCUSSÃO	58
6. LIMITAÇÃO DO ESTUDO	63
7. CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	65
ANEXOS E APÊNDICES	75

1. INTRODUÇÃO

À semelhança de outros países, o Brasil está passando por uma rápida transição demográfica, caracterizando-se por um aumento progressivo e acentuado da população adulta e idosa. São tendências com fortes implicações estruturais, especialmente no setor da saúde (TAVARES;LEITE; TELLES, 2007).

Ao longo dos últimos 50 anos, a população brasileira quase triplicou: passou de 70 milhões, em 1960, para 190,7 milhões, em 2010. O crescimento do número de idosos, no entanto, foi proporcionalmente maior. Em 1960, 3,3 milhões de brasileiros tinham 60 anos ou mais e representavam 4,7% da população. Em 2000, 14,5 milhões, ou 8,5% dos brasileiros, estavam nessa faixa etária. Na última década, a representação passou para 10,8% da população (20,5 milhões) (IBGE, 2010). Ainda, de acordo com estimativas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010), a população de idosos no Brasil passará em 2025 para 32 milhões de pessoas.

Infelizmente, associado ao crescente número de idosos tem-se observado também um aumento significativo das doenças e agravos de saúde. Apesar da redução progressiva da mortalidade por doenças cardiovasculares (DCV) no Brasil, identificado no estudo de Mansur e Favarato (2012), as taxas de mortalidade continuam elevadas e podem ser decorrentes da alta prevalência e, ao mesmo tempo, da falta de controle dos fatores de risco para as DCV na população, sendo a hipertensão arterial (HA) um dos fatores de risco de maior prevalência (MANSUR ADE; FAVARATO, 2012). A prevalência de HA no Brasil, de acordo com a revisão de Pontes-Neto et al., (2008) e Passos et al., (2006) varia entre 20% e 44%, e dentre os indivíduos hipertensos somente 30% têm a pressão arterial (PA) sob controle (CIPULLO JP et al., 2010).

Ainda, segundo o Ministério da Saúde, no Brasil, as DCV são responsáveis por cerca de 30% da mortalidade geral e por 1,2 milhões de hospitalizações, com um custo aproximado de 650 milhões de dólares/ano (SAÚDE, 2007). A HA está presente em 50% das mortes causadas por DCV e afeta mais de 36 milhões de brasileiros adultos, sendo o maior fator de risco para lesões cardíacas e cerebrovasculares e a terceira causa de invalidez (SAÚDE, 2007).

Essa multiplicidade de consequências coloca a HA na origem das DVC e, portanto, caracteriza-a como uma das causas de maior redução da qualidade e expectativa de vida dos indivíduos.

A HA é uma síndrome multifatorial e poligênica caracterizada pela presença de níveis tensionais elevados e normalmente associada a distúrbios metabólicos, hormonais com presença de hipertrofia cardíaca e elevação do tônus vascular (DATA, SHERI A. et al., 2003, FARINATTI, P. D. T. V., 2008). Em adição e, de acordo com a *American Heart Association*, a HA é um dos principais problemas de saúde pública e a doença mais comum em países industrializados. Estima-se, por exemplo, que um a cada três norte-americanos seja hipertenso (SAWADA et al., 2008).

Existe um conjunto de causas potencialmente determinantes para a ocorrência da HA, no qual se destacam a idade, o IMC, a obesidade, os hábitos alimentares inadequados, o tabagismo, a inatividade física, os fatores genéticos, entre outros (TAVARES et al., 2007, ZAITUNE, 2006) Na etiologia dessa doença, sabe-se que a influência familiar possui uma forte contribuição na manifestação final dos valores da PA. Assim, a HA pode ser considerada como uma interação entre fatores genéticos, ambientais e demográficos (GOBBI;VILAR; ZAGO, 2005).

Neste contexto, partindo do pressuposto que a variação interindividual dos valores da PA é devido ao alto grau de complexidade da HA, que, em parte, são determinados geneticamente, algumas abordagens vêm sendo utilizadas para identificar os genes que participam da etiologia da HA. De acordo com Gonçalves (2002), uma das estratégias mais utilizadas para tentar identificar o *locus* genético com a predisposição para o desenvolvimento dessa doença é a determinação de alguns polimorfismos (variação genética) que estão envolvidos em funções fisiológicas específicas, que contribuem para a variação da PA. Estudos sobre polimorfismos genéticos possuem várias funções, dentre elas, a determinação de marcadores moleculares relacionados ao desenvolvimento das doenças (BONFIM-SILVA; RIOS, 2012). Isto se torna importante, pois o desenvolvimento de marcadores moleculares pode dar origem a um novo prognóstico. Dentre esses polimorfismos relacionados ao controle da PA pode-se destacar os da Sintase do Óxido Nítrico Endotelial (eNOS), sendo os mais pesquisados os -786T>C, VNTR no Intron 4 a/b e o 894G>T e os do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA), sendo os mais estudados AGT, ECA e AT1 (CAMPO et al., 2005). Ambos os

sistemas estão relacionados diretamente ao controle do tônus vascular e, por consequência, seus respectivos polimorfismos podem diminuir a produção e liberação de óxido nítrico (NO) ou aumentar a ativação do SRAA gerando consequências diretas na resistência vascular periférica e, consequentemente na PA (DATA, S. A. et al., 2003, DENGEL et al., 2007, GLADWIN et al., 2006, HELTIANU et al., 2005a, SANDRIM et al., 2006, TANGUREK et al., 2006, WANG et al., 2000).

Dentre os mecanismos vasodilatadores, segundo o artigo de revisão de Zago e Zanesco (2006), o óxido nítrico (NO) produzido pelas células endoteliais possui uma importante função no controle cardiovascular, especialmente para o mecanismo de vasodilatação. Quando a eNOS é ativada, por meio do *shear stress* ou agonistas, o metabolismo da L-arginina é aumentado gerando a formação de L-citrulina e de NO. Uma vez produzido, o NO migra da célula endotelial para a célula muscular lisa gerando um aumento da atividade do guanilato ciclase solúvel, culminando na diminuição de cálcio intracelular e, consequentemente no relaxamento da musculatura vascular lisa (figura 1).

Figura 1 - Esquema ilustrativo da síntese, liberação e ação do NO e o papel da eNOS na sua produção (ZAGO, A. S.; ZANESCO, 2006).

Os polimorfismos relacionados à via de produção de NO tem sido relacionado a uma menor ativação da eNOS, gerando como consequência, uma menor produção de NO e menor estímulo para a vasodilatação (ERBS et al., 2003, NAKAYAMA et al., 1999, TANG et al., 2008).

Os polimorfismos -786T>C, 894G>T e o VNTR no intron 4 a/b têm sido bastante associados com as doenças arterial coronariana (DAC) em muitos estudos, embora os resultados sejam conflitantes. Ainda, existem poucos trabalhos relacionando os polimorfismos da eNOS entre si (estudos envolvendo os haplótipos), bem como, com os fatores de estilo de vida, que sabidamente, correspondem a fatores de risco para desenvolvimento de DAC. A maioria das investigações tem como foco a abordagem de um “gene candidato” ou um “polimorfismo candidato” (CASAS et al., 2006).

O Polimorfismo -786T>C é polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), localizado na região promotora do gene eNOS, o qual existe uma substituição de uma timina (T) para uma citosina (C) na base -786 (NAKAYAMA et al., 1999). Esse polimorfismo resulta numa significativa redução na atividade promotora do gene da eNOS (NAKAYAMA et al., 1999) que leva a redução na síntese de NO circulante e, consequentemente, a disfunção endotelial (KIM et al., 2007).

Já o polimorfismo do VNTR intron 4 a/b é caracterizado por 27 pares de bases (pb) repetidos no intron 4 do gene da eNOS. Apresenta quatro repetições quando for Intron 4 a/a e cinco repetições quando for Intron 4 b/b (YOON et al., 2000). O genótipo Intron a/a foi relacionado com predisposição à síndrome coronariana aguda (SCA), que é um termo que se aplica a um conjunto de sinais e sintomas clínicos que parecem refletir diferentes graus de isquemia miocárdica aguda, ao infarto agudo do miocárdio (IAM) e também foi fator de risco associado ao tabagismo para o desenvolvimento de DAC em uma população na Itália (FATINI et al., 2004). Por outro lado, Matyar et al., (2005) mostraram que o alelo Intron 4a não foi preditor independente para DAC e que a presença de risco só é verificada quando associado aos fatores de risco clássicos (FRC) para DAC, como gênero, HAS, Diabetes mellitus, idade e tabagismo.

O polimorfismo 894G>T é um SNP, dentro do éxon 7 do gene da eNOS, de uma guanina (G) para uma timina (T) na base 894 que leva à modificação do resíduo conservado de ácido glutâmico para um ácido aspártico no aminoácido 298 da sequência protéica (Glu298Asp) do domínio da estrutura extracelular da eNOS (HINGORANI et al., 1999). O genótipo 894TT (298Asp) de 894G>T tem sido associado com baixa disponibilidade de NO, causada, principalmente, por uma redução basal na produção de NO (VELDMAN et al., 2002). A eNOS 298Asp está

sujeita a clivagem proteolítica nas células endoteliais e nos tecidos vasculares, o que pode levar a uma menor geração de NO vascular (TESAURO et al., 2000).

O sistema renina-angiotensina também tem uma importante contribuição na homeostase cardiovascular. Este é um sistema responsável especialmente pela homeostase do sal, da água e do tônus vascular (LATERZA;RONDON; NEGRÃO, 2007). Ele é constituído por quatro proteínas principais: renina, angiotensinogênio, enzima conversora da angiotensina e os receptores para a angiotensina II (figura 2). Na visão mais clássica, o SRAA age endocrinamente, sendo que a renina (enzima liberada pelo aparelho justaglomerular renal cliva o angiotensinogênio (globulina liberada pelo fígado) em angiotensina I que por sua vez é clivada em angiotensina II pela Enzima Conversora de Angiotensina (ECA). Esta enzima está presente na superfície vascular e tem como seu principal ponto anatomofuncional o leito vascular pulmonar, o qual recebe 100% do débito cardíaco. A angiotensina II, quando ligada aos receptores AT1, promove liberação de aldosterona que por sua vez promove a retenção de sódio e água, mantendo o equilíbrio hemodinâmico do corpo. Já se a angontensina II se ligar aos receptores AT2 haverá um estímulo para a vasodilatação (LATERZA et al., 2007).

Figura 2 - Ilustração do Sistema renina angiotensina aldosterona (adaptado de (RUSH; AULTMAN, 2008).

Apesar de sua importante função no equilíbrio hemodinâmico, o aumento da ativação do SRAA pode culminar num aumento da vasoconstrição e, consequentemente um aumento da resistência periférica e PA (HELTIANU et al., 2005b). Um dos principais fatores que podem aumentar sua ativação são os polimorfismos, justificando-se assim a influência genética na etiologia para HA.

Como consequência dessa ação, vários estudos têm apontado associações entre os polimorfismos do SRAA com as DCV, inclusive com a HA (GLUBA et al., 2009, HOLLANDER; WOLF, 1999, LEAN;HAN; CE., 1995, LOTUFO, 2008). Ainda, segundo Rola e Ferreira, (2008) existem evidências de que alguns polimorfismos genéticos do SRAA podem influenciar no desenvolvimento, manutenção, gravidade e aumento de complicações causadas pela HA.

O angiotensinogênio (AGT) é uma glicoproteína que em sua forma madura consiste em 452 aminoácidos. Ele é principalmente sintetizado pelo fígado sob o controle positivo de estrógenos, glucocorticóides, hormônios da tireóide e angiotensina II, além de ser sintetizado também em outras regiões como: cérebro, grandes artérias, coração, rins, e tecidos adiposos (PROCOPCIUC et al., 2002). O AGT é um dos metabólitos do SRAA, sua função é servir de substrato para a enzima renina, uma aspartil protease produzida pelo rim, levando a produção de um decapeptídeo, conhecido como angiotensina I (CORVOL; JEUNEMAITRE, 1997). O gene do angiotensinogênio humano foi localizado no cromossomo 1q42-3 e é composto por cinco éxons e quatro íntrons distribuídos em 13kb de sequências genômicas. Um polimorfismo dentro do éxon 2 leva a troca de uma metionina por uma treonina na posição 235 (M235T), essa mutação foi significativamente associado com o risco de hipertensão (NIU et al., 1998).

A enzima conversora da angiotensina I (ECA) é uma metaloprotease produzida pelas células endoteliais, principalmente dos pulmões, e que também faz parte do SRAA. A ECA possui a função de clivar o decapeptídeo angiotensina I, excluindo dois aminoácidos da porção carboxi-terminal, e liberando o octapeptídeo angiotensina II, um potente vasoconstritor e estimulador da aldosterona (HARRAP et al., 1993). A ECA está associada em várias condições patológicas incluindo vasoconstrição, trombose coronariana e parada cardíaca (ACARTURK et al., 2005). O gene da ECA está localizado no cromossomo 17q23, possui 17kb, 26 éxons e 25 íntrons (CRISAN; CARR, 2000). O polimorfismo do gene da ECA é caracterizado

pela Inserção/Deleção de 287pb no íntron 16 (NAKAI et al., 1994), que parece afetar as atividades séricas da enzima (SCHUNKERT et al., 1994). Algumas pesquisas já publicadas revelam uma associação deste polimorfismo com a HA e com a DAC, por outro lado, há também estudos que não mostram associação alguma com estas doenças. Sendo o mais importante gene do SRAA associado com HA na maioria da população (PROCOPCIUC et al., 2002), a indústria farmacêutica estudou extensiva e detalhadamente esta enzima e, drogas que inibem a ECA, são usadas para controlar a pressão sanguínea em pacientes com HA (HARRAP et al., 1993).

Ainda, o receptor AT1, derivado da angiotensina II, está associada à disfunção endotelial, principalmente, como consequência do aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, vasoconstrição e ativação plaquetária. Os efeitos do bloqueio dos receptores AT1 da angiotensina II têm sido alvo de grande investigação (FONSECA; IZAR, 2004). O gene que codifica o receptor tipo 1 da angiotensina II está situado no cromossomo 3, é composto por 5 éxons distribuídos em 45 kb (ERDMANN et al., 1999). O polimorfismo do receptor de AT1 foi identificado na região 3' não traduzida (A1166C) e correspondente a uma transversoão A→C (substituição da Adenina por Citosina) na posição do nucleotídeo 1166 da sequência do mRNA, resultando em dois genótipos homozigotos (CC e AA) e o heterozigoto AC (BONNARDEAUX et al., 1994). Diversos estudos indicam associação entre o polimorfismo A1166C do gene do AT1 com a HA (com o aumento da frequência do alelo 1166C nos hipertensos) (PIROLA, 2000).

Tanto para os mecanismos vasodilatadores (NO) quanto para os mecanismos vasoconstritores (SRAA) o mecanismo homeostático vascular é dependente de um bom funcionamento e da interação entre ambos, pois a presença de polimorfismos pode comprometer o controle cardiovascular, gerando um desequilíbrio entre os sistemas e, consequentemente aumento da PA, como observado nos estudos anteriormente citados. No entanto, ainda há uma carência na literatura de estudos que avaliem tais polimorfismos de forma concomitante, destacando as interações entre tais sistemas de controle da PA.

Em contra partida, o exercício físico, realizado regularmente, é recomendado para a manutenção da saúde e prevenção de inúmeras doenças cardiovasculares, inclusive a HA. Nesta perspectiva, inúmeros estudos indicam que exercícios moderados a intensos, aeróbios e/ou de resistência estão associados com reduções importantes na incidência de eventos cardiovasculares, colocando o exercício físico

como uma importante modalidade terapêutica na prevenção e tratamento destas doenças (MATAVELLI; DEL JUDICE, 2014). Nos últimos anos, foram descritos diversos benefícios do exercício regular para portadores de cardiopatia (ALVAREZ et al., 2014), além da melhora na capacidade funcional (SILVA, A.B.D., 2015).

Ciolac e Guimarães, (2004) mostraram em seu estudo que a prática regular de exercício físico previne o aumento da PA associado à idade, mesmo em indivíduos com risco aumentado de desenvolvê-la.

Segundo o estudo realizado por Moraes et al., (2011), trinta e seis idosos com HA submetidos a um programa de exercícios físicos multicomponente, com duas sessões semanais de 60 minutos cada, durante 12 semanas, em uma Unidade Básica de Saúde (UBS) apresentaram ao final da intervenção uma redução significativa de 6 mmHg da PA sistólica (PAS) e 2 mmHg para a diastólica (PAD).

Ainda, segundo Pizzano (2011), que realizou um programa de atividade física, duas vezes por semana, com duração de 60 minutos, durante oito semanas com 16 idosos na faixa etária de 60 a 85 anos de idade, do município de Cáceres-MT, comprovou que o exercício físico contribui para reduzir fatores de risco cardiovasculares como a PAS, concentração do colesterol VLDL e quantidade de gordura corporal.

O estudo de Trapé et al., (2014) também indicou que a prática da caminhada associada a outro tipo de exercício físico (atividade multicomponente) proporcionou melhores resultados nos fatores de riscos de DCV e no nível de aptidão física de adultos e idosos, sendo, portanto, uma recomendação que deveria ser incorporada pelos profissionais da área de saúde quando se objetiva melhorar a qualidade de vida e a saúde deste segmento populacional. Corroborando com estes resultados Silva, (2015) demonstrou que idosos que praticam multimodalidades de exercício físico tem maior capacidade funcional e menores valores de PA que idosos sedentários. A prática do exercício físico regular tem sido estudada também no sentido de minimizar o efeito dos polimorfismos, aumentando ou diminuindo a expressão de determinado gene polimórfico, contrapondo-se assim a determinado efeito deletério. Neste sentido, os estudos apontam que, mesmo quando os participantes possuem os respectivos polimorfismos, a prática do exercício físico seria suficiente para um aumento das concentrações de NO (SILVA, R.F. et al., 2014) e diminuição da atividade do SRAA (IBGE, 2010) em adultos (IBGE, 2010, RUSH;DENNISS; GRAHAM, 2005, SILVA, R.F. et al., 2014, ZAGO, A. S. et al.,

2010). O estudo de Silva et al., (2014) concluiu que manter bons níveis de CF, pode resultar em um aumento das concentrações plasmáticas de NO₂, que pode refletir melhor biodisponibilidade de NO, favorecendo o controle da HA em adultos e idosos. Os autores afirmaram ainda, que os polimorfismos da eNOS e as respectivas concentrações de NO₂ plasmático são sensíveis ao nível de CF (SILVA, R.F. et al., 2014).

Entretanto, várias pesquisas que visam estudar o controle cardiovascular e que são realizadas tomando como base os fatores citados por este projeto, o fazem de forma isolada, dando ênfase ou nos fatores genéticos ou nas concentrações de substâncias liberadas. Ainda há uma carência de estudos que busquem avaliar a interação de vários polimorfismos, tanto da eNOS quanto da SRAA, no controle da PA, juntamente com seus respectivos fatores humorais em idosos normotensos e hipertensos.

Cabe ainda a ressalva que existem algumas controvérsias no que se refere ao efeito benéfico do exercício físico neste sistema, pois alguns estudos não reportaram um efeito significativo proveniente da prática de exercícios. No entanto, tais diferenças podem ser devido a grande variedade com que o exercício físico pode ser realizado, tanto em termos de intensidade, duração e frequência. Diante desta grande diversidade, a avaliação do nível de condicionamento físico geral, independente do tipo de exercício praticado anteriormente, parece ser mais adequada para se estabelecer tais relações. No entanto, também há uma carência de estudos que buscam entender como o nível de condicionamento físico poderia modular a relação entre o conjunto desses fatores (genéticos e humorais).

Sendo assim, as hipóteses deste estudo são:

- 1) Idosos normotensos possuem menor atividade do SRAA e possuem maiores concentrações do NO independente do nível de CF (Bom, Regular ou Fraco) comparado aos idosos hipertensos;
- 2) Idosos hipertensos possuem maior incidência de alelos polimórficos e alterações nos níveis humorais das vias de controle da PA;
- 3) Mesmo em idosos que possuem os polimorfismos relatados anteriormente, a manutenção de bons níveis de CF promoveria um aumento das concentrações de NO e menor ativação da SRAA, tendo, portanto, um melhor controle da PA.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo é investigar de forma integrada a associação dos polimorfismos dos sistemas da sintase endotelial do óxido nítrico e do renina angiotensina aldosterona no controle da pressão arterial de idosos normotensos e hipertensos e, como esta relação pode ser modulada pelo nível de condicionamento físico.

2.2 Objetivo Específico

- Verificar se existe associação entre as variáveis: antropometria, hemodinâmica, aptidão física e bioquímica sanguínea em idosos normotensos e hipertensos e com relação ao Índice de Aptidão Funcional Geral (IAFG);
- Verificar se existe uma combinação de polimorfismos (haplótipos) tanto da eNOS quanto do SRAA que seja predominante nos idosos normotensos e hipertensos e se estes exercem influência nas as concentrações humorais de NO e do SRAA;
- Verificar a influência dos diferentes níveis de condicionamento físico sobre a relação haplótipos, fatores humorais e pressão arterial de idosos normotensos e hipertensos.

3. MÉTODOS

O presente estudo faz parte de um projeto maior intitulado: “Interação entre polimorfismos genéticos, estresse oxidativo e aptidão física no controle da pressão arterial de adultos e idosos”, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências/UNESP-Bauru, sob o número do parecer 323.427. (APÊNDICE A)

3.1 Delineamento

Trata-se de um estudo epidemiológico de corte transversal.

3.2 Participantes e amostragem

Participaram deste estudo idosos com idade média 66,94 (6,83) anos do município de Bauru – São Paulo (SP). Para o cálculo do tamanho amostral, utilizou-se a fórmula ilustrada na figura 3. Foi utilizada a média da prevalência entre os sexos, pois não houve distinção de sexo no trabalho, dessa maneira, a prevalência estimada de hipertensão foi de 51%, população de idosos em Bauru-SP estimada em 42.234. Adotou-se um nível de significância de 5% e um erro absoluto tolerável de 8%, sendo uma amostra representativa desta população o número total de 150 participantes.

$$n = \frac{z_{(1-\gamma)/2}^2 N p(1-p)}{d^2 (N-1) + z_{(1-\gamma)/2}^2 p(1-p)}$$

Figura 3 - Fórmula do cálculo amostral (BOLFARINE; BUSSAB, 2005).

Inicialmente foram cadastrados no banco de dados 241 indivíduos, dos quais 214 foram elegíveis, sendo que apenas 155 completaram todas as avaliações proposta pelo estudo.

Desse modo, participaram efetivamente deste estudo 155 idosos, sendo 133 mulheres e 22 homens e todos assinam um termo de consentimento livre e

esclarecido após terem todas as dúvidas respondidas e esclarecidas pelo pesquisador responsável.

Os participantes foram recrutados por meio de convites pessoais, panfletos, anúncios, convites a grupos de terceira idade participantes de projetos da UNESP, USP e SESC da cidade de Bauru, sendo que estes foram subdivididos em grupos de acordo com a PA. Aqueles que apresentaram valores de PA até 139 mmHg para PAS e/ou 89 mmHg para PAD foram classificados como normotensos e enquanto que aqueles com valores de PA a partir de 140 mmHg para PAS e/ou 90 mmHg para PAD controlados ou não com medicamentos foram classificados como hipertensos. Posteriormente, os participantes foram classificados de acordo com o nível de CF (ruim, regular ou bom) sendo classificado por meio do Índice de Aptidão Funcional Geral (IAFG) independentemente do tipo de exercício praticado anteriormente ao estudo (Figura 4).

Figura 4 - Desenho do Experimental do estudo

3.3 Critérios de Inclusão

Foram incluídos no estudo idosos que atendessem os seguintes critérios de inclusão; não fumantes; não apresentar qualquer condição médica, cardiológica, ortopédica e/ou musculoesqueléticos que pudesse impedir a realização das avaliações.

3.4 Critérios de Exclusão

Foram excluídas do estudo todas as pessoas que apresentassem qualquer condição que pudesse impedir a realização de exercícios físicos e também aqueles que apresentaram PA muito elevada.

3.5 Coleta de dados

A coleta de dados foi realizada no Centro de Estudos de Doenças Crônicas não Transmissíveis, Envelhecimento e Exercício Físico (CEDEE) da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Bauru, em quatro visitas distintas. Na primeira visita, os idosos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A) e responderam a um questionário semiestruturado (APÊNDICE B), em seguida foi realizada a primeira medida da PA. Na segunda visita, foi coletada a segunda medida de PA, as medidas antropométricas e os testes de capacidade físicas da American Alliance for Health, Physical Education, Recreation and Dance (AAHPERD). Na terceira visita, foi coletada a terceira medida de PA e realizado o teste ergométrico, para determinação indireta do volume máximo de oxigênio ($VO_2\text{max}$). Por fim, na quarta e última visita, foi realizada apenas a coleta de sangue. A tabela 1 representa a distribuição da coleta de dados.

Tabela 1- Distribuição da coleta de dados.

1ª VISITA	2ª VISITA	3ª VISITA	4ª VISITA
- TCLE - Questionário - 1ª Medida de PA	- 2ª Medida de PA - Medidas Antropométricas - Bateria de Testes Motores	- 3ª Medida de PA - Teste Ergométrico	- Coleta de Sangue

TCLE: Termo de Consentimento livre e esclarecido; PA: Pressão arterial.

O grupo de pesquisa responsável pela coleta de dados foi composto por três alunos de graduação (iniciação científica), um docente, todos vinculados ao

departamento de Educação Física da Faculdade de Ciência da UNESP – Campus de Bauru e três alunos de mestrado vinculados a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Todos passaram por treinamento e familiarização dos protocolos antes da realização das coletas de dados. Ainda, para uma melhor padronização dos testes cada membro do grupo ficou responsável em aplicar sempre as mesmas avaliações durante toda etapa de coleta de dados. A coleta de sangue foi realizada por uma profissional especializada neste tipo de coleta.

Todos os participantes realizaram as seguintes avaliações:

3.5.1 Questionário Semiestruturado

Os participantes responderam a um questionário semiestruturado, o qual fornecia informações do perfil de cada participante e verificava se atendiam aos critérios de inclusão. Neste contêm, informações cadastrais, histórico pessoal e familiar relacionado à condição de saúde, diagnósticos médicos e medicamentos, além de dados sobre histórico sobre a prática de exercício físico e hábitos atuais sobre a prática de exercício físico.

3.5.2 Pressão Arterial

A medida da PA ocorreu de acordo com as VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão (2010), sendo realizadas três medidas em dias separados, com o manguito adequado para o tamanho do braço estando este na posição sentada, com os pés apoiados no solo, após pelo menos cinco minutos de descanso. Para isto foi utilizado um aparelho esfigmomanômetro aneróide devidamente calibrado, da marca Wan Med® e estetoscópio da marca Littmann®.

3.5.3 Avaliação Antropométrica

Foi utilizada uma balança antropométrica eletrônica digital Tanita® (modelo VM – 080), devidamente calibrada, com capacidade para 150 kg e variação de 100

g; uma fita métrica do tipo inextensível Sanny® e um estadiômetro SECA® – 206, com capacidade para 220 cm, o qual foi fixada em uma parede lisa e sem rodapé, a mesma formou um ângulo de 90° com o solo (WHO, 1995). Os participantes permaneceram descalços, trajando apenas roupas leves, na posição de pé, ereta, com o olhar para frente (Plano de Frankfurt), e membros superiores próximos ao corpo.

A classificação do estado nutricional dos participantes foi realizada com os seguintes índices antropométricos, com seus respectivos pontos de corte:

- a) Índice de Massa Corpórea – IMC, obtido pela divisão da massa corporal em quilogramas pela estatura em metros elevada ao quadrado, tendo como pontos de corte os valores propostos pela Organização Pan-Americana de Saúde – OPAS, (2005), utilizados na pesquisa Saúde Bem-estar e Envelhecimento - SABE: Baixo peso < 23 kg/m², Peso normal 23 – 27,99 kg/m², Sobrepeso 28 – 29,99 kg/m² e Obesidade = 30 kg/m² (OPAS, 2005).
- b) Circunferência da Cintura – CC, realizada no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca. O valor considerado como obesidade central, para homens foi de > 94 cm e para mulheres > 80 cm (MOORE, N. et al., 2007, NEGRÃO; BARRETTO, 2006).
- c) Relação Cintura- Quadril – RCQ, calculada pela divisão da circunferência da cintura pela circunferência do quadril, sendo considerados com obesidade central indivíduos do sexo feminino que apresentaram RCQ> 0.85 e indivíduos do sexo masculino que apresentaram RCQ> 1.0 (OSNESS, W. H., 1990).

3.5.4 Avaliação Física

A avaliação do condicionamento físico foi realizada por meio da avaliação indireta do consumo máximo de oxigênio (VO₂max) e pela bateria de testes de aptidão funcional proposto pela *American Alliance for Health Physical Education Recreation and Dance* (AAHPERD). A determinação do VO₂max, foi realizado por meio de um teste em esteira ergométrica utilizando-se o protocolo de Balke modificado, que permitiu estimar o VO₂max dos participantes (FARINATTI, PAULO DE TARSO VERAS, 2008).

1) Teste Ergométrico (determinação do $VO_2\text{max}$): Foi utilizado o protocolo de Balke em esteira adaptado para idosos, em que a cada minuto há aumentos progressivos na carga de trabalho, por meio de incrementos por minuto na inclinação da esteira, iniciando com a inclinação de 0% e aumento de 2% a cada minuto, mantendo a velocidade constante entre 1,6 a 7,2 km/h (FARINATTI, P. D. T. V., 2008). A velocidade constante é definida subjetivamente de acordo com as experiências de cada indivíduo. A frequência cardíaca foi monitorada através de frequencímetro (marca Polar, modelo RS 800CX) em batimentos por minuto. Antes do teste e ao final de cada estágio foi medida a pressão arterial e avaliada a percepção subjetiva de esforço por meio da Escala de Borg modificada. O teste contou sempre com a presença de pelo menos dois pesquisadores, um responsável pelo monitoramento da pressão arterial e outro pelo monitoramento da frequência cardíaca (FC) e controle da esteira. O teste não foi realizado nos casos em que o participante apresentou pressão arterial acima de 140/90 mmHg antes do esforço físico. Para encerramento do teste foram adotados os seguintes critérios: a) alcançar 75% da frequência cardíaca máxima (dada pela fórmula de Karvonen: $220 - \text{idade em anos}$); b) o indivíduo declarar exaustão alegando não conseguir prosseguir com o teste; c) elevação exacerbada da frequência cardíaca no primeiro minuto de esforço físico; d) elevação da pressão arterial diastólica, ou queda persistente da pressão arterial sistólica mesmo com aumento da intensidade do esforço, baseado nos critérios da III Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Teste Ergométrico (2010).

O $VO_2\text{máx}$ foi mensurado posteriormente através das fórmulas: $(3,288 \times \text{tempo em esteira}) + 4,07$ para os participantes sedentários, e $(3,778 \times \text{tempo em esteira}) + 0,19$ para os ativos.

2) Bateria de testes de aptidão funcional proposto pela *American Alliance for Health Physical Education Recreation and Dance (AAHPERD)*: A bateria de testes da AAHPERD permite avaliar a aptidão funcional geral do participante através da avaliação de várias capacidades físicas, e não somente resistência aeróbia como vem sendo utilizado por diversos estudos (OSNESS, W. et al., 1990, OSNESS, W.H., 1989, SAÚDE., 2010), sendo composta pelos seguintes testes:

a) Coordenação: Este teste baseia-se na coordenação neuromuscular de mãos e braços (OSNESS, W.H., 1989). O qual os participantes invertem a base de apoio de algumas latas de refrigerante colocando-a em posições específicas no menor tempo possível; Uma fita adesiva com 76,2 cm de comprimento foi fixada sobre uma mesa, e sobre a fita foram feitas 6 marcas com 12,7 cm equidistantes entre si, com a primeira e última marca a 6,35 cm de distância das extremidades da fita. Sobre cada uma das 6 marcas foi afixado, perpendicularmente à fita, um outro pedaço de fita adesiva com 7,6 cm de comprimento. Um dos participantes sentou-se de frente para a mesa e usou sua mão dominante para realizar o teste. A lata de refrigerante 1 foi colocada na posição 1, a lata 2 na posição 3, e a lata 3 na posição 5 (se a mão dominante for a direita). Com o polegar para cima, a mão direita foi colocada na lata 1, o cotovelo deve estar flexionado em um ângulo de 100 a 120 graus. Ao sinal do avaliador, o participante, virando a lata, inverteu sua base de apoio de forma que a lata 1 seja colocada na posição 2, a lata 2 na posição 4, e a lata 3 na posição 6, sem intervalo de tempo, o participante agora com o polegar para baixo, apanhou a lata 1 e inverteu sua base, a recolocando na posição 1, a lata 2 na posição 3 e a lata 3 na posição 5, desta maneira completando um circuito. Uma tentativa equivale à realização do circuito duas vezes. Cada participante realizou duas tentativas de prática e outras duas para análise, sendo considerada a tentativa de menor tempo como resultado final (figura 5);

Figura 5 - Ilustração gráfica do teste de coordenação (GOBBI, VILLAR e ZAGO, 2005, adaptada de OSNESS et al., 1990).

b) Flexibilidade: Foi fixada no solo uma fita adesiva de 50,8 cm de comprimento com duas marcas equidistantes 15,2 cm de seu centro. Perpendicularmente a fita adesiva foi fixada uma fita métrica ao centro na medida de 63,5 cm de comprimento. Descalço, o participante sentou-se ao solo próximo ao ponto zero da trena, com as pernas estendidas (sob o auxílio do avaliador para evitar a flexão dos joelhos), os pés afastados 30,4 cm entre si, os calcanhares centrados nas marcas da fita adesiva e os artelhos apontados para cima. Os participantes, com as mãos uma sobre a outra, deslizou vagarosamente sobre a fita métrica, permanecendo na posição final por 2 segundos. Foram oferecidas duas tentativas para prática e duas para avaliação, o melhor resultado foi considerando o escore final (figura 6);

Figura 6 - Ilustração gráfica do teste de flexibilidade (GOBBI, VILLAR e ZAGO, 2005, adaptada de OSNESS et al., 1990).

c) Força muscular e resistência de membros superiores: consiste na extensão e flexão do cotovelo. O participante foi posicionado sentado em uma cadeira sem apoio nos braços, apoiando as costas no encosto da cadeira, com o tronco ereto, olhando diretamente para frente e com a planta dos pés completamente apoiadas no solo. A mão não dominante foi apoiada sobre a coxa enquanto o braço dominante ficou relaxado e estendido ao longo do corpo. O avaliador, com uma das mãos envolvendo o bíceps do participante, colocou um peso (1,8 kg para mulheres e 3,6 kg para homens) na mão dominante do avaliado. O participante realizou uma flexão até que toque a mão do avaliador, seguida de extensão do cotovelo. Alcançando sucesso na tentativa o peso foi colocado sobre o solo pelo avaliador, foi concedido um minuto de descanso ao participante, logo depois o peso foi novamente colocado na mão dominante do avaliado e lhe foi

solicitado a realizar o maior numero de repetições possíveis, com flexões e extensões de cotovelo, em um tempo de 30 segundos (figura 7);

Figura 7 - Ilustração do teste de Força muscular e resistência de membros superiores.

d) Agilidade e equilíbrio dinâmico: O participante, sentado em uma cadeira, ao comando de “pronto” e “já” do avaliador, levantou-se e circundou um cone localizado à direita a 1,5 metros para traz e 1,8 metros para o lado da cadeira, e retornou o mais rápido possível à posição sentada na cadeira. Imediatamente, o participante levantou os pés do chão (para garantir a finalização do movimento) e iniciou o mesmo movimento do lado oposto, completando um ciclo. Uma tentativa equivale a dois ciclos. Foram realizadas duas tentativas e o resultado final foi o menor tempo na realização entre as duas tentativas (figura 8);

Figura 8 - Ilustração gráfica do teste de agilidade e equilíbrio dinâmico (GOBBI, VILLAR e ZAGO, 2005, adaptada de OSNESS et al, 1990).

e) Teste de resistência aeróbia geral: Foi orientado ao participante percorrer caminhando o mais rápido possível, sem correr, uma distância de 804,67 metros. Foi realizada uma única tentativa, o tempo foi cronometrado em minutos e segundos,

quanto menor o tempo, melhor o resultado. Dores no peito, dispneia, formigamento de braços e mãos, tonturas o participante relatava ao avaliador e o teste era interrompido imediatamente (Figura 9).

Figura 9 - Ilustração do teste de resistência aeróbia geral.

A escolha pela utilização desta bateria se deu por ser a mais antiga bateria de testes utilizada para avaliar aptidão funcional dos idosos, não necessitar de gastos significativos, possuir fácil aplicação e montagem, minimizar riscos devido à natureza dos testes, envolver tarefas motoras similares às atividades diárias de idosos, aproximando os testes da sua vida cotidiana, passou por processo de validação e existem valores normativos para idosos brasileiros (BENEDETTI et al., 2007, GOBBI et al., 2005).

Desse modo, o resultado de cada teste motor obtido foi classificado de acordo com os valores normativos do Índice de Aptidão Funcional Geral (IAFG) desenvolvido por Zago e Gobbi (2003) para mulheres de 60 a 70 anos, por Benedetti et al., (2007) para mulheres de 70 a 79 anos e por Mazo et al., (2010) para homens de 60 a 69 anos, variando a pontuação (escore percentil) de cada teste motor de 0 a 100. A somatória da pontuação de cada teste foi utilizada para o cálculo do IAFG individual, variando de 0 a 500. Desta forma, foi possível classificar cada componente de aptidão funcional e também o IAFG de cada idoso. Todos os itens incluídos na bateria de testes da AAHPERD demonstraram boa confiabilidade e validade de critério para o uso neste grupo etário. Os coeficientes de confiabilidade teste-reteste para o item nesta bateria de testes têm sido relatados na faixa de $r = 0,80-0,99$ (OSNESS, W.H., 1989).

No entanto, devido a uma padronização adotada no laboratório, os grupos “muito bom” e “bom” foram agrupados em um único grupo, recebendo a

denominação de “bom”. O mesmo procedimento foi adotado para os grupos “fraco” e “muito fraco”, sendo atribuída a terminologia “fraco” para os respectivos participantes. Desta forma os participantes foram classificados em:

- **GRUPO G1:** *IAFG Fraco - 0 a 199;*
- **GRUPO G2:** *IAFG Regular - 200 a 299;*
- **GRUPO G3:** *IAFG Bom - 300 a 500.*

Tal procedimento foi necessário devido à baixa frequência de participantes encontrada nos grupos “muito bom” e “muito fraco” e, seguindo-se as orientações de Hollander e Wolf (2003) cada grupo deve conter pelo menos 10% do total de participantes em cada grupo para uma análise estatística adequada.

3.5.5 Avaliação bioquímica:

As amostras de sangue foram coletadas no período da manhã, após um jejum de 2hs pós-café da manhã, com a prévia orientação para se evitar alimentos ricos em nitrato (beterraba, espinafre, rúcula, dentre outros) no dia anterior. Uma enfermeira especializada neste tipo de coleta, utilizando materiais descartáveis, coletou 10 ml de sangue venoso por meio da veia antecubital. Esta amostra foi dividida em duas porções, sendo 5 ml destinados para extração do DNA e posteriormente para análise dos polimorfismos -786T>C, Intron 4 e 894G>T do gene da eNOS e dos polimorfismos M235T do Gene do Angiotensinogênio (AGT); D/I do Gene da ECA; A1166C Gene do Receptor AT1R da SRAA e, os outros 5ml, destinados para a determinação das concentrações de nitrito, metabólito estável do NO e para quantificação da atividade da ECA. Após a coleta, o sangue foi armazenado e mantido no freezer (-20°C) até o momento da extração.

Importante frisar que toda parte de análises laboratorial foi realizado em laboratórios parceiros como: o laboratório de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo sob a supervisão do Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos e do laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo sob a supervisão do Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos.

a) Extração de DNA

A extração do DNA a partir do sangue total foi realizado segundo as orientações do QIAamp DNA Mini Kit (número do catálogo 51154, Qiagen®, Alemanha). Resumidamente o procedimento se deu da seguinte forma: inicialmente foram misturados em tubos próprios e devidamente nomeados 200 µL do sangue total com a solução lise celular do kit, o que provocou a lise da membrana celular e nuclear, expondo o material genético. A seguir, essa solução foi movida para coluna sílica do Kit, a qual reteve o DNA e permitiu a passagem dos restos celulares. Posteriormente, foram realizadas lavagens com soluções do próprio Kit, a qual houve a eluição desse DNA com água ultrapura em um novo tubo que foi armazenado a -20°C.

b) Quantificação e qualificação do DNA

Com o objetivo de quantificar e verificar a qualidade do DNA extraído, todas as amostras foram analisadas em um espectrofotômetro (Nanodrop 1000, Thermo Scientific®, Estados Unidos), que fornece os dados de absorbância em 230, 260 e 280 nm após o carregamento de 2 µL de amostra sem diluição. Este aparelho emite luz nos comprimentos de onda citados, e ao mesmo tempo detecta quanto de luz foi absorvida pela amostra. No caso do DNA, há a absorção da luz no comprimento de 260 nm e o cálculo utilizado para a quantificação desse DNA foi:

$$[\text{DNA}] = \text{Absorbância em 260 nm} \times \text{fator de diluição} \times 50 \quad (\text{constante para o DNA})$$

A qualidade do DNA é expressa através da razão entre absorbância em 260 nm x 280 nm (A_{260}/A_{280}) a qual deve estar entre 1,8 e 2,1.

c) Genotipagem

A genotipagem foi realizada através do sistema *Taqman*® em termociclador (Viia7, Applied Biosystems®, Estados Unidos) por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, discriminando assim os diferentes genótipos para cada gene.

Para a discriminação dos genótipos dos genes -786T>C (rs 2070744) e 894G>T (rs 1799983) da eNOS e para os genes AGT (rs699) e o AT1R (rs 5186) do SRAA foram utilizados ensaios produzidos e validados pela empresa Applied

Biosystems®, com os seguintes números de catálogos respectivamente: C_15903863_10, C_3219460_10, C_1985481_20 e C_3187716_10.

Esses ensaios consistem na presença de quatro oligonucleotídeos, sendo eles: *primer Forward*, que vai da posição 5' para a posição 3' do DNA, *primer Reverse*, que vai da posição 3' para a posição 5' do DNA, e as Sondas, que também vão da posição 5' para a posição 3' do DNA.

Resumidamente, os *primers Forward e Reverse* flanqueiam a região do DNA que possui o polimorfismo, amplificando-a por meio da técnica de PCR. As sondas anelam exatamente na região do polimorfismo. A diferença é que uma delas possui as sequências de bases corretas e é marcada com o fluoróforo FAM. A outra sonda, marcada com fluoróforo VIC, possui praticamente as mesmas sequências de bases, exceto uma que caracteriza polimorfismo. A amplificação somente de fragmentos de DNA marcados com a sonda FAM, caracteriza que o indivíduo é "homozigoto ancestral" para determinado gene. A amplificação de fragmentos de DNA somente marcado com a sonda VIC, caracteriza o indivíduo como "homozigoto polimórfico" e, por fim, a amplificação de fragmentos de DNA de ambas as sondas, caracteriza o indivíduo como heterozigoto.

As amostras de DNA foram analisadas por *TaqMan® Genotyping Master Mix* (número do catálogo 4381656, Applied Biosystems®), o qual foi composto por 2 µL de DNA, 5 µL de *TaqMan® Genotyping Master Mix*, 0,5 µL *Primers* (8 µM) mais Sondas (2 µM) e 2,5 µL de água ultra pura resultando no volume final de 10 µL.

A análise foi realizada em termociclador (placa de 96 poços) tendo um ciclo de desnaturação e anelamento do DNA de: temperatura inicial de 95°C por 10 minutos para a ativação da Taq polimerase seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 s e 60° C por 1 minuto.

Para o polimorfismo VNTR no Íntron 4 (rs 61722009) utilizou-se os *primers* 5'- AGG CCC TAT GGT AGT GCC TTG - 3' (forward) e 5'-TCT CTT AGT GCT GTG GTC AC - 3' (reverse), na concentração final de 20 µL que incluiu aproximadamente 300 ng de DNA genómico, 0,25 µM de cada *primers*, 200 µM de cada dNTP, 2,5 µM de cloreto de magnésio, 1x de tampão de PCR e de 1U de DNA *Taq polimerase* (Promega, Madison, WI, EUA). As reações de PCR foram aquecidas a 94° C durante 4 minutos de desnaturação inicial e foram submetidos a 35 ciclos a 94° C durante 30 s para a desnaturação, 63° C por 30 s para anelamento, e 72° C durante 1 minuto de extensão. Um passo final de extensão foi conduzido a 72° C durante 4 minutos.

Foram gerados pelo PCR bandas/marcações de 393, 420 e 447 bp, que correspondem aos alelos do polimorfismo 4a, 4b e 4c, respectivamente. Os produtos foram separados por eletroforese em géis de poliacrilamida a 8% e visualizados por coloração prata, conforme exemplificado na figura 10 (LACCHINI et al., 2015, SILVA, P.S. et al., 2012, TANUS-SANTOS;DESAI; FLOCKHART, 2001).

Figura 10 - Fotografia do Gel de agarose da análise do Intron 4 da eNOS.

Para o gene da ECA (rs 1799752), duas reações de PCR foram realizadas para cada gene. Na primeira foram utilizados os oligos *Forward* GCCCTGCAGGTGTCTGCAGCATGT e *Reverse* GGATGGCTCTCCCCGCCTTGTCTC na concentração final de 0,8 μ M, 0,35 U de Taq Polimerase (Invitrogen, Estados Unidos da América), 1,3 mM de cloreto de magnésio, 0,2 mM de dNPTs e 50 ng de amostra com o seguinte ciclo de desnaturação e anelamento: 94°C por minutos e em seguida 40 ciclos de 94°C por 30s, 56°C por 55s e 72°C por 2 minutos com uma extensão final de 72°C por 7 minutos (Verit, Applied Biosystems®). Um gel de agarose 2% foi preparado e em seguida foi feita eletroforese a 100 V por uma hora em todas as amostras. Este gel foi corado com brometo de etídeo e exposto à luz ultravioleta, o que revelou bandas (marcações) de 319 pb para os sujeitos com genótipos DD e 597 pb para os sujeitos II e ambas marcações para aqueles genótipos ID. Por conta da preferência existente na amplificação do fragmento de 319 pb para aqueles com genótipos ID, uma segunda reação independente de PCR foi feita, a fim de discriminar corretamente os

sujeitos DD e ID. Para segunda reação os *primers forward* GGGACCACAGCGCCCGCCACTAC e *reverse* TCGCCAGCCCTCCCATGCCCATAA foram utilizados nas mesmas condições citadas anteriormente, salvo a temperatura de anelamento, que foi de 67°C. A figura 11 exemplifica o resultado desta análise.

Figura 11 - Fotografia do Gel de agarose da análise da ECA.

d) Inferência dos Haplótipos

Os haplótipos foram estimados usando a versão do programa FHASE 2.1 (<http://stephenslab.uchicago.edu/software.html#phase>). Sendo que os possíveis haplótipos do gene da eNOS incluindo os três polimorfismos estudado -786T>C, INTRON 4 e 894G>T foram TBG, TAG, TBT, TAT, CBG, CAG, CBT e CAT. E para os genes AGT, ECA e o AT1R do SRAA foram MIA, MIC, MDA, MDC, TIA, TIC, TDA e TDC. Haplótipos com frequências inferiores a 5% em qualquer grupo foram excluídos da análise estatística.

e) Determinação das concentrações plasmáticas de nitrito

As concentrações de nitrito foram medidas em triplicata, pelo método da quimioluminescência, que é um dos métodos mais sensíveis e precisos atualmente. Foi utilizado um analisador de NO (Sievers Model 280 NO Analyzer - Boulder, CO,

EUA), o qual permite medir NO em quantidades tão pequenas quanto 1 pmol. Resumidamente, a medida das concentrações de produtos da oxidação de NO (nitritos e nitratos) em amostras líquidas requer que estes produtos da oxidação do NO sejam reduzidos a NO (gás). As quantidades de NO produzidas são medidas após reação do NO com ozônio numa câmara do analisador de NO. Nesta câmara, a reação do NO com ozônio cria moléculas de NO₂ que, no seu estado excitado, emitem luz proporcionalmente às quantidades de NO liberada pela amostra. O analisador contém um detector de luz que transforma o sinal luminoso em sinal elétrico, que é finalmente convertido em sinal analógico e registrado. Desta forma, 50 µL de plasma será injetado em frasco contendo uma solução redutora (5 mL de ácido acético glacial, 2 mL de H₂O, 50 mg de iodeto de potássio e um pequeno cristal de I₂) que converte os nitritos em NO gás. O frasco será conectado a um fluxo contínuo do gás inerte (Hélio) que passa através da solução, “carregando” consigo o NO liberado em direção ao analisador de NO. Este quantifica o NO liberado, que tem correspondência estequiométrica com a quantidade de nitrito presente na amostra (PINHEIRO et al., 2012).

f) Quantificação da Atividade da ECA

Atividade plasmática da ECA foi determinada por ensaio fluorimétrico usando Hippuryl-His-Leu (Sigma) como substrato (FONTANA et al., 2012). Resumidamente, 10 de µL de plasma heparinizado foram incubadas com 210 µL de tampão Tris (Tris 20 mol / L / NaCl a 0,3 mol / L, pH 8,1) contendo Hip-His-Leu [1 mmol / L] a 37°C durante 20 minutos. A reação foi parada pela adição de NaOH a 0,5 mol / L (1 mL). Em seguida, 100 µL de OPA (o-phthaldialdehyde) foi adicionado e homogeneizado durante 4 minutos. Após a adição de HCl 6 mol / L (200 µl), a solução foi centrifugada a 3000 rpm durante 5 min e o sobrenadante foram colocadas em microplaca de 96 poços e a fluorescência foi detectada a 365 nm de excitação e 495 nm de emissão. As curvas padrão para His-Leu foram usadas para calcular a atividade da ECA (nmols / min / mL). Captopril (100 µmol/L) e enalaprilato (100 nmol / L) foram adicionados a algumas amostras de plasma e utilizados como controle positivo (FONTANA et al., 2012).

3.6 Análises Estatísticas

A distribuição dos genótipos para cada polimorfismo foi avaliada através do equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizando testes do Chi quadrado (χ^2) (StatView, Cary, NC, EUA). Para reduzir os graus de liberdade e aumentar o poder de nossa análise de haplótipos, foi excluída a priori haplótipos incomuns (haplótipo com frequência menor que 5%) da análise. Os dados foram relatados em média e desvio padrão, com nível de significância de $p < 0,05$.

Num segundo momento o teste kolmogorov-smirnov (KS) foi utilizado para verificação de normalidade da distribuição dos dados, análise descritiva apresentada em média e desvio padrão e posteriormente, análise de variância (ANOVA), utilizando o pós-teste de Tukey para os dados com distribuição normal e teste Kruskal-Wallis utilizando o pós-teste Dunns (quando necessário) quando não houve distribuição normal, tendo como variáveis independentes a classificação de HA e o nível de CF, considerando um nível de significância $p < 0,05$, utilizando o programa estatístico SPSS versão 20.0.

Ainda, foi utilizada a ferramenta Multifactor dimensionality reduction (MDR) um método de exploração de dados não paramétrico e independente de modelo genético, desenvolvido em resposta à necessidade por estratégias analíticas poderosas para detectar epistasia (Interação gene-gene) (MOORE, J.H., 2004, RITCHIE et al., 2001). Este avalia todas as combinações possíveis entre genótipos e classifica-os em alto ou baixo risco para doenças comuns e complexas através do cross-validation (CV), Training score e Training test. Aqui foi utilizado o MDR robusto: abordagem para caracterizar os modelos de interação entre os seis polimorfismos estudados no presente estudo com um limiar de α 0,05 (MDR: <http://www.epistasis.org/>). Foi considerado o modelo que teve a consistência máxima no Training Score e na consistência do cross-validation (CVC) como o melhor modelo de interação. Por fim, um teste de permutação foi realizado para determinar a significância estatística do melhor modelo.

4. RESULTADOS

Diante das possíveis influências que as variáveis de PA e o nível de CF poderiam exercer nos resultados deste estudo, optou-se por subdividir os participantes conforme tais variáveis. A tabela 2 apresenta as características dos participantes e comparações entre os grupos hipertensos e normotensos em média e desvio padrão.

Tabela 2 - Caracterização da amostra de acordo com o nível da pressão arterial (normotenso e hipertenso).

VARIÁVEIS	NORMOTENSOS (n=69)	HIPERTENSOS (n=86)	p-value
IDADE (anos)	66,59 ± 6,68	67,22 ± 6,97	0,572
SEXO			
FEMININO (N=133)	62	71	
MASCULINO (N=22)	7	15	
CAPACIDADE FUNCIONAL			
IAFG (pontos)	247,62 ± 105,06	223,78 ± 107,62	0,169
COORDENAÇÃO (s)	17,71 ± 13,73	18,83 ± 14,93	0,631
FLEXIBILIDADE (cm)	53,31 ± 16,06	49,54 ± 14,35	0,127
FORÇA MUSCULAR (rep)	22,95 ± 5,37	21,97 ± 5,53	0,269
AGILIDADE (s)	27,68 ± 8,68	30,04 ± 9,54	0,116
RESISTÊNCIA (s)	522,02 ± 80,48	542,65 ± 75,99	0,108
VO ₂ max (ml/kg/min)	28,49 ± 8,01	27,09 ± 8,01	0,298
DADOS ANTROPOMÉTRICOS			
IMC (Kg/m ²)	26,79 ± 3,98	29,29 ± 4,74*	0,001
RCQ	0,88 ± 0,09	0,91 ± 0,07*	0,007
PRESSÃO ARTERIAL			
PAS (mmHg)	117,05 ± 10,03	126,47 ± 13,20*	0,000
PAD (mmHg)	73,29 ± 7,70	79,01 ± 8,52*	0,000
BIOQUÍMICA SANGUÍNEA			
NO (mg/proteína)	0,54 ± 0,47	0,58 ± 0,42	0,567
ATIVIDADE DA ECA (nm/min/ml)	37,88 ± 14,89	33,16 ± 15,63	0,062

Valores expressos em média e desvio padrão sendo: IAFG: Índice de aptidão funcional geral; VO₂max: Volume de oxigênio máximo; IMC: Índice de massa corporal; RCQ: Relação cintura quadril; PAS: Pressão arterial sistólica; PAD: Pressão arterial Diastólica. NO: Óxido Nítrico; Atividade da Enzima conversora de angiotensina. p<0,05

Pode-se observar uma predominância de participantes do sexo feminino. Embora diferenças tenham sido apontadas para as variáveis antropométricas (IMC e RCQ), de forma geral, a caracterização da amostra se mostrou homogênea em relação às variáveis analisadas. Diferenças estatísticas também foram apontadas para a PA (PAS e PAD), fato que é coerente com a própria divisão dos grupos. No entanto nenhuma diferença foi encontrada entre as concentrações de NO e atividade da ECA entre os grupos normotensos e hipertensos.

A tabela 3 apresenta os dados de idade, antropometria, hemodinâmica, aptidão física e variáveis bioquímicas, subdividindo-se os participantes de acordo com o nível de CF avaliado por meio do IAFG. Pode - se observar que o grupo G3 foi diferente do G1 em relação à idade dos participantes, ou seja, os participantes do G3 eram mais jovens em relação ao G1. Em relação às variáveis hemodinâmicas, valores estaticamente significativos foram observados apenas a PAS, o qual G2 e G3 se comportaram diferentes em relação ao G1, indicando que os grupos com melhor CF possuem menor valores de PAS. Para o IAFG o G3 se mostrou diferente em relação ao G1 e G2, sendo coerente com a própria divisão entre os grupos. Ainda, o G3 foi diferente em relação G2 com relação às concentrações de NO, sugerindo que o grupo com um bom CF possui melhores níveis de óxido nítrico.

Tabela 3 - Apresentação das variáveis: idade, antropométrica, hemodinâmica, aptidão física e bioquímica em relação ao Índice de Aptidão Funcional Geral – IAFG.

VARIÁVEIS	G1	G2	G3	P - value
IDADE (anos)	69,10 ± 6,97	66,83 ± 5,64	64,14 ± 6,70 a	0,001
IMC (Kg/m ²)	29,18 ± 4,92	27,57 ± 4,65	27,36 ± 3,79	0,068
PAS (mmHg)	125,79 ± 14,03	119,91 ± 11,72 a	119,71 ± 10,85 a	0,015
PAD (mmHg)	78,54 ± 8,00	74,54 ± 9,25 a	75,42 ± 8,43	0,037
IAFG (pontos)	126,69 ± 44,57	246,58 ± 35,12	362,83 ± 39,54 a b	0,000
NO (mg proteína)	0,54 ± 0,45	0,42 ± 0,25	0,71 ± 0,52 b	0,009
ATIVIDADE DA ECA (nm/min/ml)	35,72 ± 15,89	37,31 ± 17,04	32,75 ± 13,19	0,368

Valores expressos em média e desvio padrão sendo: IMC: Índice de massa corporal; PAS: Pressão arterial sistólica; PAD: Pressão arterial Diastólica. IAFG: Índice de aptidão funcional geral; NO: Óxido Nítrico mg/proteína; Atividade da Enzima conversora de angiotensina (nm/min/ml). Siglas: a p<0,05 comparada ao G1; b p<0,05 comparada ao G2.

Com relação aos resultados dos polimorfismos avaliados, a tabela 4 apresenta a distribuição dos alelos, genótipos e haplótipos para os genes da eNOS em relação aos idosos normotensos e hipertensos.

Tabela 4 - Distribuição dos genótipos, alelos e haplótipos para o gene da eNOS em idosos normotensos e hipertensos.

	NORMOTENSO (n = 69)	HIPERTENSO (n=86)	P-value	Odds Ratio (95%CI)
Genótipos/Alelos				
g.-786T>C				
TT	0,41 (28)	0,36 (31)	-	1,00 (Referência)
TC	0,38 (26)	0,52 (45)	0,211	1,56 (0,77 to 3,15)
CC	0,21 (15)	0,12 (10)	0,293	0,60 (0,23 to 1,55)
	$\chi^2= 4,42$	$P= 0,09$		
T	0,59 (82)	0,62 (107)	-	1,00 (Referência)
C	0,41 (56)	0,38 (65)	0,616	0,88 (0,56 to 1,40)
	$\chi^2= 0.25$	NS		
Intron 4				
4b4b	0,64 (44)	0,56 (48)	-	1,00 (Referência)
4a4b	0,38 (22)	0,38 (33)	0,355	1,37 (0,69 to 2,70)
4a4a	0,04 (3)	0,06 (5)	0,574	1,52 (0,34 to 6,77)
	$\chi^2= 1,02$	$P=0,600$		
4b	0,79 (110)	0,75 (129)	-	1,00 (Referência)
4a	0,21 (28)	0,25 (43)	0,326	1,31 (0,76 to 2,24)
	$\chi^2=0,96$	NS		
g. 894G>T				
GG	0,49 (34)	0,55 (47)	-	1,00 (Referência)
GT	0,38 (26)	0,38 (33)	0,804	0,91 (0,46 to 1,80)
TT	0,13 (9)	0,07 (6)	0,197	0,48(0,15 to 1,48)
	$\chi^2= 1,67$	$P=0,433$		
G	0,68 (94)	0,74 (127)	-	1,00 (Referência)
T	0,32 (44)	0,26 (45)	0,268	0,75 (0,46 to 1,24)
	$\chi^2= 1,22$	NS		
Haplótipos				
TBG	0,47 (65)	0,46 (79)	-	1,00 (Referência)
TBT	0,06 (9)	0,04 (7)	0,569	0,68 (0,18 to 2,57)
TAG	0,06 (8)	0,12 (21)	0,181	2,04 (0,70 to 5,90)
CBT	0,25 (34)	0,22 (37)	0,766	0,89 (0,44 to 1,81)
CAG	0,14 (19)	0,12 (21)	0,765	0,87 (0,36 to 2,09)
HAPLÓTIPOS EXCLUÍDOS	0,02 (3)	0,04 (7)	-	-
	$\chi^2= 2,73$	$P=0,603$		

As frequências e o número bruto de participantes são mostradas em % (n); CI: 95% de intervalo de confiança; P-value foi considerado significativo quando <0,05 (genótipos / alelos / haplótipos).

Para o polimorfismo -786T>C foi observado uma maior frequência do alelo (T) para grupo normotenso (59%) comparado ao grupo hipertensos (62%). Quanto ao genótipo, o homozigoto ancestral (TT) obteve a maior frequência (41%) no grupo normotenso e para o grupo hipertenso, o genótipo heterozigoto (TC) obteve maior frequência (52%) Para o polimorfismo do INTRON 4 as maiores frequências foram observadas para o alelo (4b), 79% para o grupo normotenso e 75% para o grupo hipertenso e com relação ao genótipo, o homozigoto ancestral (4b4b) também foram mais frequentes tanto para o grupo de idosos normotensos (64%) quanto para os hipertensos (56%). Ainda, pode se observar a mesma característica para o polimorfismo 894G>T que possuem suas maiores frequências no alelo G (68% para o grupo normotenso e 74% para o hipertenso) e no genótipo homozigoto ancestral (GG) para ambos os grupos (49% e 55% respectivamente). Com relação aos haplótipos, o que obteve maior predomínio em ambos os grupos foi o TBG, homozigoto ancestral, com 47% e 46% respectivamente. Ainda, com relação às informações sobre o risco de ter a doença HA, pode-se notar que para os polimorfismos do gene da eNOS não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos três polimorfismos -786T>C, INTRON4 e 894G>T quando analisado os alelos, os genótipos e os haplótipos (associação de polimorfismos). Indicando a princípio que para a população desse estudo os polimorfismos da eNOS não estão sendo um fator determinante para a HA. Posteriormente, na tabela 6, serão descritas os resultados com relação aos fatores humorais.

Já em relação à distribuição dos polimorfismos do SRAA (tabela 5) para o polimorfismo do AGT encontrou-se uma maior frequência para o alelo ancestral (M) tanto para o grupo normotenso (56%) quanto para o hipertenso (54%), sendo que para o genótipo encontrou-se uma maior frequência para o genótipo heterozigoto (MT) para ambos os grupos (56% e 49% respectivamente). Para o polimorfismo da ECA foi observado uma maior frequência do alelo (D) para o grupo normotenso (57%) para o grupo hipertenso (49%). Para o genótipo, observou-se um predomínio do genótipo heterozigoto (ID) para os dois grupos, sendo 51% para os normotensos e 52% para os hipertensos. E para o polimorfismo do ATR1 os dois grupos obtiveram as maiores frequência do alelo ancestral (A), sendo 79% deste estavam no grupo normotenso e 74% no grupo hipertenso. Ocorrendo também um maior predomínio do genótipo homozigoto ancestral em ambos os grupos (64% e 65% respectivamente).

Tabela 5 - Distribuição dos genótipos, alelos e haplótipos para o gene da SRAA em idosos normotensos e hipertensos.

	NORMOTENSO (n = 69)	HIPERTENSO (n=86)	P-value	Odds Ratio (95%CI)
Genótipos/Alelos				
AGT				
MM	0,28 (19)	0,29 (25)	-	1,00 (Referência)
MT	0,56 (39)	0,49 (42)	0,594	0,81 (0,39 to 1,71)
TT	0,16 (11)	0,22 (19)	0,575	1,31 (0,50 to 3,40)
	$\chi^2= 1,21$	P=0,545		
M	0,56 (77)	0,54 (92)	-	1,00 (Referência)
T	0,44 (61)	0,46 (80)	0,685	1,09 (0,69 to 1,72)
	$\chi^2=0,16$	NS		
ECA				
II	0,17 (12)	0,24 (21)	-	1,00 (Referência)
ID	0,51 (35)	0,52 (45)	0,468	0,73 (0,31 to 1,69)
DD	0,32 (22)	0,24 (20)	0,166	0,51 (0,20 to 1,32)
	$\chi^2= 1,95$	P=0,375		
I	0,43 (59)	0,51 (87)	-	1,00 (Referência)
D	0,57 (79)	0,49 (85)	0,170	0,72 (0,46 to 1,14)
	$\chi^2=1,88$	NS		
AT1				
AA	0,64 (44)	0,65 (56)	-	1,00 (Referência)
AC	0,30 (21)	0,30 (26)	0,938	0,97 (0,48 to 1,95)
CC	0,06 (4)	0,05 (4)	0,742	0,78 (0,18 to 3,32)
	$\chi^2= 0,10$	P=0,94		
A	0,79 (109)	0,74 (138)	-	1,00 (Referência)
C	0,21 (29)	0,26 (34)	0,786	0,92 (0,53 to 1,61)
	$\chi^2= 0,07$	NS		
Haplótipos				
MIA	0,31 (43)	0,16 (27)	-	1,00 (Referência)
MDA	0,14 (20)	0,33 (57)	0,0004***	4,56 (1,91 to 10,89)
MDC	0,09 (12)	0,01 (3)	0,306	0,43 (0,08 to 2,23)
TIA	0,10 (13)	0,20 (34)	0,005**	3,87 (1,46 to 10,22)
TIC	0,01 (1)	0,12 (20)	0,0001***	38,75 (4,75 to 315,7)
TDA	0,24 (33)	0,12 (21)	0,946	0,96 (0,38 to 2,42)
TDC	0,10 (14)	0,03 (6)	0,451	0,58 (0,13 to 2,41)
HAPLÓTIPOS EXCLUÍDOS	0,01 (2)	0,02 (4)	-	-
	$\chi^2=37,33$			
	P= 0,0001***			

As frequências e o número bruto de participantes são mostradas em % (n); CI: 95% de intervalo de confiança; P-value foi considerado significativo quando <0,05 (genótipos / alelos / haplótipos).

Com relação aos haplótipos foi observada a maior frequência para o haplótipo homozigoto ancestral para todos os polimorfismos MIA (31%) para o grupo normotenso e para o grupo hipertenso observou-se que o haplótipo MDA (33%) obteve a maior frequência. Os polimorfismos do SRAA (AGT, ECA e AT1) apresentados na tabela 5 também não obtiveram resultados significativos em relação ao risco para HA nos alelos e genótipos, porém, ao analisar seus haplótipos observou-se resultados estatisticamente significativos dos haplótipos MDA, TIA e TIC indicando que os participantes que possuem essas combinações possuem um risco aumentado de desenvolver a HA. Posteriormente (tabela 7) serão descritas os resultados com relação aos fatores humorais.

Já as tabelas 6 e 7 apresentam os alelos, genótipos e haplótipos dos polimorfismos da eNOS e dos polimorfismos do SRAA respectivamente, e as concentrações humorais (NO e ECA) e os valores bruto do IAFG dos idosos normotensos e hipertensos. Observa - se que não houve diferenças significativas em nenhuma das tabelas, no entanto é importante notar que os valores de IAFG estão muito homogêneo, classificados em nível de condicionamento físico regular, ocorrendo basicamente o mesmo com as concentrações de NO e atividade da ECA. A população possui basicamente a mesma característica em relação ao nível de CF, podendo assim justificar a ausência de diferenças em relação às concentrações humorais (NO e ECA).

Na tabela 8 verificou-se a influência que os diferentes níveis de CF poderiam exercer na população, com haplótipos MDA, TIA e TIC, o qual foi identificado risco aumentado de desenvolver hipertensão arterial conforme indicado na Tabela 5. Considerando o nível de condicionamento físico (G1 - fraco; G2 - regular; G3 - bom) apenas para a população com haplótipos de risco, foram observadas diferenças significativas entre G1 e G3 em relação à PAS e PAD e entre G2 e G3 para a atividade da ECA. Este resultado sugere que a manutenção de bons níveis de CF proporcionou menores valores de PA e da atividade da ECA, fato que pode ser considerado benéfico para o idoso.

Tabela 6 - Genótipos, alelos e haplótipos para o gene da eNOS, concentração do óxido nítrico e valores bruto do índice de aptidão funcional geral em idosos normotensos e hipertensos.

	Normotenso (n = 69)		Hipertenso (n = 86)	
	[NO]	IAFG	[NO]	IAFG
Genótipos/Alelos				
<i>g.-786T>C</i>				
TT	0,55 ± 0,35	230,89 ± 106,00	0,56 ± 0,52	202,67 ± 104,70
TC	0,58 ± 0,66	261,81 ± 101,12	0,58 ± 0,33	224,69 ± 115,44
CC	0,54 ± 0,47	254,23 ± 112,71	0,65 ± 0,46	264,80 ± 87,22
T	0,55 ± 0,35	230,89 ± 106,00	0,56 ± 0,52	202,67 ± 104,70
C	0,53 ± 0,54	259,04 ± 104,17	0,59 ± 0,35	231,98 ± 111,22
<i>Intron 4</i>				
4b4b	0,49 ± 0,37	237,44 ± 95,83	0,56 ± 0,34	193,83 ± 107,20
4a4b	0,65 ± 0,63	267,74 ± 118,38	0,61 ± 0,53	260,50 ± 101,03
4a4a	0,34 ± 0,02	249,36 ± 154,81	0,60 ± 0,38	228,24 ± 122,38
4b	0,49 ± 0,37	237,44 ± 95,83	0,56 ± 0,34	193,83 ± 107,20
4a	0,62 ± 0,61	265,53 ± 119,56	0,61 ± 0,50	256,26 ± 102,81
<i>g. 894G>T</i>				
GG	0,54 ± 0,42	251,69 ± 112,25	0,51 ± 0,27	219,20 ± 112,80
GT	0,57 ± 0,57	253,92 ± 107,54	0,63 ± 0,53	210,87 ± 101,78
TT	0,43 ± 0,32	214,00 ± 65,10	0,83 ± 0,57	296,81 ± 108,64
G	0,54 ± 0,42	251,69 ± 112,25	0,51 ± 0,27	219,20 ± 112,80
T	0,53 ± 0,52	243,66 ± 99,06	0,66 ± 0,53	224,09 ± 106,13
<i>Haplótipos</i>				
TBG	0,56 ± 0,51	250,48 ± 110,98	0,59 ± 0,38	218,29 ± 114,69
TBT	0,56 ± 0,41	282,00 ± 126,19	0,36 ± 0,19	296,25 ± 23,17
TAG	0,58 ± 0,47	248,83 ± 104,23	0,64 ± 0,57	207,13 ± 99,46
CBT	0,34 ± 0,12	221,50 ± 83,28	0,53 ± 0,18	234,44 ± 123,36
CAG	0,19 ± 0,00	170 ± 0,00	0,38 ± 0,02	253,00 ± 109,21

[NO] Concentração de óxido nítrico plasmático e o IAFG (Índice de aptidão funcional geral) estão descritos em média e desvio padrão para os grupos normotensos e hipertensos em relação polimorfismo.

Tabela 7 - Genótipos, alelos e haplótipos para o gene da SRAA, concentração do óxido nítrico e valores bruto do índice de aptidão funcional geral em idosos normotensos e hipertensos.

	Normotenso (n = 69)		Hipertenso (n = 86)	
	ATIVIDADE DA ECA	IAFG	ATIVIDADE DA ECA	IAFG
Genótipos/Alelos				
AGT				
MM	38,43 ± 17,24	286,89 ± 88,96	34,42 ± 14,47	237,85 ± 109,49
MT	38,50 ± 14,15	221,28 ± 94,26	29,69 ± 13,53	208,35 ± 101,82
TT	34,56 ± 13,83	273,16 ± 143,84	39,26 ± 19,64	228,68 ± 126,10
M	38,43 ± 17,24	286,89 ± 88,96	34,42 ± 14,47	237,85 ± 109,49
T	37,66 ± 14,03	232,69 ± 107,63	32,64 ± 16,15	214,68 ± 109,29
ECA				
II	27,98 ± 11,50	254,77 ± 110,50	33,74 ± 14,64	239,58 ± 132,93
ID	39,61 ± 13,16	260,61 ± 111,72	32,25 ± 15,53	205,05 ± 100,41
DD	40,27 ± 17,43	223,04 ± 90,51	34,65 ± 17,34	236,18 ± 100,41
I	27,98 ± 11,50	254,77 ± 110,50	33,74 ± 14,64	239,58 ± 132,93
D	39,86 ± 14,78	246,11 ± 104,84	32,99 ± 10,02	215,55 ± 100,88
ATR1				
AA	35,46 ± 13,95	248,42 ± 109,31	34,79 ± 16,63	213,00 ± 109,17
AC	40,10 ± 12,60	238,63 ± 103,82	29,91 ± 13,48	242,57 ± 109,78
CC	52,20 ± 27,38	286,00 ± 67,23	30,62 ± 13,00	201,75 ± 115,34
A	35,46 ± 13,95	248,42 ± 109,31	34,79 ± 16,63	213,00 ± 109,17
C	42,11 ± 15,82	246,21 ± 105,06	30,01 ± 13,19	237,13 ± 109,39
Haplótipos				
MIA	35,20 ± 23,31	282,40 ± 96,42	30,40 ± 15,57	220,15 ± 117,83
MDA	39,07 ± 13,44	246,57 ± 92,53	34,58 ± 15,55	172,50 ± 97,38
MDC	44,03 ± 4,41	283,16 ± 96,11	35,94 ± 16,69	285,28 ± 87,07
TIA	35,04 ± 11,16	230,81 ± 125,72	31,86 ± 16,47	216,73 ± 125,14
TIC	37,12 ± 14,55	216,08 ± 103,41	35,52 ± 5,30	201,20 ± 95,47
TDA	39,90 ± 16,41	215,11 ± 122,81	34,42 ± 18,12	255,75 ± 106,72
TDC	31,15 ± 15,54	308,70 ± 129,45	31,50 ± 18,97	167,00 ± 59,12

[NO] Concentração de óxido nítrico plasmático e o IAFG (Índice de aptidão funcional geral) estão descritos em média e desvio padrão para os grupos normotensos e hipertensos em relação polimorfismo.

Tabela 8 - Apresentação das variáveis: hemodinâmica e bioquímica em relação ao Índice de Aptidão Funcional Geral – IAFG da população de risco para desenvolver HA.

VARIÁVEIS	G1 (n=74)	G2 (n=33)	G3 (n=38)	p-value
PAS (mmHg)	127,14 ± 14,47	122,59 ± 13,83	120,42 ± 10,84 a	0,033
PAD (mmHg)	79,81 ± 8,04	76,81 ± 10,49	74,56 ± 8,73 a	0,023
ATIVIDADE DA ECA (nm/min/ml)	32,86 ± 15,35	36,73 ± 15,97	28,38 ± 12,52 b	0,050

Valores expressos em média e desvio padrão sendo: PAS: Pressão arterial sistólica; PAD: Pressão arterial Diastólica. Atividade da Enzima conversora de angiotensina (nm/min/ml). $p < 0,05$. Siglas: a $p < 0,05$ comparada ao G1; b $p < 0,05$ comparada ao G2.

Na tentativa de verificar se existe associação/interação entre polimorfismos de sistemas distintos, como os do sistema vasodilator (eNOS - 786T>C, INTRON4 e 894G>T) e do vasoconstritor (SRAA - AGT, ECA, ATR1) afim de analisar o risco de ser hipertenso na população idosa, optou-se por utilizar o MDR, abordagem que reconhece a complexidade da relação entre genótipo e fenótipo, caracterizado por uma heterogeneidade significativa e por interações gene-gene e gene-ambiente (MOORE, J.H., 2010).

Para este modelo foi considerado dois grupos, idosos normotensos e idosos hipertensos (controlados e não controlados). Porém os resultados obtidos para as possíveis combinações não foram estatisticamente significativos para nenhuma das combinações, observando-se apenas uma tendência ao risco entre o polimorfismo da eNOS, o -786T>C e o polimorfismo AGT do SRAA. Sugerindo que esses dois polimorfismos, mesmo estando em sistemas diferentes poderiam atuar de forma concomitante como fator de risco para HA.

Desta forma, foi realizado um filtro no banco de dados do estudo deixando apenas os genótipos dos polimorfismos dos genes eNOS (-786T>C) e AGT (M235T), avaliando-se a interação destes em relação aos grupos hipertenso e normotenso. Notou-se neste modelo, uma pontuação (*Training score*) de 0,63, uma precisão do teste (*Training test*) de 0,61 e uma consistência de validação cruzada (*cross-validation consistency*) do 10/10, revelando uma interação estatisticamente significativa ($p = 0.0235$) para ambos os genótipos, apresentada na tabela 9.

Tabela 9 - Modelo de interação entre polimorfismos dos genes *eNOS* (-786T>C) e *AGT* (M235T) em hipertensos comparados a normotensos obtido pelo método MDR.

Modelo de Interação	Training score	Testing score	CVC	P
<i>eNOS</i> (-786T>C)	0.5736	0.5472	10/10	0.3600
<i>AGT</i> (M235T); <i>eNOS</i> (-786T>C)	0.6375	0.6139	10/10	0.0235*

Abreviações: *AGT*, angiotensinogênio; *CVC*, *cross-validation consistency*; *MDR*, *Multifactor Dimensionality Reduction*; *eNOS*, sintase endotelial do óxido nítrico. *P após 1.000 permutações.

A figura 12 ilustra cada uma das combinações entre os diferentes genótipos dos polimorfismos dos genes *eNOS* (-786T>C) e *AGT* (M235T). Células sombreadas em cinza-escuro são consideradas combinações de alto risco para hipertensão. Células sombreadas em cinza-claro são consideradas combinações de baixo risco, ou seja, mais frequentes em normotensos.

Figura 12 - Interações entre polimorfismos no modelo significativo da Tabela 2. As distribuições de hipertensos (barras da esquerda) e normotensos (barras da direita) são ilustradas para cada uma das combinações entre os diferentes genótipos dos polimorfismos dos genes *eNOS* (-786T>C) e *AGT* (M235T). Células sombreadas em cinza-escuro são consideradas combinações de alto risco para hipertensão. Células sombreadas em cinza-claro são consideradas combinações de baixo risco, ou seja, mais frequentes em normotensos.

Contudo, o genótipo MM do SNP AGT_M235T associado aos genótipos do SNP -786T>C do gene eNOS, estão mais frequentes nos hipertensos, dos genótipos TC e CC, ou seja, os idosos com essas características estão mais propensos a desenvolver HA, pois possuem o alelo mutado (C) e fazem parte do grupo de alto risco. Também houve interação de baixo risco com os normotensos (TT), possivelmente pela ação do NO de acordo com estudos previamente publicados em nosso laboratório (SILVA, R.F. et al., 2014).

Além disso, a combinação entre os genótipos TT do AGT_M235T e TT do eNOS -786T>C foi associada com hipertensos, indicando que o TT do AGT_M235T esteja atuando com maior predomínio nesse caso especificamente.

5. DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi investigar de forma integrada a associação dos polimorfismos dos sistemas da eNOS e do SRAA no controle da PA de idosos hipertensos e normotensos e, como esta relação pode ser modulada pelo nível de CF. De acordo com os achados do estudo de modo geral o IAFG é a variável que parece exercer maior influência nos valores de antropométrico, hemodinâmicos e bioquímicos.

Os dados da tabela 1 apresentam a caracterização dos participantes e a comparações entre os grupos normotensos e hipertensos. Notou-se que os grupos são diferentes em relação à PA, o que é coerente com a proposta do estudo que visa estudar as diferenças entre os grupos. Também foram encontradas diferenças, embora discretas, nas variáveis antropométricas sendo que idosos hipertensos possuem maior IMC e RCQ comparado aos idosos normotensos. Corroborando com os achados de Gonçalves et al., (2014) o qual o IMC elevado esteve proporcionalmente mais presente entre os hipertensos (63,4%) que entre os normotensos (46,7%), bem como nas variáveis de atividade física (82,9% não praticavam entre os hipertensos, contra 75% dos que não praticavam entre os normotensos), bem como a presença de doenças crônicas (65,9% contra 61,7%). Indicando que os hipertensos possuem um estilo de vida que favorece níveis mais elevados destas variáveis. Ainda, a Sociedade Brasileira de Hipertensão (2013) mostra uma relação entre os altos níveis pressóricos com os elevados índices de IMC e RCQ, corroborando com este estudo.

Interessante notar também que houve um predomínio de mulheres (133) na amostra em relação aos homens (22) embora a ferramenta estatística não tenha identificado diferenças entre eles, o estudo de Trapé et al., (2013) realizado com adultos e idosos apresentou que esse predomínio se dá por causa de que as mulheres aderem melhor e mais a programas sociais, comunitários e supervisionados de exercício físico ao contrário dos homens e ainda, existe um menor cuidado com a saúde por parte destes, justificando a menor adesão de homens em pesquisas da área da saúde.

Embora o nível de CF tenha sido avaliado por duas ferramentas distintas, a bateria de testes da AAPHERD com cálculo do IAFG e o teste ergométrico

mensurando o VO_{2max} , o IAFG foi escolhido para representar o CF dos participantes. O protocolo de avaliação do VO_{2max} foi realizada sem interrupção do uso de medicamentos, inclusive os betabloqueadores, o que podem comprometer os resultados desse teste. Sendo assim, optou-se por utilizar o IAFG como variável de CF, pois representa uma avaliação multicomponente e por ter demonstrado recentemente uma boa correlação com o VO_{2max} ($r=0,8$ / $p<0,01$) (TRAPE et al., 2013).

A tabela 2 apresenta associações entre o nível de condicionamento físico (IAFG) e variáveis relacionadas à saúde cardiovascular e foram observadas diferenças nos grupos quanto aos diferentes níveis de CF para idade, PAS, PAD, IAFG e NO, sendo que os grupos com nível de CF mais elevados (G3) apresentaram melhores resultados quando comparado aos níveis mais baixos (G1 e G2). Esses resultados sugerem uma relação mais forte entre o IAFG e as variáveis relacionadas aos fatores de risco para DCVs, mostrando que o IAFG, obtido por uma bateria de testes, pode ser uma alternativa coerente quando se almeja estabelecer tais associações. Novos estudos reforçam essa ideia e frisam a importância de manter bons níveis de CF relacionada à prática de componentes múltiplos de exercício físico no controle do desenvolvimento da HA e DCV em adultos e idosos (JACOMINI, 2015, SILVA, R.F. et al., 2014, TRAPÉ et al., 2015).

Tanto os idosos normotensos quanto os hipertensos apresentaram características genéticas bastante semelhante em relação aos polimorfismos da eNOS (-786T>C, INTRON 4 e 894G>T), pois foi observado uma maior frequência de alelos, genótipos e haplótipos homozigoto ancestral (aqueles classificados como “NORMAL”) tanto no grupo normotenso quanto para o grupo hipertenso. Havendo apenas uma exceção na frequência do grupo hipertenso no polimorfismo -786T>C, o qual sua maior frequência foi do genótipo heterozigoto (TC). A literatura mostra que grupos hipertensos possuem maior incidência de genótipos e/ou haplótipos com alelos mutados e ou heterozigoto, sendo estes os responsáveis por um maior risco de se obter HA. Estudos mostram que os polimorfismos do gene da eNOS estão associado a HA e a algumas DCVs supostamente devido uma menor produção e/ou biodisponibilidade de NO (ABDEL-AZIZ; MOHAMED, 2013, SUNG et al., 2015, YANG et al., 2014). Porém o estudo de Silva et al., (2014) enfatiza que mesmo existindo a deficiência na produção do vasodilatador (NO), manter bons níveis de CF pode ser benéfico ao indivíduos. Particularmente em indivíduos que são portadores

do alelo C do polimorfismo -786T>C, combinado com alelo ASP do polimorfismo 894G>T, resultando em um aumento nas concentrações de NO plasmático, que pode refletir em uma melhor concentração deste em adultos e idosos normotensos.

Quanto aos polimorfismos do SRAA observou-se um predomínio de genótipos heterozigoto tanto para grupo normotenso quanto para o hipertenso com exceção do polimorfismo AT1 em que o predomínio para ambos os grupos foi para o genótipo homozigoto ancestral. Ao analisar os genótipos e alelos não foram observadas diferenças significativas em relação ao risco a HA, porém ao analisar seus haplótipos observou-se resultados estatisticamente significativos dos haplótipos mais frequentes do grupo hipertenso (MDA, TIA e TIC) indicando que os participantes que possuem essas combinações possuem um risco aumentado de desenvolver a HA.

A relação desses polimorfismos do SRAA com HA ainda não está bem definida na literatura, alguns estudos apresentam associações desses polimorfismos com a HA e DCVs (AGACHAN et al., 2003, FIROUZABADI et al., 2013, MIAO; GONG, 2015), enquanto outros não (FREITAS et al., 2007). Por exemplo, o estudo de Freitas et al., (2007) realizado no Brasil com 160 participantes não encontrou a associação entre os polimorfismos M235T do angiotensinogênio, I/D da ECA e o A1166C do receptor AT1 da Angiotensina II e HA .

Por outro lado, o estudo de Agachan et al., (2003) realizado na Turquia com 194 participantes encontrou associação com o genótipo TT do polimorfismo M235T do angiotensinogênio, com o alelo D do polimorfismo I/D da ECA e ainda, mostrou que os genótipos AC + CC foram mais frequentes nos hipertensos do que nos normotensos quando investigaram a associação entre o polimorfismo A1166C do receptor AT1 da Angiotensina e HA.

Nos achados do presente trabalho ao investigar os polimorfismos AGT, ECA e AT1 separadamente também como alguns estudos, não encontramos associação em relação a HA, porém ao investigarmos o comportamento da presente população em relação aos haplótipos dos genes do SRAA, MDA, TIA e TIC, notou-se uma associação, indicando risco a HA. Contudo, no rol da literatura, não foi encontrado explicações a cerca deste achado. Evidenciando a importância de novos estudos que relacione haplótipos dos genes do SRAA e HA.

Ainda, ao relacionar e caracterizar alelos, genótipos e haplótipos dos polimorfismos da eNOS e do SRAA respectivamente, as concentrações humorais

(NO e ECA) e os valores bruto do IAFG dos idosos normotensos e hipertensos observou-se nas tabelas 7 e 8 que não houve diferenças significativas em nenhuma variável, pois os valores de IAFG estão muito homogêneo, classificados em nível de CF regular, ocorrendo basicamente o mesmo com as concentrações de NO e atividade da ECA. A população desse estudo possui basicamente a mesma característica em relação ao nível de CF, talvez essa seja a explicação para não ter sido observado diferenças em relação às concentrações humorais.

O presente estudo também verificou qual a influência que os diferentes níveis de CF poderiam exercer na população com características genéticas, haplótipos dos genes do SRAA (MDA, TIA e TIC), os quais possuem um risco aumentado de desenvolver a HA. E foi observado uma redução dos valores de PA e da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) nesse grupo. Indicando que a manutenção de bons níveis de CF proporcionou menores valores de PA e da atividade da ECA, fato que pode ser considerado benéfico para o idoso. Está mais que provada na literatura os benefícios oriundos da prática do exercício físico na redução da PA após o exercício em idosos hipertensos (NOGUEIRA et al., 2012). O fator inovador deste resultado é que idosos hipertensos com características genéticas (haplótipos) que privilegia o aumento da atividade da ECA, ou seja, que gera maior vasoconstrição nos mecanismos humorais de controle da PA consigam ser moduladas pelo nível de CF.

E por fim, com a necessidade de investigar a interação entre os polimorfismos do gene da eNOS e dos genes do SRAA análises de MRD foram utilizadas para identificar possíveis combinações/interações genéticas que poderiam estar associados ao risco a HA entre os diferentes sistemas. Dentre os quatro genes estudados no presente estudo foi encontrado um modelo de interação significativo entre o gene eNOS (-786T>C) e AGT em hipertensos comparados a normotensos obtidos pelo método MDR. Esse achado revelou que o genótipo MM do SNP AGT_M235T associado aos genótipos do SNP -786T>C do gene eNOS, estão mais frequentes nos hipertensos, dos genótipos TC e CC, ou seja, os idosos com essas características estão mais propensos a desenvolver HA, pois possuem o alelo mutado “C” e fazem parte do grupo de alto risco. Também houve interação de baixo risco com os normotensos (TT), possivelmente pela ação do NO. Além disso, a combinação entre os genótipos TT do AGT_M235T e TT do eNOS -786T>C foi associada com hipertensos, a despeito da “maior produção de NO” referente ao alelo

T da eNOS_-786T>C, indicando que o TT do AGT_M235T esteja atuando com maior predomínio nesse caso especificamente. No estudo de Yugar-Toledo et al., (2011) utilizando o mesmo método avaliou a interação entre os genes do AGT, da ECA do SRAA e o 894G>T da eNOS em relação aos fatores ambientais (sexo, idade, IMC, glicemia, colesterol total, lipoproteína de baixa densidade colesterol, lipoproteína de alta densidade colesterol, triglicerídeos, taxa de filtração glomerular e excreção urinária de sódio) em 70 pacientes hipertensos resistente e 70 normotensos. E mostrou que os portadores de o alelo AGT obtiveram maior risco de hipertensão resistente, especialmente quando tinham mais de 50 anos. Corroborando com os resultados do presente estudo em relação à interação entre genes de diferentes sistemas, porém associados ao risco de HA.

Ainda, pesquisa realizada na Bulgária realizada com 171 pacientes com DCVs e 123 controles investigou a associação entre o gene da eNOS, 894G>T e os genes do SRAA, o AGT, ECA e receptor AT1 e os resultados observados foi uma associação entre o alelo T da eNOS e o alelo D do gene da ECA foram mais propensos a desenvolver DCVs, ocorrendo o mesmo ao fazer uma avaliação exploratória de interação gene-gene. Indicando que essa população específica com as características acima possuem um alto risco para o desenvolvimento das DCVs (MOKRETAR et al., 2016).

6. LIMITAÇÃO DO ESTUDO

É importante destacar que dentre as limitações do presente trabalho, está o delineamento do estudo (transversal) o qual não permite estabelecer relações temporais de causa e efeito, somente de associação entre os resultados.

Os participantes não foram selecionados exclusivamente de forma aleatória, sendo esses, recrutados apenas na cidade de Bauru-SP. Não houve estratificação por sexo ou por idade (a distribuição foi feita de acordo com a doença, ser ou não hipertenso).

Apesar do cálculo amostral indicar um “N” amostral de 150 participantes, é possível que este N não tenha sido suficiente para responder todas as perguntas realizadas nesse estudo.

Também não foi feito o controle alimentar e do uso de medicamentos que pudessem influenciar em algumas variáveis.

O fato de não termos o acompanhamento médico na avaliação do teste ergométrico que foi realizado em esforço submáximo (75%), além de alguns participantes fazerem uso de medicamentos de ação central, o que pode ter superestimado a avaliação da esteira que é baseada na frequência cardíaca.

A relação dos níveis de CF com os polimorfismos e suas consequências ainda é bastante escassa na literatura. Portanto ainda é muito difícil encontrar estudos que embasam nossos resultados, isso reforça a necessidade de novos estudos com essa relação.

Cabe ressaltar que nesse estudo não houve a preocupação de saber qual tipo, duração e ou intensidades de exercício físico foram ou não realizadas e sim o nível de CF geral de cada idoso, independente do tipo do exercício físico.

7. SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente estudo conclui-se que:

O IAFG é a variável que parece exercer maior influência nos valores antropométrico, hemodinâmicos e humorais.

Notou - se uma associação entre os haplótipos dos genes do SRAA, MDA, TIA e TIC, ao risco de HA. E ao verificar qual influência que os diferentes níveis de CF poderiam exercer na população com as características acima, foi observada uma redução dos valores de PA e da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) nesse grupo. Indicando que a manutenção de bons níveis de CF proporcionou menores valores de PA e da atividade da ECA, fato que pode ser considerado benéfico para o idoso.

Ainda, identificou-se um modelo de interação significativo entre o gene eNOS e AGT em hipertensos comparados a normotensos obtidos pelo método MDR. Esse achado revelou que o genótipo MM do SNP AGT_M235T associado aos genótipos do SNP -786T>C do gene eNOS, estão mais frequentes nos hipertensos, dos genótipos TC e CC, ou seja, os idosos com essas características estão mais propensos a desenvolver HA, pois possuem o alelo mutado “C” e fazem parte do grupo de alto risco. Também houve interação de baixo risco com os normotensos (TT), possivelmente pela ação do NO. Além disso, a combinação entre os genótipos TT do AGT_M235T e TT do eNOS -786T>C foi associada com hipertensos, a despeito da “maior produção de NO” referente ao alelo T da eNOS -786T>C, indicando que o TT do AGT_M235T esteja atuando com maior predomínio nesse caso especificamente.

Tais resultados contribuem para uma melhor compreensão de como as associações genéticas de mecanismos diferentes, relacionadas à HA se comportam em uma parcela da população idosa de Bauru - SP e ainda destaca a importância da adoção de um estilo de vida ativo, mantendo bons níveis de CF, com a finalidade de melhorar os parâmetros relacionados à saúde colaborando assim para um melhor controle hemodinâmico, humoral e também para um perfil de risco cardiovascular menor. Mais estudos sobre o tema, especialmente com delineamento experimental, necessitam ser elaborados para maiores esclarecimentos dos resultados e questões aqui levantadas.

REFERÊNCIAS

ABDEL-AZIZ, T.A.; MOHAMED, R.H. Association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with classical risk factors in development of premature coronary artery disease. **Mol Biol Rep** v, 40, n, 4, p. 3065-71. Apr 2013.

ACARTURK, E. et al. Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene in coronary artery disease in southern Turkey. **J Biochem Mol Biol** v, 38, n, 4, p. 486-90. Jul 31 2005.

AGACHAN, B. et al. Angiotensin converting enzyme I/D, angiotensinogen T174M-M235T and angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphisms in Turkish hypertensive patients. **Exp Mol Med** v, 35, n, 6, p. 545-9. Dec 31 2003.

ALVAREZ, R.B.P. et al. PRESCRIÇÃO DE EXERCÍCIO FÍSICO PARA CARDIOPATAS. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa - ruep** v, 11, n, 5, p. 2014.

BENEDETTI, T.R.B. et al. Reproducibility and validity of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) in elderly men. **Rev Bras Med Esporte** v, 13, n, 1, p. 11-16. 2007.

BOLFARINE, H.; BUSSAB, W. (2005). **Elementos de Amostragem**. São Paulo Blucher.

BONFIM-SILVA, R.; RIOS, D.L.S. Polimorfismos genéticos do sistema renina-angiotensina-aldosterona na doença arterial coronariana e na hipertensão arterial sistêmica. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações**, v, v. 10, n, 1, p. 28-40. 2012.

BONNARDEAUX, A. et al. Angiotensin II Type 1 Receptor Gene Polymorphisms in Human Essential Hypertension. **Hypertension** v, 24, n, 1, p. 1994.

CAMPO, S. et al. Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) gene mutations screening in a sample of Mediterranean population. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis** v, 578, n, 1-2, p. 143-8. Oct 15 2005.

CASAS, J. et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms and Cardiovascular Disease: A HuGE Review. **America Journal of Epidemiology** v, n, p. 1-15. 2006.

CIOLAC, E.G.; GUIMARÃES, G.V. Exercício físico e síndrome metabólica. **Rev Bras Med Esporte** v, 10, n, 4, p. 319-324. 2004.

CIPULLO JP et al. [Hypertension prevalence and risk factors in a Brazilian urban population]. **Arq Bras Cardiol** v, 94, n, 4, p. 519-526. 2010.

CORVOL, P.; JEUNEMAITRE, X. Molecular genetics of human hypertension: role of angiotensinogen. **Endocr Rev** v, 18, n, 5, p. 662-77. Oct 1997.

CRISAN, D.; CARR, J. Angiotensin I-converting enzyme: genotype and disease associations. **J Mol Diagn** v, 2, n, 3, p. 105-15. Aug 2000.

DATA, S.A. et al. eNOS T-786C genotype, physical activity, and peak forearm blood flow in females. **Med Sci Sports Exerc** v, 35, n, 12, p. 1991-1997. 2003.

DATA, S.A. et al. eNOS T-786C genotype, physical activity, and peak forearm blood flow in females. **Med Sci Sports Exerc** v, 35, n, 12, p. 1991-7. Dec 2003.

DE MORAES, W.M. et al. Programa de exercícios físicos baseado em frequência semanal mínima: efeitos na pressão arterial e aptidão física em idosos hipertensos. **Rev Bras Fisioter.** v, 15, n, p. 2011.

DENGEL, D.R. et al. A preliminary study on T-786C endothelial nitric oxide synthase gene and renal hemodynamic and blood pressure responses to dietary sodium. **Physiol Res** v, 56, n, 4, p. 393-401. 2007.

ERBS, S. et al. Promoter but not exon 7 polymorphism of endothelial nitric oxide synthase affects training-induced correction of endothelial dysfunction. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** v, 23, n, 10, p. 1814-9. Oct 1 2003.

ERDMANN, J. et al. Characterization of polymorphisms in the promoter of the human angiotensin II subtype 1 (AT1) receptor gene. **Ann. Hum. Genet.** v, 63, n, p. 369–374. 1999.

FARINATTI, P.D.T.V. (2008). **Envelhecimento, promoção da saúde e exercício.** Barueri, Manole.

FATINI, C. et al. Influence of eNOS gene polymorphisms on carotid atherosclerosis. **Eur J Vasc Endovasc Surg** v, 27, n, 5, p. 540-4. May 2004.

FIROUZABADI, N. et al. Gender specificity of a genetic variant of angiotensin-converting enzyme and risk of coronary artery disease. **Mol Biol Rep** v, 40, n, 8, p. 4959-65. Aug 2013.

FONSECA, F.A.H.; IZAR, M.C.O. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** v, 83, n, 5, p. 2004.

FONTANA, V. et al. Comprehensive evaluation of the effects of enalapril on matrix metalloproteinases levels in hypertension. **Cardiovasc Drugs Ther** v, 26, n, 6, p. 511-9. Dec 2012.

FREITAS, S.R.S. et al. Análise combinada de fatores genéticos e ambientais na hipertensão essencial em município da Região Amazônica. **Arq Bras Cardiol** v, 88, n, 4, p. 447-451. 2007.

GLADWIN, M.T. et al. Nitrite as a vascular endocrine nitric oxide reservoir that contributes to hypoxic signaling, cytoprotection, and vasodilation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** v, 291, n, 5, p. 2026-35. Nov 2006.

GLUBA, A. et al. Is polymorphism within eNOS gene associated with the late onset of myocardial infarction? A pilot study. **Angiology** v, 60, n, 5, p. 588-95. Oct-Nov 2009.

GOBBI, S.; VILAR, R.; ZAGO, A.S. (2005). **Eds. Educação Física no Ensino Superior: Bases Teórico-Práticas do Condicionamento Físico**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

GONÇALVES, C.G. et al. Comparação do perfil entre idosos hipertensos e normotensos no município de Belo Horizonte-MG. **Cadernos de Educação, Saúde e Fisioterapia** v, 1, n, 1, 2014.

GONÇALVEZ, L.M. Genetic markers of hypertension: what will the future bring? . **Rev Port Cardiol** v, 21, n, 1, p. 39-43. 2002.

HARRAP, S.B. et al. The angiotensin I converting enzyme gene and predisposition to high blood pressure. **Hypertension** v, 21, n, 4, p. 455-60. Apr 1993.

HELTIANU, C. et al. Relationship of eNOS gene variants to diseases that have in common an endothelial cell dysfunction. **J Cell Mol Med** v, 9, n, 1, p. 135-42. Jan-Mar 2005a.

HELTIANU, C. et al. Relationship of eNOS gene variants to diseases that have in common an endothelial cell dysfunction. **J Cell Mol Med** v, 9, n, 1, p. 135-142. 2005b.

HINGORANI, A.D. et al. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. **Circulation** v, 100, n, 14, p. 1515-20. Oct 5 1999.

HIPERTENSÃO, S.B.D. IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Revista Bras. Hipert.** v, 17, n, 1, p. 7-10. 2013.

HOLLANDER, M.; WOLF, D.A. (1999). **Nonparametric Statistical Method**, SONS, J.W.

IBGE (2010). **Censo demográfico**.

JACOMINI, A.M. Exercício Físico e estresse oxidativo: influência do nível de condicionamento físico na hipertensão arterial e na relação entre substâncias antioxidantes e oxidantes em idosos. 66f. **Dissertação (Mestrado)**. 2015.

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** v, 119, n, 5, p. 579-85. 2007.

KRIEGER, J.E.; PEREIRA, A.C.R.D.J., 2006. P.. (2006). **Genética da Hipertensão Arterial**. In: **BRANDÃO, A. A.; AMODEO, C.; NOBRE, F.; FUCHS, F. D. . Hipertensão**. Rio de Janeiro: 17 – 24.

LACCHINI, R. et al. Relationship between Arginase 1 and Arginase 2 levels and genetic polymorphisms with erectile dysfunction. **Nitric Oxide** v, 51, n, p. 36-42. Dec 1 2015.

LATERZA, M.C.; RONDON, M.U.P.B.; NEGRÃO, C.E. Efeito anti-hipertensivo do exercício. **Rev Bras Hipertens** v, 14, n, 2, p. 104 -111. fevereiro 2007.

LEAN, M.E.J.; HAN, T.S.; CE., M. Waist circumference as a measure for need for weight management. **BMJ** v, 311, n, p. 158-161. 1995.

LOTUFO, P.A. O escore de risco de Framingham para doenças cardiovasculares. **Revista Medicina** v, 87, n, 4, p. 232-237. 2008.

MANSUR ADE, P.; FAVARATO, D. Mortality due to cardiovascular diseases in Brazil and in the metropolitan region of Sao Paulo: a 2011 update. **Arq Bras Cardiol** v, 99, n, 2, p. 755-61. Aug 2012.

MATAVELLI, I.S.; DEL JUDICE, E.L. Hipertensão Arterial Sistêmica e a Prática Regular de Exercícios Físicos como Forma de Controle: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde** v, 18, n, 4, p. 359-366. 2014.

MATYAR, S. et al. eNOS gene intron 4 a/b VNTR polymorphism is a risk factor for coronary artery disease in Southern Turkey. **Clin Chim Acta** v, 354, n, 1-2, p. 153-8. Apr 2005.

MAZO, G.Z. et al. Normative values and functional fitness in 60-to-69 year-old men. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum** v, 12, n, 5, p. 316-23. 2010.

MIAO, H.W.; GONG, H. Correlation of ACE gene deletion/insertion polymorphism and risk of pregnancy-induced hypertension: a meta-analysis based on 10,236 subjects. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst** v, 16, n, 4, p. 982-94. Dec 2015.

MOKRETAR, K. et al. Association of Polymorphisms in Endothelial Nitric Oxide Synthesis and Renin-Angiotensin-Aldosterone System with Developing of Coronary Artery Disease in Bulgarian Patients. **Genet Test Mol Biomarkers** v, 20, n, 2, p. 67-73. Feb 2016.

MOORE, J.H. Computational analysis of gene-gene interactions using multifactor dimensionality reduction. **Expert Rev Mol Diagn** v, 4, n, 6, p. 795-803. Nov 2004.

_____. Detecting, characterizing, and interpreting nonlinear gene-gene interactions using multifactor dimensionality reduction. **Adv Genet** v, 72, n, p. 101-16. 2010.

MOORE, N. et al. Renin gene polymorphisms and haplotypes, blood pressure, and responses to renin-angiotensin system inhibition. **Hypertension** v, 50, n, 2, p. 340-7. Aug 2007.

NAKAI, K. et al. [Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene associates with increased risk for ischemic heart diseases in the Japanese]. **Rinsho Byori** v, 42, n, 7, p. 689-94. Jul 1994.

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** v, 99, n, 22, p. 2864-70. Jun 8 1999.

NEGRÃO, C.E.; BARRETTO, A.C.P. (2006). **Cardiologia do exercício do atleta ao cardiopata**. São Paulo, Manole.

NIU, T. et al. Angiotensinogen gene and hypertension in Chinese. **J Clin Invest** v, 101, n, 1, p. 188–194. 1998.

NOGUEIRA, I.C. et al. Effects of exercise on hypertension control in older adults: systematic review. **Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.** v, 15, n, 2, p. 587-601. 2012.

OSNESS, W. et al. (1990). **Functional Fitness Assessment For Adults Over 60 Years - A Field Based Assessment**, AAHPERD - American Alliance for Health, Physical Education, Recreation and Dance.

OSNESS, W.H. The AAHPERD Fitness Task Force: History and Philosophy. **Journal of Physical Education, Recreation and Dance** v, 60, n, 3, p. 64-65. 1989.

OSNESS, W.H. (1990). **Functional Fitness Assessment For Adults Over 60 Years - A Field Based Assessment**. AAHPERD - American Alliance for Health, Physical Education, Recreation and Dance.

PASSOS, V.M.A.; ASSIS, T.D.E.; BARRETO, S.M. Hipertensão arterial no Brasil: estimativa de prevalência a partir de estudos de base populacional. **Epidemiologia e Serviços de Saúde** v, 15, n, 1, p. 35-45. 2006.

PINHEIRO, L.C. et al. Increase in gastric pH reduces hypotensive effect of oral sodium nitrite in rats. **Free Radic Biol Med** v, 53, n, 4, p. 701-9. Aug 15 2012.

PIROLA, J.C. Molecular genetics of essential hypertension. Susceptibility and resistance genes. **Medicina (Ribeirão Preto)** v, 60, n, p. 59-60. 2000.

PIZZANO, R.E. Programa de atividade para comunidade: Eficaz para reduzir o risco cardiovascular e melhorar a qualidade de vida do idoso. **Universidade Cruzeiro do Sul: Dissertação mestrado** v, n, p. 2011.

PONTES-NETO OM et al. Stroke awareness in Brazil: alarming results in a community-based study. **Stroke Res Treat** v, 39, n, 2, p. 292-296 2008.

PROCOPCIUC, L. et al. Essential arterial hypertension and polymorphism of angiotensinogen M235T gene. **J Cell Mol Med** v, 6, n, 2, p. 245-50. Apr-Jun 2002.

RITCHIE, M.D. et al. Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer. **Am J Hum Genet** v, 69, n, 1, p. 138-47. Jul 2001.

RONDINELLI, E.; MOURA NETO, R.S. Perspectivas futuras: o papel da genética na abordagem do individuo hipertenso. **Revista da SOCERJ** v, 16, n, 1, p. 77-83. 2003.

ROWLAND, T. et al. Gender effects on submaximal energy expenditure in children. **Int J Sports Med** v, 18, n, 6, p. 420-5. Aug 1997.

RUSH, J.W.; AULTMAN, C.D. Vascular biology of angiotensin and the impact of physical activity. **Appl Physiol Nutr Metab** v, 33, n, 1, p. 162-72. Feb 2008.

RUSH, J.W.; DENNISS, S.G.; GRAHAM, D.A. Vascular nitric oxide and oxidative stress: determinants of endothelial adaptations to cardiovascular disease and to physical activity. **Can J Appl Physiol** v, 30, n, 4, p. 442-74. Aug 2005.

SANDRIM, V.C. et al. Susceptible and protective eNOS haplotypes in hypertensive black and white subjects. **Atherosclerosis** v, 186, n, 2, p. 428-32. Jun 2006.

SAÚDE, M.D. (2007). **Information about health: mortality**, DATASUS.

SAÚDE., M.D. (2010). **VIGITEL Brasil 2009: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico.**

SAWADA, T. et al. Relation of the Glu298Asp polymorphism of the nitric oxide synthase gene to hypertension and serum cholesterol in Japanese workers. **Prev Med** v, 47, n, 2, p. 167-71. Aug 2008.

SBH, S.B.D.H. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Revista Hipertensão** v, 13, n, 1, p. 2010.

SCHUNKERT, H. et al. Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy. **N Engl J Med** v, 330, n, 23, p. 1634-8. Jun 9 1994.

SILVA, A.B.D. Relação entre sedentarismo, caminhada e outras modalidades de exercício físico em idosos. 2015. 53 f. **DISSERTAÇÃO (MESTRADO)**, Universidade de São Paulo.

SILVA, P.S. et al. eNOS and BDKRB2 genotype affect the antihypertensive responses to enalapril. **Eur J Clin Pharmacol**. 2012.

SILVA, R.F. et al. Influence of training status and eNOS haplotypes on plasma nitrite concentrations in normotensive older adults: a hypothesis-generating study. **Aging Clin Exp Res** v. 26, p. 591-598. Apr 24, 2014.

SUNG, J.H. et al. Association between eNOS polymorphisms and risk of coronary artery disease in a Korean population: a meta-analysis. **Genet Mol Res** v, 14, n, 4, p. 16508-20. 2015.

TANG, W. et al. Association between a G894T polymorphism of eNOS gene and essential hypertension in Hani and Yi minority groups of China. **Arch Med Res** v, 39, n, 2, p. 222-5. Feb 2008.

TANGUREK, B. et al. The relationship between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (T-786 C) and coronary artery disease in the Turkish population. **Heart Vessels** v, 21, n, 5, p. 285-90. Sep 2006.

TANUS-SANTOS, J.E.; DESAI, M.; FLOCKHART, D.A. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. **Pharmacogenetics** v, 11, n, 8, p. 719-25. Nov 2001.

TAVARES, L.S.; LEITE, I.C.; TELLES, F.S.P. Necessidade insatisfeita por métodos anticoncepcionais no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia** v, 10, n, 2, p. 139-148. 2007.

TESAURO, M. et al. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: Cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v, 97, n, 6, p. 2832–2835. 2000 .

TRAPÉ, A.A. et al. The relationship between training status, blood pressure and uric acid in adults and elderly. **BMC Cardiovasc Disord** v, 13, n, p. 44. 2013.

TRAPÉ, A.A. et al. Aptidão física e nível habitual de atividade física associada à saúde cardiovascular em adultos e idosos. **Medicina (Ribeirão Preto)** v, 48, n, 5, p. 457-466. 2015.

TRAPÉ, A.A. et al. Relationship between the practice of unsupervised walking and risk factors for cardiovascular disease in adults and elderly. **Medicina (Ribeirão Preto)** v, 47, n, 2, p. 165-176. 2014.

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** v, 20, n, 10, p. 2023-7. Oct 2002.

WANG, W. et al. Superoxide production and reactive oxygen species signaling by endothelial nitric-oxide synthase. **J Biol Chem** v, 275, n, 22, p. 16899-903. Jun 2 2000.

YANG, Y. et al. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 4b/a gene polymorphisms and coronary artery disease: evidence from a meta-analysis. **Int J Mol Sci** v, 15, n, 5, p. 7987-8003. 2014.

YOON, Y. et al. Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease. **Clin Chem** v, 46, n, 10, p. 1626-30. Oct 2000.

YUGAR-TOLEDO, J.C. et al. Gene variation in resistant hypertension: multilocus analysis of the angiotensin 1-converting enzyme, angiotensinogen, and endothelial nitric oxide synthase genes. **DNA Cell Biol** v, 30, n, 8, p. 555-64. Aug 2011.

ZAGO, A.S.; GOBBI, S. [Normative values of functional fitness in 60-to-70 year-old women]. **R. Bras. Ci. e Mov.** v, 11, n, 2, p. 77-86 2003.

ZAGO, A.S. et al. [Effect of physical activity and t-786C polymorphism in blood pressure and blood flow in the elderly]. **Arq Bras Cardiol** v, 95, n, 4, p. 510-6. Oct 2010.

ZAGO, A.S.; ZANESCO, A. Nitric oxide, cardiovascular disease and physical exercise. **Arq Bras Cardiol** v, 87, n, 6, p. e264-70. Dec 2006.

ZAITUNE, M.P.A.E.A. Hipertensão arterial em idosos: prevalência, fatores associados e práticas de controle no Município de Campinas, São Paulo, Brasil. **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro** v, 22, n, 2, p. 285-294. 2006.

ANEXO A

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

"FACULDADE DE CIÊNCIAS
CAMPUS DE BAURU/ UNESP -
"JÚLIO DE MESQUITA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INTERAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS, ESTRESSE OXIDATIVO E APTIDÃO FÍSICA NO CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL DE ADULTOS E

Pesquisador: Anderson Saranz Zago

Área Temática: Área 1. Genética Humana.

(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

Versão: 1

CAAE: 16330613.6.0000.5398

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 323.427

Data da Relatoria: 27/08/2013

Apresentação do Projeto:

O projeto é relevante do ponto de vista aplicado, conceitual e metodológico. Se por um lado as pesquisas têm estudado fatores isolados como aspectos genéticos, substâncias secretadas ou estresse oxidativo e sua relação com a variação na pressão arterial, este projeto, tem a finalidade de estudar a associação entre esses fatores. Pode agregar conhecimento e contribuir no refinamento do conceito de fator de risco para a pressão arterial e melhorar procedimentos de controle, considerando a interação entre as três variáveis. Aspectos metodológicos estão suficientemente descritos e as referências bibliográficas são atuais e pertinentes.

Objetivo da Pesquisa:

A pesquisa tem como objetivo verificar a relação existente entre os fatores humorais de controle da pressão arterial (NO e SRAA) com os fatores genéticos e de estresse oxidativo e sedentarismo em adultos e idosos. Participarão da pesquisa 160 pessoas, de ambos os sexos, recrutados através de panfletos e convites a grupos de terceira idade. Passarão por avaliações para determinar a Pressão Arterial e de Coleta sanguínea destinadas para as análises de substâncias como óxido nítrico, superóxido dismutase, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; também serão avaliados o perfil lipídico e glicêmico e análise dos polimorfismos do

Endereço: Av. Luiz Edmundo Carrijo Coube, nº 14-01

Bairro: CEP: 17.033-360

UF: SP **Município:** BAURU

Telefone: (143)103-6087 **Fax:** (143)103-6087 **E-mail:** arimala@fc.unesp.br

**"FACULDADE DE CIÊNCIAS
CAMPUS DE BAURU/ UNESP -
"JÚLIO DE MESQUITA**

Continuação do Parecer: 323.427

sistema renina angiotensina-aldosterona e os polimorfismos do gene. A aferição da pressão arterial e a coleta sanguínea serão realizadas por pessoal competente. Serão divididos em quatro grupos de 40 pessoas subdivididos em adultos e idosos com alto e baixo grau de condicionamento físico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisa não prevê riscos aparentes para os participantes além daqueles pertinentes aos procedimentos de coleta como dor durante a perfuração da agulha e hematoma local. Não há benefícios diretos, mas os resultados podem contribuir para refinar o perfil de risco de acidentes cardiovasculares.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Está bem escrita, sua proposição é pertinente a área de conhecimento, agregará conhecimento científico e tem muita relevância para a saúde de maneira geral. O cronograma é de julho de 2013 a dezembro de 2014, portanto é exequível. O projeto contará com recursos próprios para a execução.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os seguintes documentos para análise: Folha de rosto para pesquisa com seres humanos (CONEP); Projeto de Pesquisa; Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Parecer de considerações éticas favorável à aprovação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto considerado aprovado por estar em conformidade com os parâmetros legais, metodológicos e éticos analisados pelo colegiado.

Endereço:	Av. Luiz Edmundo Carrão Coube, nº 14-01		
Bairro:		CEP:	17.033-360
UF:	SP	Município:	BAURU
Telefone:	(143)103-6087	Fax:	(143)103-6087
		E-mail:	arimala@fc.unesp.br

"FACULDADE DE CIÊNCIAS
CAMPUS DE BAURU/ UNESP -
"JÚLIO DE MESQUITA

Continuação do Parecer: 323.427

BAURU, 02 de Julho de 2013

Assinador por:
Ari Fernando Maia
(Coordenador)

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Informações do Participante da Pesquisa

Nome:	
Documento de Identidade nº:	Sexo: () M () F

Título do Projeto de Pesquisa: Interação entre polimorfismos genéticos, estresse oxidativo e aptidão física no controle da pressão arterial de adultos e idosos
1. Duração da Pesquisa: duração total de 2 anos
2. Nome do pesquisador responsável: Prof. Dr. Anderson Saranz Zago
Cargo/ Função: Professor Doutor:
Instituição: Departamento de Educação Física / Faculdade de Ciências / UNESP – Bauru

Eu, Anderson Saranz Zago, professor do Departamento de Educação Física / UNESP – Bauru gostaria de convidá-lo(a) a participar do projeto de pesquisa “Interação entre polimorfismos genéticos, estresse oxidativo e aptidão física no controle da pressão arterial de adultos e idosos”. Todas as informações/dúvidas sobre este projeto podem ser esclarecidas por este documento ou pessoalmente e a qualquer momento durante a realização do mesmo.

Objetivo / Procedimentos e avaliações: O objetivo geral deste projeto de pesquisa será avaliar a relação entre o nível de condicionamento físico e os mecanismos de controle da pressão arterial. Resumidamente nossa hipótese é que as pessoas que praticam exercícios físicos possuam melhor condicionamento físico e, este condicionamento, estaria proporcionando um melhor controle da pressão arterial, menor fator de risco de doenças cardiovasculares e melhor aptidão funcional.

Para a realização deste projeto serão propostas as seguintes etapas:

a) Realizaremos uma entrevista inicial para a obtenção de informações sobre hábitos de vida, esclarecimentos de dúvidas e agendamentos, de acordo com a sua disponibilidade, para o(a) senhor(a) comparecer no local em que as avaliações serão realizadas;

- b) Avaliaremos sua pressão arterial para verificar se está alta ou normal;
- c) Realizaremos uma coleta de sangue, em jejum de 12 horas para avaliar a quantidade de gordura (colesterol, triglicérides, LDL e HDL) e de açúcar no sangue (glicose). Uma segunda coleta sanguínea será necessário (sem jejum) para que possamos analisar diversas substâncias presentes no sangue e que contribuem para controlar a pressão arterial e, também, fazemos uma análise genética para verificar uma pré-disposição para a hipertensão arterial.
- d) Realizaremos também um teste em esteira ergométrica para verificar o nível de condicionamento físico atual.

Desconfortos e riscos possíveis e os benefícios esperados: Nas coletas de sangue existe há probabilidade de você sentir uma pequena dor proveniente da “picada” da agulha e do seu braço ficar, por algum tempo, com uma mancha roxa após a coleta de sangue. É importante ressaltar que a coleta de sangue será realizada com material descartável, esterilizado e por uma enfermeira treinada neste tipo de coleta.

Durante o teste na esteira pode ocorrer algum desconforto (cansaço). Mas, todos esses riscos serão minimizados, pois, a todo o momento, você será acompanhado(a) por um profissional de educação física que lhe fornecerá todas as informações sobre o teste que estará ocorrendo. Cabe ressaltar que este teste não é “máximo”, ou seja, você não precisará caminhar até ficar extremamente cansado(a).

Esclarecimentos: É importante que todas as suas dúvidas sejam esclarecidas antes de sua participação no estudo. Esta participação não é obrigatória, mas sim voluntária. Desta forma, o(a) senhor(a) terá liberdade, a qualquer momento, de se recusar a continuar participando da pesquisa e retirar o seu consentimento, sem qualquer penalização ou prejuízo. A participação nesta pesquisa não trará gastos nem benefícios financeiros e todos os resultados das avaliações serão disponibilizados e explicados ao final da pesquisa.

Confidencialidade: Todas as informações obtidas no estudo serão confidenciais e o seu nome não será divulgado em momento algum. Apenas terão acesso a essas informações o(a) senhor(a) e o pesquisador responsável. Ainda, toda e qualquer informação será utilizada para fins acadêmicos exclusivos deste projeto com a publicação em revistas científicas e apresentação em congressos. Ainda, cabe ressaltar que todo o armazenamento e manuseio do material biológico coletado (sangue) estarão de acordo com o Conselho Nacional de Saúde e ao final da

pesquisa, estes materiais serão descartado de acordo com as normas do Laboratório de Resíduo Biológico da Instituição.

Informações do Responsável pela Pesquisa: PROF DR. ANDERSON SARANZ ZAGO / Departamento de Educação Física / UNESP / Praça de Esportes - Av. Eng. Luiz Edmundo Carrijo Coube, 14-01, CEP: 17033-360 - Bauru, SP
Fone: (14) 3103-6082 – ramal 7991

Declaro que após esclarecido todas as dúvidas pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar da presente pesquisa.

Bauru, 25 de abril de 2013.

Assinatura do participante

Prof Dr Anderson Saranz Zago
Pesquisador responsável

APÊNDICE B

QUESTIONÁRIO SEMIESTRUTURADO - ANAMNESE

Nome: _____ Código: _____

DADOS PESSOAIS
Data de Nascimento: _____ Cor da pele: _____ Endereço: _____ Cidade: _____ Telefone para contato: _____ / _____ Contato de Emergência: _____ Telefone: _____ Tabagismo: _____ Cigarros/dia: _____ Há quanto tempo: _____ Consumo de Álcool: _____ Vezes por semana: _____ A quanto tempo: _____ Peso: _____ Estatura: _____ OBS: _____ Renda Familiar: _____ Pessoas que compõem a renda: _____ Renda per capita: _____ Escolaridade: _____ Anos de estudos: _____
HISTÓRICO FAMILIAR E PESSOAL DE SAÚDE
Histórico Familiar de Problemas de Saúde:
Histórico Pessoal de Problemas de Saúde (qual problema teve/a quanto tempo/qual medicação):
Problema de Saúde Atual: Medicação: _____ Há quanto tempo: _____
HISTÓRICO DE PRÁTICA DE EXERCÍCIOS FÍSICOS (PASSADO)
Praticou algum tipo de exercício: _____ Qual: _____ Há quanto tempo: _____ Vezes por semana: _____ Tempo/sessão: _____ A quanto tempo parou: _____ Porque parou: _____
HÁBITOS ATUAIS DE PRÁTICA DE EXERCÍCIOS FÍSICOS
Pratica algum tipo de exercício: _____ Há quanto tempo (sem interrupção): _____ Qual: _____ Supervisionada? _____ Vezes/ semana: _____ Tempo/sessão: _____

Observações: