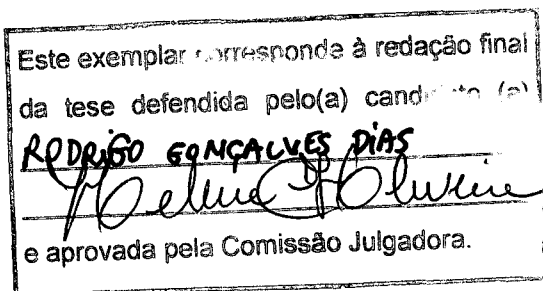


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



RODRIGO GONÇALVES DIAS

INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO G894T DO GENE DA ÓXIDO
NÍTRICO SINTASE ENDOTELIAL NA VASODILATAÇÃO
ENDOTÉLIO-DEPENDENTE



Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular, área de Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Helena Krieger

CAMPINAS – SP
2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

D543i	<p>Dias, Rodrigo Gonçalves Influência do polimorfismo G894T do gene da óxido nítrico sintase endotelial na vasodilatação endotélio-dependente / Rodrigo Gonçalves Dias. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.</p> <p>Orientadora: Marta Helena Krieger. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Polimorfismo (Genética). 2. Óxido nítrico. 3. Reatividade vascular. 4. Fenótipo. I. Krieger, Marta Helena. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
--------------	--

Título em inglês: Influence of G894T polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene on endothelium-dependent vasodilatation.

Palavras-chave em inglês: Genetic polymorphisms; Nitric oxide; Vascular reactivity; Phenotype.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Helena Coutinho Franco de Oliveira, Dora Maria Grassi-Kassisse, Denise Vaz de Macedo, Francisco Rafael Martins Laurindo, Maria Helena Catelli de Carvalho.

Data da defesa: 28/08/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Data da Defesa: 28/08/2008

BANCA EXAMINADORA

Profa.Dra. Marta Helena Krieger
(Orientadora)

Assinatura

Profa.Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse



Assinatura

Profa.Dra. Denise Vaz de Macedo



Assinatura

Profa.Dra. Maria Helena Catelli de Carvalho



Assinatura

Prof.Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo



Assinatura

Profa.Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira



Assinatura

Prof.Dr. Protasio Lemos da Luz

Assinatura

Prof.Dr. Miguel Arcanjo Áreas

Assinatura

O simples fato de olharmos o organismo humano e imaginarmos o quão perfeitas devem ser as interações entre os seus sistemas, já é algo que por si só fascina. Quem um dia ao sentir um coração pulsar não especulou sobre a perfeita maquinaria que mantém a sincronia dos batimentos? Como um sentimento, algo absolutamente abstrato, pode de repente alterar o ritmo desses batimentos?

Bom, se o amor move montanhas quem dirá os simples batimentos de um pequeno coração! Uma resposta plausível para muitos, mas extremamente desprezível para poucos. O cientista também ama, também sente seu coração responder a um ato de afeto, mas não se contenta com as “montanhas”. As minúcias, os detalhes, a curiosidade e o prazer de investigar fazem de nós pessoas estranhas, porém realizadas. Quem realmente faz e entende a ciência, sabe que ela nunca será completa. Sempre existirá algo ou uma lacuna incompreendida. Embora estranhos, nos contentamos, às vezes, com muito pouco.

No universo de dezenas de milhares de proteínas, enzimas e hormônios, que de forma sincrônica regem nossa maquinaria, uma que convive conosco por alguns anos de nossas vidas é capaz de nos trazer uma enorme felicidade. Mas só nós sabemos que, embora “uma” em um milhão, essa sim move mais e maiores montanhas do que aquelas montanhas citadas pelos leigos.

Dias, RG

Agradecimentos

À minha orientadora Marta Helena Krieger, que com sua experiência profissional e de vida, soube “sentir” as minhas necessidades por algo que a UNICAMP não poderia me oferecer. E mais do que sentir, depositou em mim toda a confiança, dando-me a oportunidade de ter acesso ao meu sonho. Serei sempre agradecido!

Aos docentes do Departamento de Fisiologia e Biofísica - Dora Maria Grassi-Kassisse, Regina Célia Spadari-Bratfisch e Miguel Arcanjo Áreas - por suas inquestionáveis presenças no início do meu desenvolvimento profissional.

À docente do Departamento de Bioquímica - Denise Vaz de Macedo - pelas grandes oportunidades concedidas durante toda minha graduação e que, sem dúvida alguma, refletiram positivamente no desenvolvimento desta tese e em outros pontos profissionais e pessoais de minha vida. Agradeço de coração.

A todos os funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica e da Pós-graduação, Alexandra, Ivo, Dona Zefa, Marcelo e Andréa, por toda a boa vontade e suporte concedido durante todos esses anos.

Aos amigos e colegas da Unicamp, José Antônio, Leandro dos Santos, Amarylis Bonito e Emilianne Salomão, pelo apoio profissional e companhia nos momentos de lazer.

Em especial aos grandes amigos Fernando Catanho e Fernanda Lazarim, colegas desde a graduação e que trilharam junto comigo as dificuldades de uma carreira científica dentro da educação física. É uma satisfação enorme perceber que toda aquela inocência e imaturidade inicial se convertem a cada dia em bons frutos, reflexo de tudo que viemos plantando desde os primeiros momentos de nossas vidas acadêmicas. Vocês estarão sempre em minha memória.

Ao meu co-orientador Carlos Eduardo Negrão, um exemplo de profissional competente e bem sucedido. Agradeço por todo o suporte concedido no desenvolvimento desse trabalho. Não tenho dúvida de que a oportunidade de vivenciar toda a estrutura científica criada por você durante todos esses anos contribuiu de forma excepcional para o meu crescimento profissional. Sou extremamente grato por tudo!

Ao Dr. Alexandre da Costa Pereira. Devo reconhecer sua competência e agradecer por todo o suporte e confiança depositada em minha pessoa durante os anos em que, juntos, batalhamos nas dificuldades desse projeto. Principalmente com relação às questões genéticas, o mérito de orientação desse trabalho é absolutamente todo seu. Sua forma de incentivar faz a diferença!

Aos co-autores desse trabalho – Maria Janieire Nazaré Nunes Alves, Alexandre da Costa Pereira, Maria Urbana Pinto Brandão Rondon, Marcelo Rodrigues dos Santos, Marta Helena Krieger, José Eduardo Krieger e Carlos Eduardo Negrão. Cada um contribuindo

de forma expressiva em pontos específicos desse trabalho. Em especial à Dra. Janieire e à Dra. Maria Urbana, duas peças chave na realização dos procedimentos invasivos do experimento. Ao amigo Marcelo que esteve presente em todos os experimentos, dando um suporte fundamental.

A toda equipe da Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício, Dra. Ivani Credidio Trombetta e Dra. Ana Maria Braga. Em especial à Ivani por nosso vínculo profissional e, acima de tudo, de amizade.

Aos amigos e funcionários da Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício, Cleber Renê, Mateus Laterza, Daniel Martinez, Mônica Marques e Sandra Sino. Em especial à Mônica e à Sandra pela paciência e suporte relacionado a todos os obstáculos referentes às minhas solicitações.

Aos grandes amigos Danilo Marcelo Leite do Prado e Wladimir Bolani, ex-alunos do curso de aprimoramento do InCor e que hoje se tornaram mais do que grandes amigos. Espero que possamos caminhar sempre juntos na batalha por nossas conquistas.

A todos os amigos e funcionários do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular - Isabel Lameirinhas, Silvana Campos, Maria de Lourdes, Alessandra Medeiros, Marcilene Floriano, Noely Ferreira, Débora Bergara, José Arruda e Janilton de Souza - cada um com sua parcela de contribuição para o desenvolvimento desse trabalho. Em especial à Isabel e à Silvana que contribuíram de forma inquestionável em momentos burocráticos e de dificuldade.

Agradecimentos Especiais

Costumo dizer que meus pais, Luciano e Ana Maria, embora nunca tenham entendido com clareza o caminho que resolvi trilhar, sempre confiaram e me estenderam as mãos. No entanto, mais importante do que o suporte financeiro, a consciência, a educação, o respeito, a honestidade, a índole e a experiência de vida em pontos específicos, foi o que realmente fez e faz a diferença. São itens necessários e inquestionáveis para a construção da base sólida de qualquer conquista. Agradeço de coração e reconheço todo o esforço de vocês durante minha criação.

Creio ser importante acreditarmos em uma força maior e, neste momento, não tenho dúvida de que quem articulou e planejou para que tudo desse certo foi Deus. Obrigado por estar sempre presente, iluminando minhas tomadas de decisões e atitudes. Sem a sua luz tenho a absoluta certeza de que o desfecho dessa história seria outro.

Acredito que todos já tiveram a percepção de que determinadas pessoas passam por nossas vidas em momentos certos. Agradeço de coração à Lucila, minha namorada, que soube perceber minhas dificuldades e exageros, auxiliando na correção dos mesmos.

Devo reconhecer que todo o meu desejo de realizar esse belo trabalho seria apenas um sonho caso eu não tivesse ao meu lado corajosas pessoas dispostas a passarem por procedimentos delicados e, algumas vezes, dolorosos. Atendendo ao meu pedido, muitas dessas pessoas, todas absolutamente saudáveis, compareceram ao InCor na hora e data marcada. O que eles ganharam com isso? Nada material. Apenas a certeza de que este gesto de voluntariedade é atitude fundamental para o desenvolvimento de uma ciência que, sem dúvida, contribuirá e muito na solução de problemas indesejáveis. Dedico todo o sucesso deste trabalho a vocês. Afinal, o que seria dos pescadores se não houvesse peixes?

Agradecimentos às Instituições

À Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) por conceder-me a possibilidade de aquisição de um título de doutor.

Ao Instituto do Coração – InCor (HCFMUSP) de São Paulo por possibilitar que todos os procedimentos e intervenções com os pacientes fossem realizados em suas instalações. Um Instituto com uma estrutura de pesquisa de altíssima qualidade e que não perde em absolutamente nada para os renomados centros universitários de pesquisa ao redor do mundo. Parabéns a todos que de alguma forma contribuíram para que tudo isso se edificasse.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela confiança depositada na estrutura do projeto e conseqüente concessão da bolsa de doutorado. Uma oportunidade inquestionável de desenvolvimento intelectual e profissional. Serei para sempre grato.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ANEXOS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
INTRODUÇÃO	1
Óxido Nítrico e Sistema Cardiovascular	1
Substrato e Sintases de Óxido Nítrico	2
Estrutura da eNOS	3
Regulação da Expressão Gênica e da Atividade da eNOS	4
Óxido Nítrico, Tono Vascular e Vasodilatação Muscular	6
Polimorfismos da eNOS e Estudos Funcionais da Variante G894T	8
Associação da Variante G894T do Gene da eNOS com Fenótipos Cardiovasculares	9
OBJETIVOS	11
Objetivo Geral	11
Objetivos Específicos	11
MÉTODOS	12
Casuística	12
Métodos e Procedimentos	13
Coleta Sangüínea, Extração do DNA & Genotipagem	13
Fluxo Sangüíneo Muscular	14
Pressão Arterial e Frequência Cardíaca	15
Exercício de <i>handgrip</i>	15
Punção Arterial e Infusão de Drogas	16
Atividade Nervosa Simpática Muscular	16
Protocolos Experimentais	16
Protocolo I	17
Protocolo II	18

Análise Estatística	20
RESULTADOS	21
Distribuição dos alelos	21
Medidas Basais	21
Respostas Hemodinâmicos e Neurovasculares Durante o Exercício	21
Medidas Basais com Infusão de Drogas Vasoativas	23
Respostas Hemodinâmicos e Neurovasculares Durante o Exercício com Infusão de Drogas Vasoativas	27
DISCUSSÃO	32
Limitações	34
Perspectivas	36
CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
ANEXOS	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variáveis demográficas e metabólicas em 33 indivíduos codificados como GG, GT e TT para o gene da eNOS pág. 22

Tabela 2 - Valores basais e alterações absolutas da frequência cardíaca, pressão arterial média, fluxo sanguíneo no antebraço e condutância vascular no antebraço durante o exercício moderado de *handgrip* a 30% da máxima contração voluntária em 33 indivíduos codificados como GG, GT e TT para o gene da eNOS pág. 23

Tabela 3 - Valores basais e alterações absolutas da frequência cardíaca e da pressão arterial média durante o exercício moderado de *handgrip* a 30% da máxima contração voluntária com infusão de salina, L-NMMA e L-NMMA associado à fentolamina em indivíduos codificados com GG (n=8) e TT (n=7) para o gene da eNOS pág. 25

Tabela 4 - Valores basais e alterações absolutas do fluxo sanguíneo no antebraço, condutância vascular no antebraço e atividade nervosa simpática muscular durante o exercício moderado de *handgrip* a 30% da máxima contração voluntária com infusão de salina, L-NMMA e L-NMMA associado à fentolamina em indivíduos codificados com GG (n=8) e TT (n=7) para o gene da eNOS pág. 28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – A) Esquema representativo do gene da eNOS caracterizando a troca do nucleotídeo guanina (G) por timina (T) na posição 894 do cDNA da eNOS. **B)** Esquema representativo do gel de agarose a 2% e os fragmentos de 158-pb e 90-pb gerados pela enzima de restrição *MboI* na presença do alelo 894T. *M*: marcador de peso molecular (100 pb DNA ladder/ GIBCO BRL); (-): controle negativo; *1*: genótipo GG (248pb); *2*: genótipo GT (248, 158 e 90pb); *3*: genótipo TT (158 e 90pb) pág. 13

Figura 2 – Protocolos experimentais. FSA, fluxo sanguíneo no antebraço; PA, pressão arterial; FC, frequência cardíaca; ANSM, atividade nervosa simpática muscular pág. 18

Figura 3 – Comportamento individual da resposta (variação absoluta) reflexa do fluxo sanguíneo no antebraço (FSA) e condutância vascular no antebraço (CVA) ao exercício de *handgrip* a 30% da contração voluntária máxima (CVM) em indivíduos codificados com GG, GT e TT para o gene da eNOS. Observe que a resposta do FSA e da CVA são significativamente menores no genótipo TT quando comparado aos genótipos GG e GT. *Two-way* ANOVA seguido de *Scheffé's post-hoc*. $P < 0.05$pág. 24

Figura 4 – Valores basais de fluxo sanguíneo no antebraço (FSA) e condutância vascular no antebraço (CVA) durante a infusão de salina, L-NMMA e L-NMMA + fentolamina em indivíduos codificados com GG (n=8) e TT (n=7) para o gene da eNOS. * vs. L-NMMA. *One-way* ANOVA. $P < 0.05$pág. 26

Figura 5 – Comportamento (variação absoluta) da frequência cardíaca (FC) e da pressão arterial média (PAM) em resposta ao exercício de *handgrip* a 30% da contração voluntária máxima (CVM) com infusão de salina, L-NMMA e L-NMMA associado à fentolamina em indivíduos codificados com GG (n=8) e TT (n=7) para o gene da eNOS..... pág. 29

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

Figura 7 – Comportamento (variação absoluta) do fluxo sanguíneo no antebraço (FSA) e condutância vascular no antebraço (CVA) em resposta ao exercício de *handgrip* a 30% da contração voluntária máxima (CVM) com infusão de salina, L-NMMA e L-NMMA associado à fentolamina em indivíduos codificados com GG (n=8) e TT (n=7) para o gene da eNOS. ♦ diferente do basal; † diferente do genótipo GG; ‡ ambos os genótipos diferente do basal. *Two-way* ANOVA seguido de *Scheffé's post-hoc*. $P < 0.05$ pág. 31

LISTA DE ANEXOS

Anexo I - Protocolo de pesquisa (SDC 2588/05/008) aprovado no mérito científico pela Comissão Científica e de Ética do Instituto do Coração – InCor (HCFMUSP).

Anexo II – Protocolo de pesquisa aprovado no mérito científico pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolo Pesquisa nº 109/05).

Anexo III - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Anexo IV – Premiação.

Anexo V – Artigo Submetido para Publicação.

RESUMO

O Óxido Nítrico (NO) é um radical livre gasoso sintetizado nos vasos sanguíneos principalmente pela enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). No sistema cardiovascular ele está diretamente envolvido no controle do fluxo sanguíneo regional, especialmente na musculatura esquelética. O polimorfismo G894T do gene da eNOS vem sendo amplamente investigado e o alelo 894T, que resulta na troca do aminoácido glutamato por aspartato na posição 298 da enzima, parece estar associado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares. No entanto, não se conhece o efeito dessa variante genética na vasodilatação muscular. Neste estudo testou-se a hipótese de que a resposta reflexa de vasodilatação muscular durante o exercício isométrico de *handgrip* estaria atenuada em indivíduos portadores do alelo 894T. Em adição, que a resposta atenuada estaria ocorrendo em consequência de uma biodisponibilidade reduzida do NO e/ou aumento da atividade nervosa simpática vasoconstritora para a musculatura esquelética. Para testar tais hipóteses, 287 voluntários foram previamente genotipados e, deste total, 33 indivíduos saudáveis foram selecionados para representar 3 genótipos: GG (n=15, Idade=43±3 anos, IMC=22,9±0,3 kg/m²), GT (n=9, Idade=39±3 anos, IMC=24,6±1,2 kg/m²) e TT (n=9, Idade=40±4 anos, IMC=23,5±0,9 kg/m²). A frequência cardíaca (FC; ECG), pressão arterial média (PAM; oscilométrico) e fluxo sanguíneo no antebraço (FSA; pletismografia de oclusão venosa) foram avaliados por 3 minutos no basal e 3 minutos durante o exercício isométrico de *handgrip*, realizado a 30% da máxima contração voluntária. Não houve diferença nos valores basais de FC, PAM, FSA e condutância vascular no antebraço (CVA) entre GG (69±2 bpm; 91±3 mmHg; 1,81±0,09 ml.min⁻¹.100 ml⁻¹; 2,03±0,12 unidades, respectivamente), GT (69±4 bpm; 94±2 mmHg; 1,80±0,23 ml.min⁻¹.100 ml⁻¹; 1,90±0,24 unidades) e TT (63±3 bpm; 95±3 mmHg; 1,79±0,17 ml.min⁻¹.100 ml⁻¹; 1,89±0,17 unidades). Em resposta ao exercício, a CVA foi significativamente menor no genótipo TT ($\Delta=0,07\pm0,14$ unidades, $P=.002$) quando comparado aos genótipos GG ($\Delta=0,57\pm0,09$ unidades) e GT ($\Delta=0,64\pm0,20$ unidades). Para investigar os mecanismos responsáveis pela vasodilatação reduzida no genótipo TT, o FSA foi estudado durante a infusão intra-arterial de L-NMMA (4 mg.min⁻¹) e L-NMMA + fentolamina (4 mg.min⁻¹ e 100µg.min⁻¹), num subgrupo de 8 indivíduos com genótipo GG e 7 indivíduos com genótipo TT. Em adição, avaliou-se a

atividade nervosa simpática muscular (ANSM; microneurografia). Em resposta ao exercício, L-NMMA não alterou a CVA no genótipo TT ($\Delta=-0,05\pm0,20$ vs. $-0,09\pm0,18$ unidades). Ao contrário, L-NMMA reduziu significativamente a CVA no genótipo GG ($\Delta=0,79\pm0,14$ vs. $0,14\pm0,09$ unidades). Desta forma, a diferença entre os genótipos não foi mais observada ($P=.62$). L-NMMA + fentolamina aumentou similarmente a CVA em resposta ao exercício nos genótipos GG e TT ($\Delta=1,16\pm0,26$ vs. $0,56\pm0,24$ unidades, $P=.43$). A PAM e a ANSM aumentaram significativamente e de forma similar em ambos os genótipos. Estes resultados permitem concluir que o polimorfismo G894T do gene da eNOS está associado à vasodilatação muscular reflexa diminuída em resposta ao exercício. Em adição, esta atenuação na vasodilatação nos indivíduos homozigotos para o alelo 894T parece ser primariamente mediada por uma biodisponibilidade reduzida do óxido nítrico, mas não por um aumento da atividade nervosa simpática muscular.

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is a free radical synthesized in vessels mainly by endothelial nitric oxide synthase (eNOS) enzyme. In the cardiovascular system NO is involved in the modulation of regional blood flow, mainly in the skeletal muscle. The G894T polymorphism of the eNOS gene has been extensively investigated, and the 894T allele that results in glutamate to aspartate exchange at the position 298 of the eNOS enzyme, has been associated with cardiovascular diseases. However, the effects of 894T allele on muscle vasodilatation are unknown. We hypothesized that the reflex forearm blood flow responses during handgrip isometric exercise would be attenuated in individuals carrying the 894T allele. In addition, these responses would be mediated by impairment in nitric oxide availability and/or an increase in vasoconstrictor sympathetic nerve activity to skeletal muscle. To test the previous hypothesis, 287 volunteers were previously genotyped, and 33 healthy individuals selected to represent three genotypes: GG (n=15, age=43±3 years, BMI=22.9±0.3 kg/m²), GT (n=9, age=39±3 years, BMI=24.6±1.2 kg/m²) and TT (n=9, age=40±4 years, BMI=23.5±0.9 kg/m²). Heart rate (HR; ECG), mean blood pressure (MBP; oscillometric cuff) and forearm blood flow (FBF; venous occlusion plethysmography) were recorded for 3 minutes at baseline and 3 minutes during isometric handgrip exercise performed at 30% of maximal voluntary contraction. Baseline HR, MBP, FBF and forearm vascular conductance (FVC) were similar among GG (69±2 bpm; 91±3 mmHg; 1.81±0.09 ml.min⁻¹.100 ml⁻¹; 2.03±0.12 units, respectively), GT (69±4 bpm; 94±2 mmHg; 1.80±0.23 ml.min⁻¹.100 ml⁻¹; 1.90±0.24 units) and TT (63±3 bpm; 95±3 mmHg; 1.79±0.17 ml.min⁻¹.100 ml⁻¹; 1.89±0.17 units). FVC responses to exercise were significantly lower in TT ($\Delta=0.07\pm0.14$ units, $P=.002$) when compared with GG ($\Delta=0.57\pm0.09$ units) and GT ($\Delta=0.64\pm0.20$ units). To investigate the mechanisms underlying the lowered vasodilatation in TT genotype, we studied FBF during brachial intra-arterial infusion of L-NMMA (4 mg.min⁻¹) and L-NMMA + phentolamine (4 mg.min⁻¹ and 100µg.min⁻¹, respectively) in a subset of 8 GG and 7 TT individuals. In addition, we directly measured muscle sympathetic nerve activity (MSNA) by means of microneurography. L-NMMA did not significantly change FVC responses to exercise in TT when compared with saline control infusion ($\Delta=-0.05\pm0.20$ vs. -0.09 ± 0.18 units). In contrast, L-NMMA significantly reduced FVC in GG

genotype ($\Delta=0.79\pm0.14$ vs. 0.14 ± 0.09 units), and the difference between genotypes were no longer observed ($P=.62$). L-NMMA + phentolamine increased similarly FVC responses to exercise in GG and TT individuals ($\Delta=1.16\pm0.26$ vs. 0.56 ± 0.24 units, respectively, $P=.43$). MBP and MSNA increased significant and similarly throughout experimental protocols in GG and TT genotypes. We concluded that G894T gene eNOS polymorphism is functionally associated with impaired reflex muscle vasodilatation to exercise. In addition, the attenuated vasodilatation responsiveness to exercise in individuals who are homozygous for the 894T allele of the eNOS gene seems to be primarily mediated by a reduced nitric oxide bioavailability, but not increase in MSNA.

INTRODUÇÃO

A evidência de que o endotélio é um componente indispensável na regulação do tono vascular surgiu quando análises experimentais mostraram que na ausência dessa monocamada de epitélio pavimentoso a vasodilatação induzida por acetilcolina não ocorria. Naquele momento, Furchgott e Zawadzki (1980) documentaram que, quando estimulado, o endotélio era capaz de liberar uma substância vasoativa que foi denominada fator relaxante derivado do endotélio (EDRF). Passados alguns anos, o EDRF foi identificado como sendo o óxido nítrico (NO; Ignarro et al., 1987), um composto caracterizado em 1977 por Ferid Murad que, quando liberado por nitratos, causava relaxamento em células musculares lisas. Este contexto rendeu a Robert F. Furchgott, Ferid Murad e Louis J. Ignarro o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1998. Posteriormente ao NO, foi verificado que o endotélio liberava outros EDRF, tais como, a prostaciclina (PGI_2) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Além disso, o endotélio libera fatores constritores (EDCF) tais como, a endotelina (ET-1), produtos da via da ciclooxigenase como o tromboxano A_2 (TXA_2) e espécies reativas de oxigênio, entre eles o ânion superóxido (O_2^- ; Vila & Salaices, 2005). Estas descobertas, associadas à caracterização do endotélio como um sensor biológico capaz de detectar e responder a qualquer estímulo mecânico, físico ou químico, elevou-o ao posto de um tecido multifuncional que desempenha importante papel na homeostasia de todos os sistemas fisiológicos.

Óxido Nítrico e Sistema Cardiovascular

O NO, um intermediário gasoso atuante na sinalização de múltiplos processos biológicos, é um radical livre que apresenta um elétron desemparelhado na última camada e uma meia vida de 4 a 8 segundos em meio aquoso oxigenado (Moncada et al., 1989; Kojda & Harrison, 1999). Considerado um gás lábil com livre difusão nas membranas celulares, tal característica confere a esta molécula uma alta atividade biológica (Palmer et al., 1987). O reconhecimento de que o endotélio vascular é um órgão

ativo e que sua integridade favorece efeitos benéficos como ação antioxidante, antiinflamatória, anticoagulante, profibrinolítica, inibição da adesão e migração de leucócitos, inibição da proliferação e migração das células musculares lisas, inibição da agregação e adesão plaquetária, veio ampliar ainda mais as múltiplas ações do NO (Bonetti et al., 2003). Este cenário ateroprotetor é caracterizado por uma harmonia entre substâncias liberadas pelo endotélio, no qual o NO é citado como um dos compostos vasoativos mais importantes. A primeira descrição de disfunção endotelial em artérias coronárias ateroscleróticas, feita por Ludmer et al. (1986), veio confirmar o contexto acima. Caracterizada como uma desordem sistêmica que antecede a aterosclerose e suas complicações, na disfunção endotelial já é observada uma alteração na biodisponibilidade do NO (Verma et al., 2003).

O entendimento da complexidade da função endotelial e a dificuldade de se estudar cada um de seus componentes isoladamente vem sendo aos poucos superado. Dentro deste contexto, modelos animais capazes de reproduzir um estado fisiológico alterado foram desenvolvidos, possibilitando, por exemplo, o funcionamento do sistema em condições de baixa ou aumentada biodisponibilidade de NO. Além disso, estudos *in vivo* em humanos, através da infusão intra-arterial de compostos com potencial em modular a função endotélio-dependente ou endotélio-independente, possibilitaram a investigação dos mecanismos moduladores da função vascular, em condições normais e patológicas.

Substrato e Sintases de Óxido Nítrico

Caracterizado como “aminoácido metabolicamente versátil” pelo reconhecimento de suas múltiplas funções, a L-arginina é ainda o substrato necessário para a síntese do NO. A disponibilidade deste substrato no interior das células do endotélio vascular é dependente, pelo menos em parte, de sua concentração extracelular e da sua captação para o interior das cavéolas, onde a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) exerce sua função. A L-arginina é um aminoácido carregado positivamente e o seu transporte pela membrana plasmática se dá através de transportadores específicos para aminoácidos

catiônicos. Baseado na localização da isoforma 1 dos transportadores de aminoácidos catiônicos (CAT-1; gene SLC7A1), nas cavéolas, tal transportador é o principal responsável pelo suprimento de L-arginina para a eNOS e conseqüente catálise a NO (McDonald et al., 1997).

A produção enzimática do NO a partir do aminoácido L-arginina é mediada por uma família de três sintases de óxido nítrico (NOS), codificadas por genes distintos (Marletta, 1994). As isoformas compartilham 50-60% de homologia na seqüência de aminoácidos nos domínios oxidase e redutase (Govers & Rabelink, 2001). Estas isoformas exibem características distintas que refletem suas funções específicas *in vivo* (Stuehr, 1997).

A oxido nítrico sintase endotelial (eNOS ou NOS III; 7q35-36) e a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS ou NOS I; 12q24.2) possuem mecanismo de ativação constitutivo (cNOS). A isoforma induzida (iNOS ou NOS II; 17cen-q12) encontra-se expressa em processos celulares anormais como na insuficiência cardíaca (Ferreiro et al., 2004), induzidas por citocinas e agentes inflamatórios, o que resulta em alto fluxo de NO (Andrew & Mayer, 1999; Wang & Wang, 2000; Alderton et al., 2001).

A eNOS, encontrada principalmente nas células endoteliais em compartimentos denominados cavéolas (Shaul & Anderson, 1998), é essencial para a manutenção do tônus vascular basal. Este tônus é, em parte, mediado pela síntese do NO, um composto vasoativo participante na regulação do fluxo sangüíneo nos diversos leitos vasculares e, particularmente, no fluxo sangüíneo coronariano (Wang et al., 2000).

Estrutura da eNOS

A eNOS funciona como um dímero, constituída de dois monômeros idênticos, que por sua vez podem ser divididos funcional e estruturalmente em dois domínios principais: um domínio C-terminal redutase, homólogo ao citocromo P450 e que contém sítios de ligação para NADPH, flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e um domínio N-terminal oxidase, que abstrai um elétron do substrato L-arginina e possui sítios de ligação para o ferro heme, para o co-fator

tetrahidrobiopterina (BH₄) e para a L-arginina (Andrew & Mayer, 1999; Wang & Wang, 2000; Alderton et al., 2001). A reação de catálise das NOS constitutivas envolve dois estágios de oxidação: a hidroxilação da L-arginina em N^G-hidroxi-L-arginina seguida da oxidação deste intermediário com utilização de um elétron da NADPH, formando L-citrulina e NO (Albrecht et al., 2003). Esta reação consome 1.5 mol de NADPH e 2 mol de oxigênio por mol de L-citrulina formada (Griffith & Stuehr, 1995; Korth et al., 1994; Marletta, 1993). Co-fatores como ferro heme, BH₄ e L-arginina têm sido particularmente estudados, e a baixa biodisponibilidade destes induz ao fenômeno de desacoplamento da eNOS (Harrison, 1997; Vasquez-Vivar et al., 1998; Cai & Harrison, 2000). O ferro heme é essencial para a dimerização das 3 isoformas (Klatt et al., 1996); baixas concentrações ou ausência de L-arginina catalisa a redução do oxigênio em superóxido (O₂⁻) (Mayer et al., 1991; Heinzl et al., 1992) e níveis diminuídos de BH₄ leva à produção simultânea de NO e O₂⁻, produtos que reagem entre si formando peroxinitrito (ONOO⁻) (Beckman & Koppenol, 1996).

Regulação da Expressão Gênica e da Atividade da eNOS

Uma vez verificado que as células endoteliais contêm uma concentração basal da proteína eNOS, o gene da eNOS foi considerado constitutivamente expresso. Interessantemente, estudos posteriores demonstraram que concentrações estáveis do mRNA são sujeitos a um modesto nível de regulação (Searles, 2006). A região promotora do gene da eNOS foi clonada demonstrando possuir uma complexa estrutura de regulação da expressão gênica. Semelhante à região promotora de genes constitutivamente expressos, a região promotora do gene da eNOS não contém a sequência TATA Box. No entanto, possui múltiplas sequências DNA *cis*-regulatórias, incluindo CCAT box, sítios Sp1, GATA motifs, CACCC box, sítios AP-1 e AP-2, região de ligação p53, elementos NF-1, além de sequências responsivas a elementos esteróis e *shear stress* (Marsden et al., 1993). As sequências promotoras humana e bovina apresentam 75% de homologia, sugerindo uma alta conservação evolutiva da regulação transcricional do gene. Localizados na região promotora proximal, os domínios regulatórios positivos I e II

(PRD I e PRD II) estão envolvidos na regulação basal da transcrição gênica, apresentando afinidade pelos fatores de transcrição Sp-1, Sp-3, Ets-1, Elf-1, YY1 e proteína *MYC-associated zinc finger* (Karantzoulis-Fegaras et al., 1999). Estudos *in vitro* demonstraram que a responsividade do promotor da eNOS ao *shear stress* é dependente de seqüências localizadas entre -1000 e -975, região relativa à inicialização da transcrição (Malek et al., 1999; Silacci et al., 2000). A transcrição da eNOS é mediada pelas vias da MAPK, Ras/Raf/MEK1/2 e ERK1/2. Em adição, a ligação das subunidades p50 e p65 do NF- κ B ao elemento responsivo GAGACC (-990 ; -984), localizado anteriormente ao sítio de inicialização da transcrição, está envolvido na ativação do promotor pelo *shear stress* (Davis et al., 2004). Cultura de células endoteliais bovina submetidas a fluxo laminar apresentaram aumento de 9 vezes do mRNA, efeito este mediado por dois mecanismos distintos: 1) aumento transiente da transcrição do gene; 2) subsequente meia-vida prolongada do mRNA (Davis et al., 2001).

O mecanismo de ativação da eNOS tem sido descrito como o mais elaborado das três isoformas, refletindo a complexidade do controle fisiológico dos diferentes leitos vasculares (Govers & Rabelink, 2001; Michel & Feron, 1997).

O mecanismo clássico de ativação das isoformas constitutivas é dependente do cálcio (Ca^{++}), enquanto a iNOS independe da elevação das concentrações intracelulares de Ca^{++} , devido à alta afinidade da ligação da enzima com a calmodulina (Harrison, 1997; Michel & Feron, 1997; Papapetropoulos et al., 1999). O principal mecanismo de ativação da eNOS se dá pela fosforilação do aminoácido serina na posição 1177 (Shiojima & Walsh, 2002) pela enzima Akt kinase (ou proteína kinase B), o que aumenta a sensibilidade da eNOS às concentrações basais de Ca^{++} /calmodulina (Fulton et al., 1999). A ativação tônica ou fásica da eNOS em resposta ao fluxo sanguíneo é independente das alterações na concentração do Ca^{++} e constitui-se do *shear-stress*. Fulton et al. (1999) e Dimmeler et al. (1999) demonstraram que a troca do resíduo de serina^{1177/1179} pelo aminoácido alanina, torna a eNOS resistente à fosforilação e ativação pela enzima Akt, uma via dependente de fosfatidilinositol-3 kinase (PI-3K). Embora a fosforilação do resíduo de serina¹¹⁷⁷ desempenhe um papel crucial na ativação enzimática da eNOS, é sabido que sua regulação é dependente do padrão de fosforilação de múltiplos sítios (Mount et al. 2007). A fosforilação do resíduo de serina⁶³³, localizado no

domínio de ligação da flavina mononucleotídeo (FMN), também aumenta a atividade da eNOS e parece ser particularmente importante na manutenção da síntese de NO após a ativação por Ca^{++} /calmodulina e fosforilação do resíduo de serina¹¹⁷⁷. Por outro lado, fosforilado pela proteína kinase C (PKC), o resíduo de treonina⁴⁹⁵ interfere com o domínio de ligação da calmodulina regulando negativamente a síntese do NO. Embora já se conheça a importância de múltiplos sítios de fosforilação na regulação da atividade da eNOS, os mecanismos de regulação envolvendo kinases e fosfatases ainda não estão totalmente elucidados.

Óxido nítrico, Tono Vascular e Vasodilatação Muscular

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

Durante condições de estresse mental e exercício é observado, juntamente com a resposta taquicárdica e aumento da pressão arterial, vasodilatação em leito muscular esquelético como parte das respostas fisiológicas de ajuste do organismo. Foi postulado que parte desta resposta vasodilatadora muscular seria modulada por um componente neural, o que ficou evidente posteriormente pela existência de fibras simpáticas colinérgicas para a musculatura esquelética de algumas espécies de mamíferos com exceção de primatas e humanos. Foi verificado que a estimulação elétrica do nervo simpático provocava vasodilatação em leito muscular, quando a liberação pré-sináptica de noradrenalina era inibida pela infusão intra-arterial de fármacos. No entanto, esta resposta vasodilatadora mostrou-se atenuada quando um antagonista muscarínico foi administrado (Abrahams et al. 1964, Bolme & Fuxe, 1970). Posteriormente, ficou

evidente que o NO era, pelo menos em parte, o modulador da resposta vasodilatadora verificada quando fibras simpáticas colinérgicas eram estimuladas (Matsukawa et al., 1993). Paralelamente, Blair et al. (1959) verificaram que, em humanos, a vasodilatação no antebraço durante manobras fisiológicas é também mediada por um componente neural. Durante a aplicação do estresse mental, o fluxo sanguíneo no membro simpatectomizado não se alterava, quando comparado ao fluxo sanguíneo no membro controle. Em adição, a infusão intra-arterial de atropina no membro controle reduzia em aproximadamente 50% o aumento no fluxo sanguíneo. Naquele momento, utilizando-se das evidências indiretas, os autores sugeriram a existência de inervação simpática colinérgica para a musculatura esquelética de humanos. Mimetizando os experimentos em animais, mais tarde os estudos de Dietz et al. (1994) e Dietz et al. (1997) deixaram evidente que parte da resposta vasodilatadora muscular, medida no antebraço, durante o estresse mental ou o exercício é atenuada com a administração intra-arterial do L-NMMA. Os mecanismos pelos quais a acetilcolina e o NO são sintetizados e liberados durante as reações de defesa do organismo não estão completamente elucidados em humanos. As evidências alcançadas com bloqueios farmacológicos permitem apenas sugerir a existência de fibras simpáticas colinérgicas para a musculatura esquelética. Decorrente de tais limitações, os autores não descartam a possibilidade de que a vasodilatação seja causada por uma combinação entre fatores circulantes e locais. Uma pequena parte das células endoteliais poderia sintetizar e liberar acetilcolina (Milner et al. 1990). Além disso, a ativação de receptores β_2 -adrenérgicos localizados no músculo liso vascular resultaria no relaxamento desse tecido e, em consequência, vasodilatação. No entanto, Majmudar et al. (1999) verificaram que parte da vasodilatação resultante da ativação dos β_2 -adrenoceptores é mediada pelo NO. Embora os autores não expliquem o mecanismo responsável por este fenômeno, aproximadamente 25% da vasodilatação observada no antebraço com a infusão de Ritodrine (agonista seletivo β_2 -adrenérgico) foi atenuada quando L-NMMA é co-infundido. Estes resultados sugerem a existência dos β_2 -adrenoceptores no endotélio vascular, contribuindo para o aumento da atividade da eNOS. Em adição, o aumento da estimulação mecânica do endotélio vascular resultaria em síntese aumentada de NO, via PI-3K-Akt kinase, com subsequente fosforilação do resíduo de serina¹¹⁷⁷.

Polimorfismos da eNOS e Estudos Funcionais da Variante G894T.

Genotipada e seqüenciada em 1993 por Marsden e colaboradores (GenBank D26607), a eNOS está localizada no cromossomo 7q35-36 e variações na sua seqüência têm sido descritas na região promotora, exons e íntrons (Wang & Wang, 2000). O gene (21-22 kbp) compreende 26 exons e 25 íntrons com 133 kDa. A seqüência polipeptídica gerada contém 1203 aminoácidos (Marsden et al., 1993). Já está descrito na literatura a existência de três polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) na região promotora, em localizações de não ligação de fatores de transcrição (Karantzoulis-Fegaras et al., 1999). Nos íntrons 2, 11, 12, 18, 22 e 23 foram encontrados SNP's (Poirier et al., 1999) e polimorfismos de seqüências repetidas nos íntrons 2, 4, 8 e 13 (Marsden et al., 1993; Miyahara et al., 1994). Dos polimorfismos encontrados nos exons 6 e 7, a substituição da base nitrogenada guanina por timina (G→T), na posição 894 localizada no exon 7, resulta na substituição do aminoácido glutamato (GAG) por aspartato (GAT) na posição 298 da seqüência polipeptídica (Philip et al., 1999). Sugere-se que os polimorfismos localizados na região promotora do gene desempenham influência na transcrição do RNAm, enquanto os polimorfismos localizados em regiões codificadoras podem resultar em alteração de atividade enzimática (Hingorani, 2001).

O resíduo 298 está localizado externamente no domínio oxidase da enzima, sítios de ligação para L-arginina ou BH₄. Estudos enzimáticos utilizando eNOS recombinante mostraram não haver diferença na constante de Michaelis (k_m) nem na $V_{m\acute{a}x}$ entre as duas formas da enzima (Hingorani, 2001). Embora a atividade enzimática pareça não ser afetada pela forma Asp298 da enzima, Tesouro et al. (2000) mostraram que esta variante apresenta maior susceptibilidade à clivagem proteolítica em fragmentos de 100 e 35 KDa precisamente na posição Asp²⁹⁸-Pro²⁹⁹, quando comparado à variante Glu298. No entanto, Fairchild et al. (2001) demonstraram que tal susceptibilidade proteolítica ocorria devido a um artefato da preparação do experimento. A inconsistência desses resultados não exclui a possibilidade de que, *in vivo*, um desconhecido mecanismo proteolítico ou até mesmo uma alteração na regulação pós-transcricional possa estar sendo modulada pela variante Asp298 da enzima.

Associação da Variante G894T do Gene da eNOS com Fenótipos Cardiovasculares

Diversas doenças têm sido associadas a anormalidades na biosíntese do NO e muitas dessas condições estão associadas à disfunção autonômica. Estudos em genética populacional têm demonstrado importante associação entre o polimorfismo G894T do gene da eNOS com doença arterial coronariana (DAC) (Hingorani et al., 1999; Hibi et al., 1998; Shimasaki et al., 1998) e também com o espasmo coronário induzido por acetilcolina (Ach) (Yoshimura et al., 1998). Entre as disfunções cardiovasculares, foi ainda verificado que a variante G894T encontra-se associada à hipertensão arterial (Miyamoto et al., 1998; Lacolley et al., 1998), embora associação não tenha sido verificada em outras populações (Kato et al., 1999; Benjafield & Morris, 2000).

A correlação entre genótipo e fenótipo clínico varia quantitativa e qualitativamente, e a inconsistente associação entre o polimorfismo da eNOS e vários fenótipos clínicos é um fenômeno freqüentemente observado em outros genes associados a fenótipos (Wang & Wang, 2000). Esta inconsistência tem sido atribuída a fatores ambientais, alelos independentes, interação entre genes e variabilidades em fenótipos clínicos (Dipple & McCabe, 2000). A importância dos fatores ambientais na gênese de doenças reflete-se nas diferenças de morbi-mortalidade entre grupos geneticamente homogêneos, porém com estilos de vida diferentes.

Uma variação genética pode não ser relevante a uma determinada população, refletindo diferenças na freqüência da distribuição dos alelos. Um exemplo disso, é a freqüência do alelo 894T que é significativamente maior em populações brancas quando comparado à população japonesa (Wang et al., 2000). A inconsistente associação entre o polimorfismo da eNOS e as alterações vasculares ainda tem sido atribuída à variação na distribuição da eNOS em diferentes órgãos. Artérias de órgãos específicos são sujeitas a diferentes pressões hemodinâmicas, determinando a resposta da parede do vaso e conseqüente grau de disfunção endotelial (Wang & Wang, 2000).

Philip et al. (1999) observaram, em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização, que a reatividade vascular à infusão de fenilefrina (PE) é influenciada pela variante G894T do gene da eNOS. A resposta vasoconstritora dose-dependente à PE

foi significativamente maior para os alelos TT e GT comparado ao grupo homocigoto GG, indicando que a reatividade vascular à drogas vasoconstritoras pode ser modulada pelo polimorfismo da eNOS em humanos. A maior resposta dose-dependente dos pacientes com a variante 894T sugere uma reduzida biosíntese do NO. A administração sistêmica de *N*^G-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) provoca hipertensão em humanos (Vallance et al., 1989; Haynes et al., 1993; Hansen et al., 1994). Segundo Frandsen et al. (2001), a administração de 4mg/Kg de L-NAME em humanos reduz em 67% a atividade da eNOS. A biodisponibilidade reduzida do NO em consequência das variações no gene da eNOS é um importante candidato para a susceptibilidade de desenvolvimento da disfunção endotelial (Philip et al., 2000; Li et al., 2004; Hingorani, 2001) e alteração da modulação da atividade nervosa simpática sobre o vaso (Fabi et al., 1996).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Este estudo teve como objetivo caracterizar a influência da variante G894T do gene da eNOS no fenótipo de vasodilatação endotélio-dependente.

Objetivos Específicos

Testar a hipótese de que:

1) O fluxo sanguíneo basal e/ou a vasodilatação muscular reflexa induzida pelo exercício estariam diminuídos em indivíduos portadores do alelo T894, quando comparado a indivíduos com pelo menos um alelo G894 do gene da eNOS;

2) A menor resposta vasodilatadora reflexa verificada nos indivíduos com genótipo TT seria, pelo menos em parte, mediada por uma biodisponibilidade reduzida do óxido nítrico e/ou um tônus simpático vasoconstritor aumentado.

MÉTODOS

Casuística

Duzentos e oitenta e sete indivíduos, pacientes do ambulatório do Instituto do Coração – InCor (HCFMUSP) de São Paulo, foram convidados a integrar o proposto estudo. Todos foram submetidos à coleta de sangue para subsequente extração e armazenamento do DNA, além de análises clínicas e laboratoriais para a certificação do estado e condição fisiológica. Após genotipagem para o polimorfismo G894T do gene da eNOS, os 287 indivíduos foram subdivididos obedecendo a presença dos alelos G e T, ou seja, entre os genótipos GG (n=147; *wild-type*), GT (n=115) e TT (n=25). Na seqüência, foi realizada uma cuidadosa seleção determinada pelos critérios de inclusão e exclusão estabelecidos pelo estudo. Presença de sintomas e doenças cardiovasculares e metabólicas, uso de fármacos com potencial em afetar a função endotelial e fatores de risco como diabetes, dislipidemia, hipertensão arterial e tabagismo foram utilizados como fatores de exclusão, enquanto índice de massa corporal (IMC) < 27 e inatividade física por pelo menos 6 meses foram utilizados como fatores de inclusão dos indivíduos na investigação. Do total, 15 indivíduos GG, 9 indivíduos GT e 9 indivíduos TT obedeceram os critérios de seleção e concordaram com os procedimentos do estudo. O protocolo de pesquisa (SDC 2588/05/008) foi aprovado no mérito científico pela Comissão Científica e de Ética do Instituto do Coração (Anexo I) recebendo, posteriormente, parecer positivo da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolo Pesquisa nº 109/05 – Anexo II). Todos os indivíduos envolvidos no estudo foram informados sobre os procedimentos que seriam utilizados na investigação e, estando de acordo, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo III).

Métodos e Procedimentos

Coleta Sangüínea, Extração do DNA e Genotipagem

As amostras de sangue periférico (8 mL) foram coletadas em tubos contendo EDTA como agente anticoagulante. Para isso, uma solução de EDTA a 5,4 mM foi preparada e adicionada ao sangue total. Após a homogeneização do sangue, o DNA genômico foi extraído do sangue total seguindo os procedimentos padrões (Pereira et al., 2007). O material genômico foi armazenado a -70°C e utilizado posteriormente para a genotipagem.

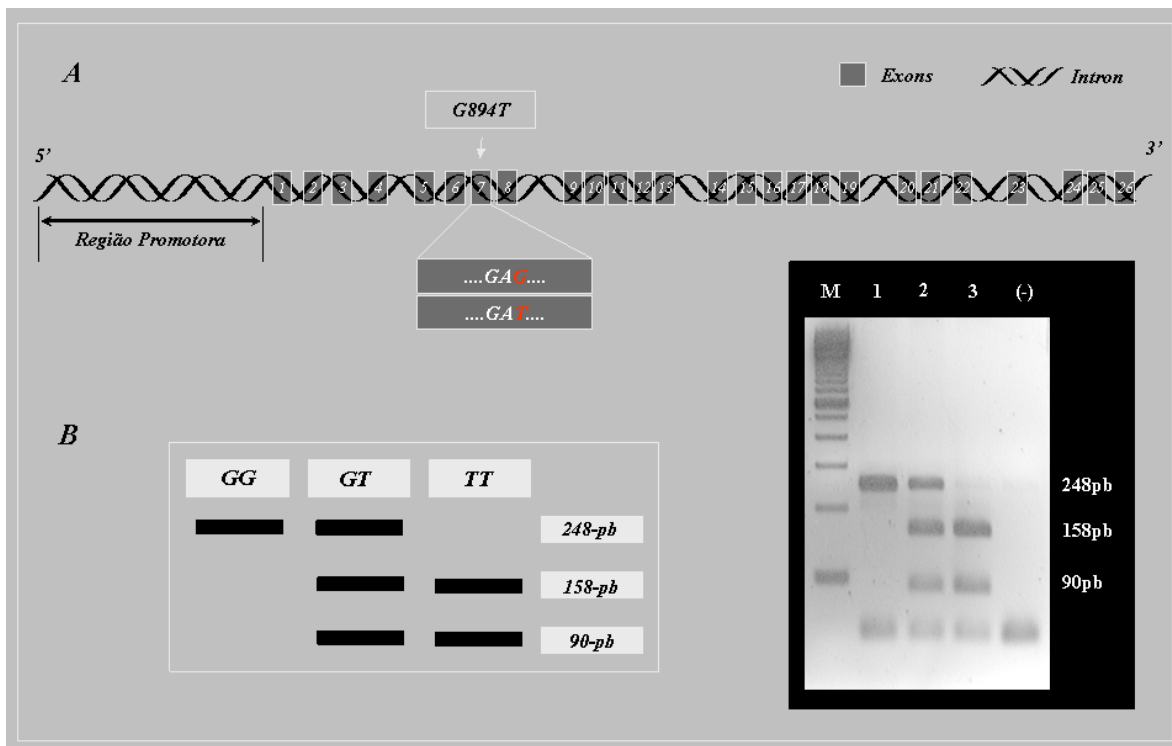


Figura 1 – **A**) Esquema representativo do gene da eNOS caracterizando a troca do nucleotídeo guanina (G) por timina (T) na posição 894 do cDNA da eNOS. **B**) Esquema representativo do gel de agarose a 2% e os fragmentos de 158-pb e 90-pb gerados pela enzima de restrição *Mbo*I na presença do alelo 894T. *M*: marcador de peso molecular (100 pb DNA ladder/ GIBCO BRL); (-): controle negativo; *1*: genótipo GG (248pb); *2*: genótipo GT (248, 158 e 90pb); *3*: genótipo TT (158 e 90pb).

A genotipagem foi realizada utilizando-se a técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), onde o DNA genômico é submetido a uma reação de cadeia da polimerase (PCR) com os *primers* correspondentes à região alvo de amplificação. Posteriormente ao PCR, as amostras foram submetidas à digestão enzimática por enzima de restrição para a detecção do alelo mutante. Um esquema representativo do gene da isoforma endotelial da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) pode ser visualizado na Figura 1A.

A variante estudada, localizada no exon 7, consiste na troca do nucleotídeo guanina (G) por timina (T) na posição 894 do cDNA da eNOS. Tal mutação resulta na alteração do aminoácido glutamato (Glu) por aspartato (Asp) no codon 298 da enzima recebendo, portanto, a denominação “Glu298Asp”. Os genótipos GG, GT e TT foram identificados por reação em cadeia da polimerase (PCR) seguidos por RFLP (Miyamoto et al., 1998). Resumidamente, os primers para PCR foram construídos para a amplificação de um fragmento de 248-pb, contendo a posição 894 do gene (sense and antisense primers; 5'-AAGGCAGGAGACAGTGGATGGA-3' e 5'-CCCAGTCAATCCCTTTGGTGCTCA-3', respectivamente). A mutação *missense*, resultante da presença do nucleotídeo T na posição 894, é reconhecida pela enzima de restrição *MboI* gerando, portanto, dois fragmentos de 158-pb e 90-pb de comprimento. O produto da digestão foi posteriormente analisado em gel de agarose a 2% (Figura 1B).

Uma nova genotipagem randomizada com 150 amostras foi realizada posteriormente por outro técnico e nenhuma misgenotipagem foi detectada.

Fluxo Sangüíneo Muscular

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

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

Pressão Arterial e Frequência Cardíaca

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

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

Exercício de *Handgrip*

O exercício de *handgrip* foi realizado por prensão da mão, utilizando-se de um dinamômetro. O exercício foi sempre realizado com o braço dominante. Após a obtenção da máxima contração voluntária (MCV; média de 3 tentativas) foi calculado um valor

correspondente a 30% do máximo (Tombetta et al., 2003). Este valor foi posteriormente utilizado durante os três minutos do exercício isométrico.

Punção Arterial e Infusão de Drogas

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

Atividade Nervosa Simpática Muscular

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

Protocolos Experimentais

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

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

» ***Manhã do exame:*** não ingerir líquido em alta quantidade; Não ingerir produtos que contenham cafeína em sua composição; Não ingerir manteiga, margarina, requeijão ou qualquer outro produto que contenha alto teor de gordura em sua composição; Não realizar qualquer atividade física de média ou alta intensidade.

Protocolo I

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

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

Protocolo II

Quinze indivíduos (8 GG e 7 TT; ver “Casuística” para detalhes da amostra populacional) foram reavaliados. A preparação para a realização do protocolo experimental procedia da seguinte forma: Os eletrodos para a obtenção do sinal eletrocardiográfico eram colocados e o indivíduo posicionado em uma maca na posição supina; O membro superior não dominante era posicionado em extensão lateral e, após

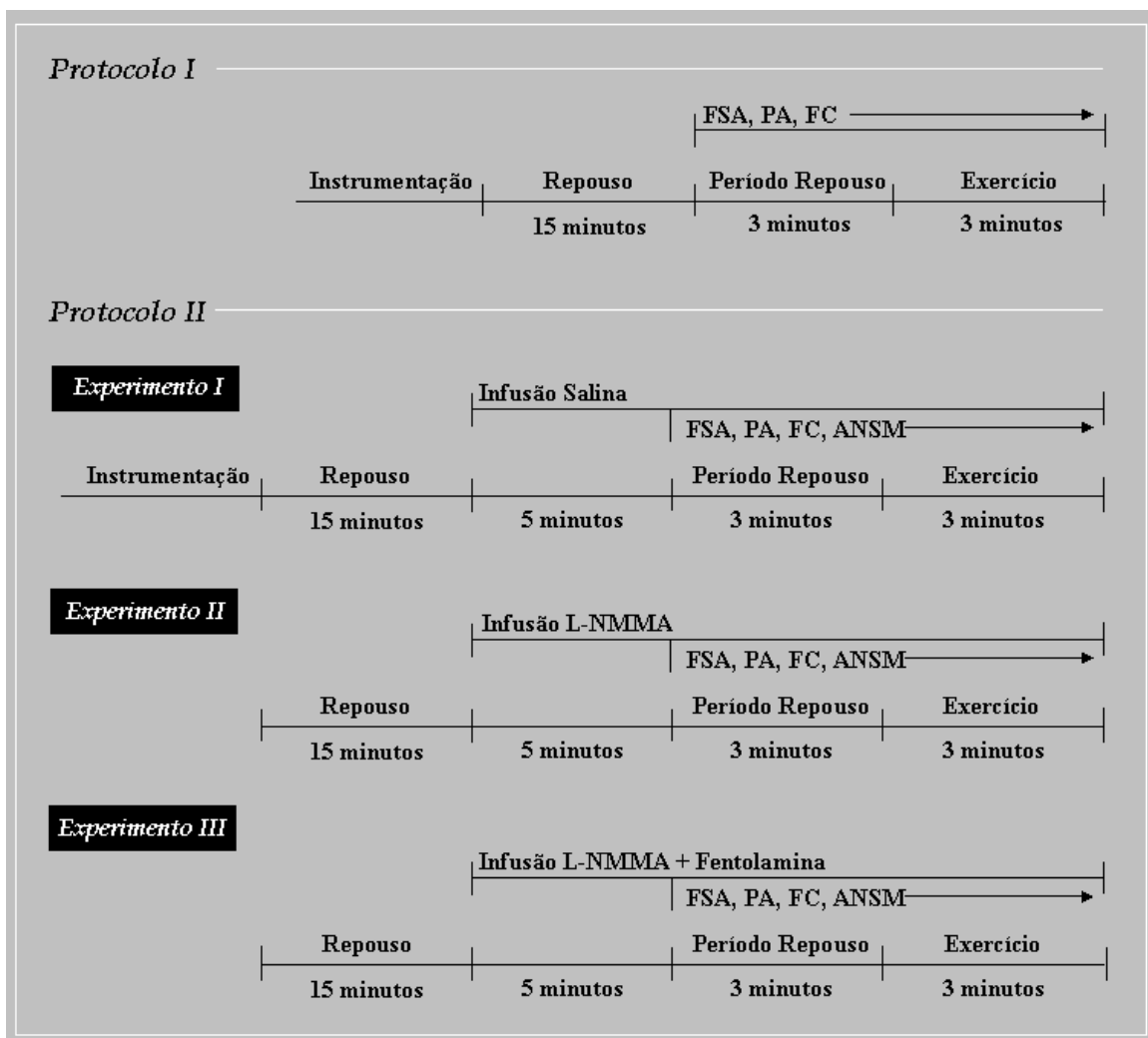


Figura 2 – Protocolos experimentais. FSA, fluxo sanguíneo no antebraço; PA, pressão arterial; FC, frequência cardíaca; ANSM, atividade nervosa simpática muscular.

assepsia e anestesia subcutânea do local, era então realizada a punção da artéria braquial. Posteriormente à punção e conexão do cateter e do equipo transdutor de pressão, os acessórios do conjunto de pletismografia eram posicionados para a obtenção das curvas de fluxo sanguíneo no antebraço. Na seqüência, a perna era posicionada para a microneurografia. Caso a tentativa de aquisição de um sinal nervoso passível de análise excedesse 60 minutos, o exame era iniciado sem o registro do nervo. Após vinte minutos decorridos da instrumentação, dava-se início à seqüência experimental. O Protocolo II com suas respectivas seqüências de administração das drogas está esquematizado na Figura 2.

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

No Experimento II o inibidor não-seletivo N^G -monometil-*L*-arginina (L-NMMA) (Clinalfa AG, Laufelfingen, Switzerland) foi administrado para o bloqueio local das óxido nítrico sintases (4 mg/min.; 0,5 ml/min.) (Dietz et al., 1994; Dyke et al., 1995; Dietz et al., 1997; Joyner & Dietz, 1997; Joyner e Dietz, 2003). Se a diferença na resposta vasodilatadora reflexa entre os genótipos fosse consequência de alterações na biodisponibilidade do NO, a administração intra-arterial do L-NMMA iria abolir a diferença entre os genótipos GG e TT. Antes do início do registro das variáveis, foi realizada uma pré-infusão (5 min.) para saturação do antebraço. Na seqüência o registro foi feito no período basal (3 min.) e durante o exercício de handgrip a 30% da máxima contração voluntária (3 min.), totalizando 11 minutos de infusão.

No Experimento III, em associação com o L-NMMA (4 mg/min.; 0,5 ml/min.), o bloqueador seletivo fentolamina (Regitine[®], Ciba Pharmaceutical Co., Summit, NJ, USA) foi administrado para o bloqueio local dos receptores α -adrenérgicos pós-sinápticos (100 μ g/min.; 0,5 ml/min.) (Dietz et al., 1997; Joyner & Dietz, 1997; Joyner e Dietz, 2003). Se a prejudicada resposta vasodilatadora reflexa observada no genótipo TT fosse consequência de uma atividade nervosa simpática aumentada, o duplo bloqueio iria abolir

a diferença entre os genótipos. Antes do início do registro das variáveis, foi realizada uma pré-infusão (5 min.) para saturação do antebraço. Na sequência o registro foi feito no período basal (3 min.) e durante o exercício de handgrip a 30% da máxima contração voluntária (3 min.), totalizando 11 minutos de infusão.

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

Análise Estatística

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

RESULTADOS

Distribuição dos Alelos

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

Medidas Basais

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

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

Respostas Hemodinâmicas e Neurovasculares Durante o Exercício

O comportamento das variáveis hemodinâmicas e neurovasculares em resposta ao exercício estão apresentados na Tabela 2. Durante o exercício isométrico, a frequência cardíaca aumentou progressivamente e de forma significativa entre os genótipos GG, GT e TT, não havendo diferença entre eles. Este mesmo resultado foi observado na pressão arterial média. Durante o exercício isométrico, a pressão arterial média aumentou progressivamente e de forma semelhante entre os genótipos.

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

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

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

As respostas reflexas de fluxo sanguíneo no antebraço e condutância vascular no antebraço ao exercício dos indivíduos com genótipo GG, GT e TT estão representadas na Figura 3. Durante o exercício isométrico o fluxo sanguíneo no antebraço contralateral aumentou progressivamente e de forma significativa nos genótipos GG e GT. Em contraste, o fluxo sanguíneo no antebraço aumentou levemente nos indivíduos com genótipo TT. A comparação entre os genótipos mostrou que o aumento no fluxo sanguíneo no antebraço foi significativamente maior no genótipo GG e GT, quando comparado ao genótipo TT. Valores similares aos de fluxo sanguíneo no antebraço foram encontrados quando a variável analisada foi a condutância vascular no antebraço. Durante o exercício isométrico a condutância vascular no antebraço contralateral aumentou progressivamente e de forma significativa entre os genótipos GG e GT sendo que este aumento ocorreu de forma atenuada no genótipo TT. A comparação entre os genótipos mostrou que o aumento na condutância vascular no antebraço foi significativamente maior no genótipo GG e GT, quando comparado ao genótipo TT.

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

		Variáveis hemodinâmicas			
		Basal	Exercício		
			1 min	2 min	3 min
FC, bpm	<i>GG</i>	69±2	3±1‡	6±1‡	10±1‡
	<i>GT</i>	69±4	4±1	7±2	11±1
	<i>TT</i>	63±3	4±1	8±2	12±1
PAM, mmHg	<i>GG</i>	91±3	3±1	8±2‡	15±2‡
	<i>GT</i>	94±2	1±1	8±2	12±2
	<i>TT</i>	95±3	3±1	9±2	14±2

		Variáveis neurovasculares			
		Basal	Exercício		
			1 min	2 min	3 min
FSA, mL.min⁻¹.100 mL⁻¹	<i>GG</i>	1.81±0.09	0.32±0.06	0.54±0.07♦	0.87±0.08♦
	<i>GT</i>	1.80±0.23	0.48±0.17	0.66±0.21♦	0.89±0.24♦
	<i>TT</i>	1.79±0.17	0.02±0.02	0.14±0.05†	0.31±0.12†
CVA, unidades	<i>GG</i>	2.03±0.12	0.29±0.09	0.41±0.10♦	0.57±0.09♦
	<i>GT</i>	1.90±0.24	0.46±0.16	0.52±0.20♦	0.64±0.21♦
	<i>TT</i>	1.89±0.17	-0.03±0.03	-0.02±0.08†	0.07±0.14†

FC= frequência cardíaca; PAM= pressão arterial média; FSA= fluxo sanguíneo no antebraço; CVA= condutância vascular no antebraço. Valores apresentados como média ± EPM. ♦ diferente do basal; † diferente dos genótipos GG e GT; ‡ ambos os genótipos diferente do basal. *Two-way* ANOVA seguido de *Scheffé's post-hoc*. $P < 0.05$

Medidas Basais com Infusão de Drogas Vasoativas

Os valores basais de frequência cardíaca e pressão arterial média durante as três seqüências de infusão estão apresentados na Tabela 3 e os valores basais de fluxo sanguíneo no antebraço, condutância vascular no antebraço e atividade nervosa simpática muscular na Tabela 4. A infusão de L-NMMA e L-NMMA + fentolamina não alterou a

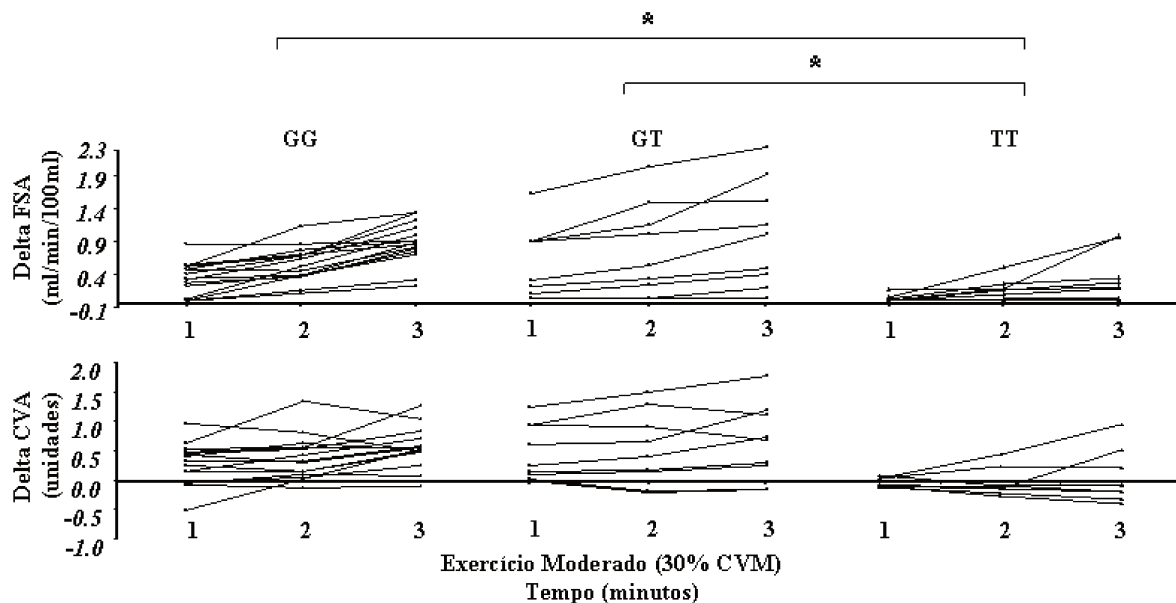


Figura 3 – Comportamento individual da resposta (variação absoluta) reflexa do fluxo sanguíneo no antebraço (FSA) e condutância vascular no antebraço (CVA) ao exercício de *handgrip* a 30% da contração voluntária máxima (CVM) em indivíduos codificados com GG, GT e TT para o gene da eNOS. Observe que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

frequência cardíaca, a pressão arterial média e a atividade nervosa simpática muscular nos dois genótipos estudados. Os valores basais de fluxo sanguíneo no antebraço não foram diferentes entre os genótipos GG e TT. A infusão de L-NMMA reduziu o fluxo sanguíneo no antebraço, em média, 22% nos indivíduos com genótipo GG e 23% nos indivíduos com genótipo TT (Tabela 4; Figura 4). A infusão do L-NMMA associado à fentolamina aumentou o fluxo sanguíneo no antebraço, em média, 51% nos indivíduos

com genótipo GG e 38% nos indivíduos com genótipo TT, quando comparado à infusão de salina. Quando comparado à infusão de L-NMMA, a infusão de L-NMMA associado à fentolamina aumentou o fluxo sanguíneo no antebraço, em média, 92% ($p<0.05$) nos indivíduos com genótipo GG e 80% ($p<0.05$) nos indivíduos com genótipo TT (Figura 4).

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

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

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

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

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

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

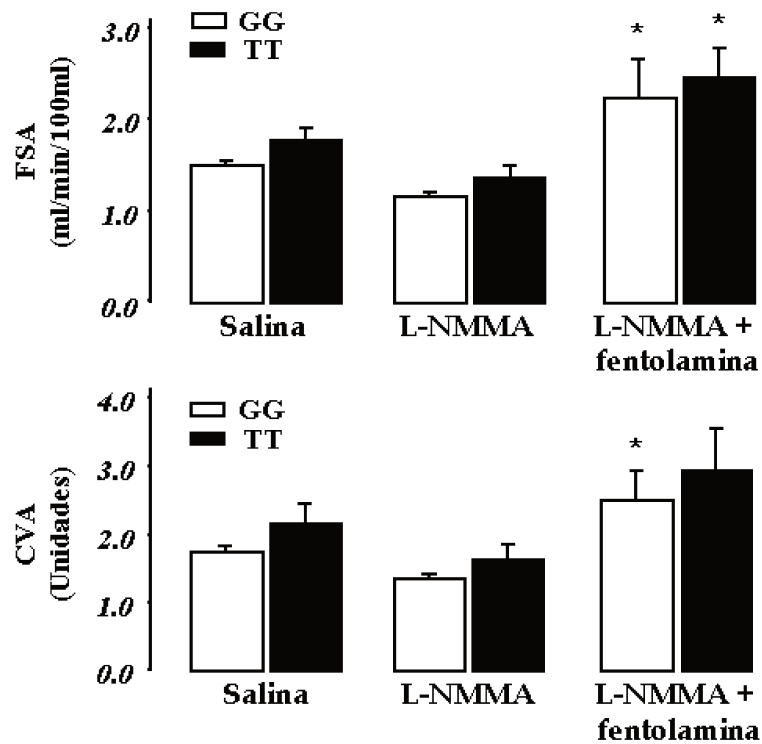


Figura 4 – Valores basais de fluxo sanguíneo no antebraço (FSA) e condutância vascular no antebraço (CVA) durante a infusão de infusão de salina, L-NMMA e L-NMMA + fentolamina em indivíduos codificados com GG (n=8) e TT (n=7) para o gene da eNOS. * vs. L-NMMA. *One-way ANOVA. P<0.05.*

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

Os valores das variáveis frequência cardíaca e pressão arterial média em resposta ao exercício estão apresentados na Tabela 3 e os valores das variáveis fluxo sanguíneo no antebraço, condutância vascular no antebraço e atividade nervosa simpática muscular em resposta ao exercício na Tabela 4. A infusão de salina, L-NMMA e L-NMMA + fentolamina não alterou o comportamento da frequência cardíaca, pressão arterial média e atividade nervosa simpática muscular nos genótipos GG e TT. Durante o exercício isométrico, a frequência cardíaca aumentou de forma significativa nos genótipos GG e TT, não havendo diferença entre eles (Figura 5). Este mesmo resultado foi observado na pressão arterial média. Durante o exercício isométrico, a pressão arterial média aumentou de forma significativa em ambos os genótipos, sendo o comportamento semelhante entre eles (Figura 5). A atividade nervosa simpática muscular aumentou de forma significativa durante o exercício isométrico nos genótipos GG e TT, não havendo diferença entre eles (Figura 6).

Durante a infusão de salina, o fluxo sanguíneo no antebraço contralateral aumentou progressivamente e de forma significativa no genótipo GG em resposta ao exercício isométrico. Em contraste, o fluxo sanguíneo no antebraço aumentou levemente nos indivíduos com genótipo TT (Figura 7). A comparação entre os genótipos mostrou que o aumento no fluxo sanguíneo no antebraço foi significativamente maior no genótipo GG quando comparado ao genótipo TT. Estes dados reproduzem os resultados previamente encontrados no Protocolo I. Durante a infusão do L-NMMA, o fluxo sanguíneo no antebraço contralateral não se alterou no genótipo TT em resposta ao exercício isométrico. No entanto, o fluxo sanguíneo no antebraço contralateral foi significativamente reduzido no genótipo GG (em média 68% - valor de pico) para valores similares aos valores de fluxo sanguíneo no antebraço do genótipo TT. Durante a infusão do L-NMMA associado à fentolamina, o fluxo sanguíneo no antebraço contralateral aumentou simultaneamente em ambos os genótipos estudados (Figura 7).

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

Fluxo sanguíneo no antebraço, ml.min⁻¹.100 ml⁻¹					
		Basal	Exercício		
			1 min	2 min	3 min
Salina	<i>GG</i>	1.48 ± 0.07	0.65±0.11♦	0.84±0.11♦	0.81±0.11♦
	<i>TT</i>	1.77 ± 0.14	0.13±0.13†	0.26±0.16†	0.16±0.18†
L-NMMA	<i>GG</i>	1.16 ± 0.04	0.18±0.08	0.23±0.09	0.26±0.08
	<i>TT</i>	1.36 ± 0.13	0.12±0.08	0.16±0.11	0.08±0.12
L-NMMA + fentolamina	<i>GG</i>	2.23 ± 0.42*	0.55±0.20‡	1.03±0.24‡	1.42±0.30‡
	<i>TT</i>	2.44 ± 0.33*	0.35±0.20	0.78±0.28	0.80±0.13

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

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

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

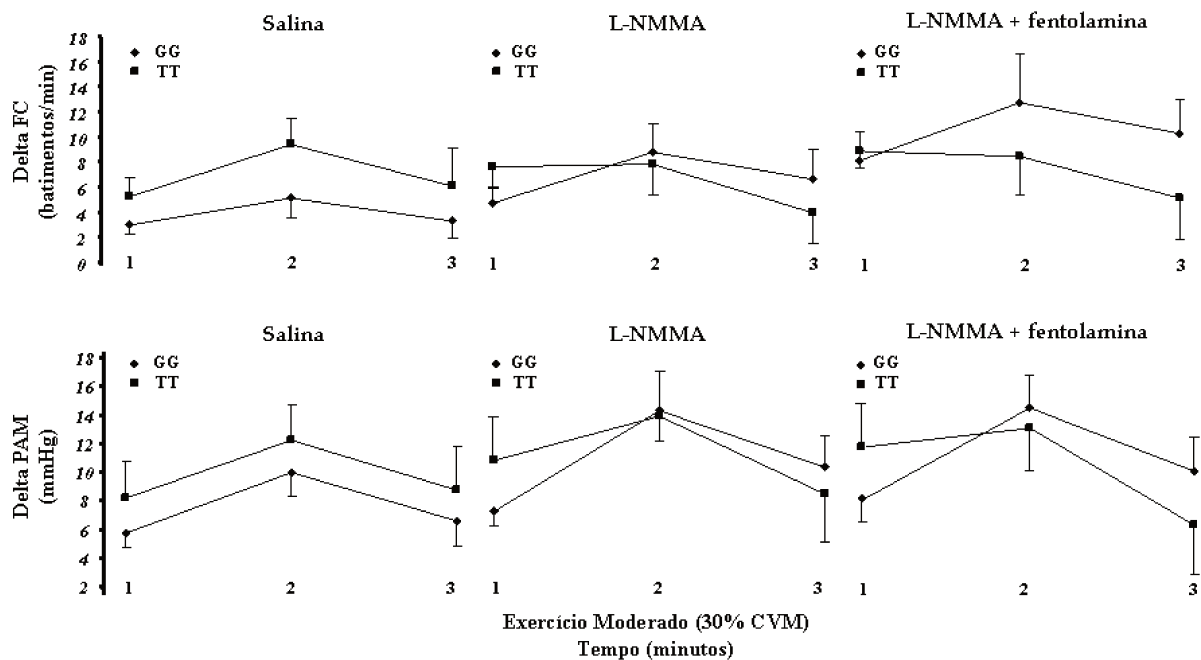


Figura 5 – Comportamento (variação absoluta) da frequência cardíaca (FC) e da pressão arterial média (PAM) em resposta ao exercício de *handgrip* a 30% da contração voluntária máxima (CVM) com infusão de salina, L-NMMA e L-NMMA associado à fentolamina em indivíduos codificados com GG (n=8) e TT (n=7)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

Valores similares aos de fluxo sanguíneo no antebraço foram encontrados quando a variável analisada foi a condutância vascular no antebraço. Durante a infusão de salina, a condutância vascular no antebraço contralateral aumentou progressivamente e de forma significativa no genótipo GG em resposta ao exercício isométrico. Em contraste, a condutância vascular no antebraço aumentou levemente nos indivíduos com genótipo TT (Figura 7). A comparação entre os genótipos mostrou que o aumento na condutância vascular no antebraço foi significativamente maior no genótipo GG quando comparado ao genótipo TT. Durante a infusão do L-NMMA, a condutância vascular no antebraço contralateral não se alterou no genótipo TT em resposta ao exercício isométrico.

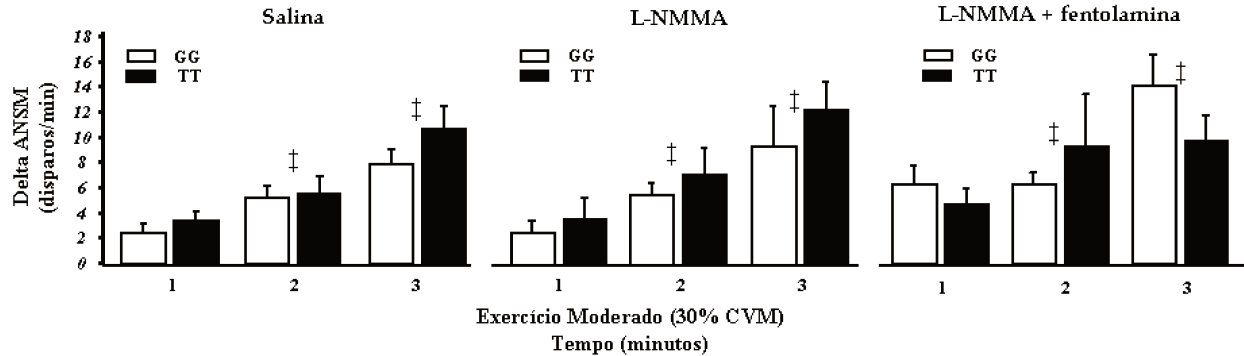


Figura 6 – Comportamento (variação absoluta) da atividade nervosa simpática muscular (ANSM) em resposta ao exercício de *handgrip* a 30% da contração voluntária máxima (CVM) com infusão de salina, L-NMMA e L-NMMA associado à fentolamina em indivíduos codificados com GG e TT para o gene da eNOS. ‡ ambos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

No entanto, a condutância vascular no antebraço contralateral foi significativamente reduzida no genótipo GG (em média 82% - valor de pico) para valores similares aos valores de condutância vascular no antebraço do genótipo TT. Durante a infusão do L-NMMA associado à fentolamina, a CVA contralateral aumentou simultaneamente em ambos os genótipos estudados, não havendo diferença entre eles (Figura 7). As respostas de atividade nervosa simpática muscular foram semelhantes entre os dois genótipos estudados, tanto com a infusão de L-NMMA quanto com a infusão do L-NMMA associado à fentolamina (Figura 6).

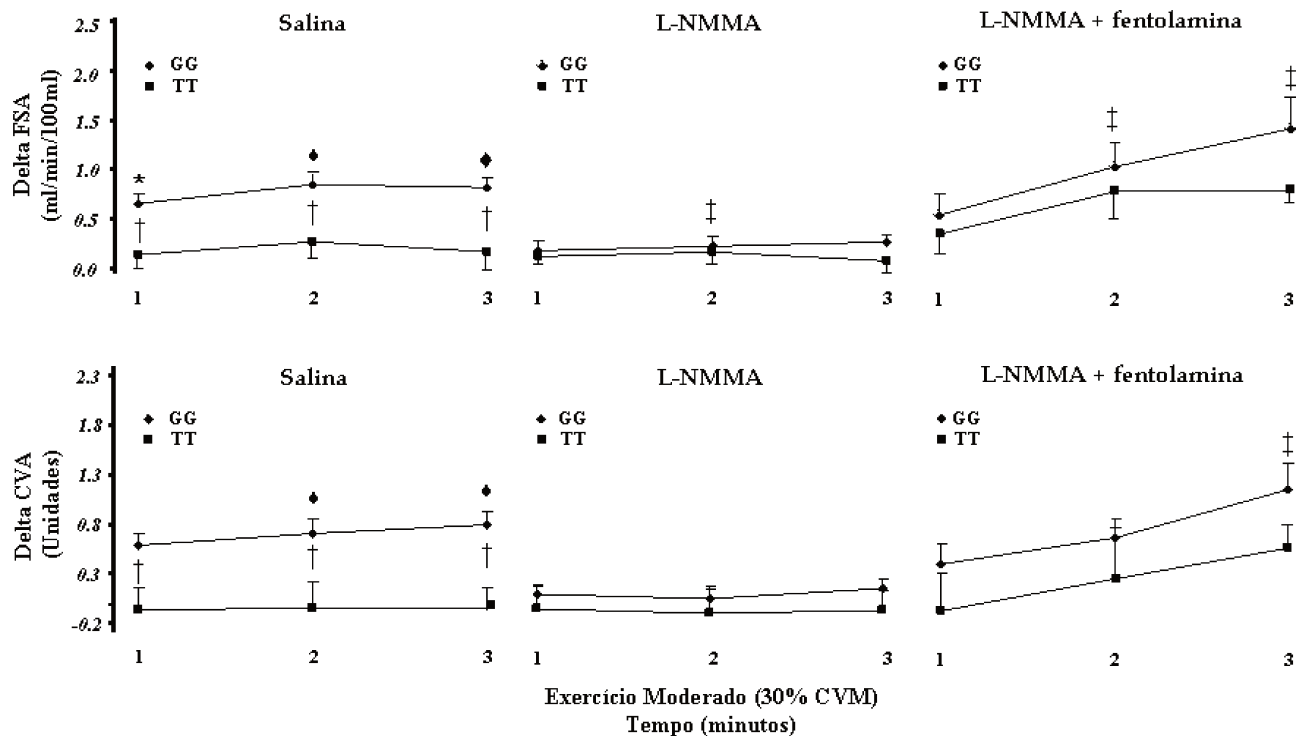


Figura 7 – Comportamento (variação absoluta) do fluxo sangüíneo no antebraço (FSA) e condutância vascular no antebraço (CVA) em resposta ao exercício de handgrip a 30% da contração voluntária máxima (CVM) com infusão de salina, L-NMMA e L-NMMA associado à fentolamina em indivíduos codificados com GG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

DISCUSSÃO

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

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

Em condições basais e durante manobras fisiológicas, incluindo o exercício físico, a reatividade vascular obedece ao comando antagônico das forças vasodilatadoras e vasoconstritoras. Embora este fenótipo obedeça ao controle de múltiplas vias de

sinalização, parte da resposta vascular é mediada pela produção endotelial do NO e parte mediada pelo tono simpático vasoconstritor (Joyner & Dietz, 1997; Santos et al., 2005). Na condição de repouso, o NO participa da modulação do tônus vascular basal e o fluxo sanguíneo parece não ser afetado pela variante G894T do gene da eNOS. A infusão intra-arterial de L-NMMA reduziu o fluxo sanguíneo no antebraço, em média, 22% e essa redução foi semelhante entre os genótipos GG e TT. A infusão do L-NMMA associado à fentolamina, quando comparado à infusão do L-NMMA isoladamente, aumentou o fluxo sanguíneo no antebraço, em média, 86% e também de forma semelhante entre os genótipos. Estes resultados evidenciam que a restrição vasodilatadora mediada pelo tono vasoconstritor simpático é significativamente maior do que a vasodilatação NO-dependente na regulação do tônus vascular basal. Estudos prévios demonstraram que durante manobras fisiológicas a vasodilatação muscular é mediada, pelo menos em parte, pelo aumento da produção do NO (Dyetz et al., 1997). Neste estudo, a resposta vasodilatadora reflexa diminuída ao exercício, observada no genótipo TT, não foi alterada com a infusão do L-NMMA. Em contraste, a infusão do L-NMMA aboliu a resposta vasodilatadora reflexa no genótipo GG para valores similares aos observados no genótipo TT, o que sugere que a resposta vasodilatadora muscular diminuída no genótipo TT é decorrente de uma menor biodisponibilidade de NO. Parece improvável que a vasodilatação muscular reflexa alterada no genótipo TT seja explicada por uma hiperatividade nervosa simpática. A mensuração da descarga eferente simpática, avaliada de forma direta pela técnica de microneurografia, mostrou que os níveis de atividade nervosa simpática muscular não são diferentes entre os genótipos. A noradrenalina liberada na fenda sináptica atua sobre os receptores α -adrenérgicos, mediadores da contração do músculo liso vascular. Dietz et al. (1997) e Eklund & Kaijser (1976) demonstraram que a administração intra-arterial de antagonistas α -adrenérgicos elimina virtualmente a vasoconstrição em leito muscular. Portanto, poderia ser questionado o fato de que, embora a atividade nervosa simpática muscular tenha mostrado ser semelhante entre os genótipos, uma alteração na expressão do gene do receptor α -adrenérgico e/ou alterações pós-transcricionais do mesmo poderia estar envolvidas na modulação das diferentes respostas entre os genótipos. Para excluir esta possibilidade, foi adotada a estratégia de duplo bloqueio, ou seja, a infusão do L-NMMA associado à fentolamina.

Este procedimento provocou aumento semelhante na resposta vasodilatadora reflexa em ambos os genótipos. Assim, esses resultados reforçam a idéia de que a reduzida vasodilatação reflexa observada no genótipo TT é consequência de uma redução na biodisponibilidade do NO, mas não de uma atividade nervosa simpática aumentada.

A regulação da reatividade vascular obedece ao comando de múltiplas moléculas e estas, por sua vez, estão na dependência do controle de seus respectivos genes. A estimulação dos receptores β_2 -adrenérgicos do vaso induz o relaxamento do músculo liso vascular. Magmudar et al. (1999) demonstraram em humanos que parte desta vasodilatação é mediada pelo NO, uma vez que a administração do L-NMMA reduziu, em 25% a vasodilatação induzida por ritodrine. Em adição, variantes genéticas na via β -adrenérgica poderiam explicar parte da variabilidade encontrada no fenótipo de vasodilatação. Trombetta et al. (2003) verificaram que mulheres obesas e portadoras dos dois alelos Gly¹⁶/Glu²⁷ para o receptor β_2 -adrenérgico, apresentavam vasodilatação muscular reflexa aumentada em resposta ao exercício. Estes resultados poderiam explicar, pelo menos em parte, a variabilidade na vasodilatação muscular reflexa quando os indivíduos são comparados dentro de cada genótipo (Figura 3). Esta variabilidade interindividual é passível de observação em fenótipos controlados por múltiplos genes, um fenômeno caracterizado como interação gene-gene.

Limitações

Embora os resultados alcançados permitam apontar a biodisponibilidade reduzida do NO como a causa da redução na vasodilatação muscular reflexa observada no genótipo TT, apenas especulações podem ser feitas com relação às possíveis formas de modulação do fenótipo pelo polimorfismo G894T do gene da eNOS. Até o momento, os potenciais mecanismos moleculares envolvidos na disfunção da enzima eNOS não são totalmente compreendidos. Variantes na sequência de bases do DNA podem afetar desde o processo de transcrição de um gene, até regulações pós-transcricionais e atividade enzimática. Hingorani (2001) sugere que alterações na sequência de bases na região promotora do gene afetariam a expressão do mesmo, enquanto alterações em regiões

exônicas estariam envolvidas na modulação da atividade biológica da proteína. O RNAm transcrito pelo alelo T894 é traduzido numa sequência polipeptídica com o aminoácido aspartato na posição 298, uma vez que o alelo G894 gera uma sequência polipeptídica com o aminoácido glutamato nesta posição. Embora a substituição seja conservativa, o resíduo 298 está localizado externamente no domínio oxidativo da enzima, local onde se encontram os sítios de ligação da L-arginina e do co-fator tetrahydrobiopterina (BH₄). Estudos utilizando-se de proteína recombinante revelaram não haver diferença na atividade enzimática das duas formas protéicas (Hingorani, 2001). Embora a substituição do glutamato pelo aspartato no resíduo 298 da enzima pareça não afetar a atividade enzimática *in vitro*, Tesouro et al. (2000) demonstraram que o resíduo Asp298 é mais susceptível à clivagem proteolítica, precisamente na posição Asp²⁹⁸-Pro²⁹⁹. Posteriormente, Fairchild et al. (2001) verificaram que o resultado do estudo anterior era um artefato dos métodos de preparação do experimento. Mesmo sob a luz de tais contradições, não pode ser descartada a hipótese de que, *in vivo*, um desconhecido mecanismo de clivagem proteolítica ou um mecanismo de regulação pós-transcricional esteja sendo modulado pelo resíduo Asp298. A reduzida biodisponibilidade do NO ainda pode ser resultante de um *locus* funcional em algum outro local do gene ou em sua vizinhança, que esteja em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo G894T. Mesmo este polimorfismo não sendo a causa direta do fenótipo caracterizado, isso não exclui a possibilidade de que tal variante genética seja utilizada como um marcador de um *locus* funcional.

Estudos de associação em genética não são de fáceis interpretações, já que um único gene exerce apenas uma pequena ou moderada modulação num determinado fenótipo. Embora este raciocínio seja particularmente verdadeiro no caso da reatividade vascular, um fenótipo modulado por múltiplos genes, os resultados do presente estudo são consistentes com o fato de que a biodisponibilidade do NO está fundamentalmente envolvida na regulação do fluxo sanguíneo muscular no genótipo GG. A vasodilatação muscular reflexa foi abolida em resposta ao exercício isométrico de *handgrip* quando o L-NMMA foi administrado na artéria braquial. Esta evidência sugere uma alta funcionalidade do gene da eNOS na modulação da responsividade vascular no genótipo GG durante manobras fisiológicas. Por outro lado, a reduzida biodisponibilidade do NO

parece explicar, pelo menos em parte, a prejudicada vasodilatação muscular reflexa no genótipo TT, uma vez a administração de L-NMMA não alterou a reatividade vascular neste grupo.

A atividade nervosa simpática muscular está envolvida na regulação da pressão arterial e na perfusão tecidual, tanto em situações de repouso quanto durante manobras fisiológicas. Nesse caso, poderia se especular que o menor aumento do fluxo sanguíneo no antebraço observado no genótipo TT seria consequência de uma menor pressão de perfusão. Isso parece improvável, uma vez que o aumento na pressão arterial mediada pelo exercício isométrico de handgrip foi similar entre os genótipos GG e TT. Estes resultados sustentam a hipótese de que o aumento do fluxo sanguíneo no antebraço é mediado por vasodilatação local e não por aumento da pressão de perfusão. Além disso, a condutância vascular no antebraço leva em consideração os valores de fluxo sanguíneo e de pressão arterial média, evitando quaisquer confusões decorrentes de diferenças de pressão de perfusão entre os genótipos. Por outro lado, é pouco provável que o reduzido fluxo sanguíneo observado no genótipo TT seja consequência de um débito cardíaco diminuído. Embora o volume de ejeção sistólica não tenha sido analisado, a frequência cardíaca basal e o seu aumento durante o exercício foi semelhante entre os genótipos.

Perspectivas

O presente estudo mostrou que o polimorfismo G894T do gene da eNOS está funcionalmente envolvido na variabilidade vasodilatadora muscular reflexa induzida pelo exercício e que a presença dos dois alelos T894 parece reduzir a biodisponibilidade do NO. Estes resultados sugerem que a carga genética pode influenciar, sobremaneira, a função vascular e que a variante G894T do gene da eNOS pode ser uma candidata utilizada no rastreamento de maior susceptibilidade à doenças cardiovasculares.

Durante o exercício físico, parte da aumentada demanda energética muscular é sustentada pelo aumento no débito cardíaco e da vasodilatação local. Neste caso, seria possível suspeitar que a capacidade aeróbia dos indivíduos portadores do genótipo TT fosse menor que a dos indivíduos com pelo menos um alelo G894. Estudos prévios

demonstraram que o treinamento físico melhora a função endotelial, tanto em indivíduos saudáveis quanto em pacientes cardíacos (Maeda et al., 2004; Walther et al., 2004). Erbs et al. (2005) demonstraram que o treinamento físico melhora a função endotelial de pacientes com doença arterial coronariana estável, genotipados para o polimorfismo G894T do gene da eNOS. Embora o aumento na velocidade média de pico em resposta à acetilcolina, mensurada na artéria mamaria interna esquerda, tenha sido menor no genótipo TT quando comparado aos genótipos GG e GT, o treinamento físico aboliu a paradoxal vasoconstrição observada previamente. Sendo assim, o treinamento físico poderia ser utilizado como uma estratégia não farmacológica visando a melhora da função vascular dos indivíduos portadores do genótipo TT.

CONCLUSÃO

A associação do polimorfismo G894T do gene da eNOS com uma menor reatividade vascular, em consequência de uma menor biodisponibilidade de NO, vem ampliar o nosso conhecimento de que esse fenótipo é, pelo menos em parte, modulado por variantes genéticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMS, V.C. & HILTON, S.M. (1964). The Role of Active Muscle Vasodilatation in the Alerting Stage of the Defence Reaction. *J Physiol*, 171, 189-202.
- ALBRECHT, E.W., STEGEMAN, C.A., HEERINGA, P., HENNING, R.H. & VAN GOOR, H. (2003). Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol*, 199, 8-17.
- ALDERTON, W.K., COOPER, C.E. & KNOWLES, R.G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, 357, 593-615.
- ANDREW, P.J. & MAYER, B. (1999). Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res*, 43, 521-31.
- AYAJIKI, K., KINDERMANN, M., HECKER, M., FLEMING, I. & BUSSE, R. (1996). Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. *Circ Res*, 78, 750-8.
- BAYLIS, C. & VALLANCE, P. (1998). Measurement of nitrite and nitrate levels in plasma and urine--what does this measure tell us about the activity of the endogenous nitric oxide system? *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 7, 59-62.
- BECKMAN, J.S. & KOPPENOL, W.H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*, 271, C1424-37.
- BENJAFIELD, A.V. & MORRIS, B.J. (2000). Association analyses of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in essential hypertension. *Am J Hypertens*, 13, 994-8.
- BLAIR, D.A., GLOVER, W.E., GREENFIELD, A.D. & RODDIE, I.C. (1959). Excitation of cholinergic vasodilator nerves to human skeletal muscles during emotional stress. *J Physiol*, 148, 633-47.
- BOLME, P. & FUXE, K. (1970). Adrenergic and cholinergic nerve terminals in skeletal muscle vessels. *Acta Physiol Scand*, 78, 52-9.
- BONETTI, P.O., LERMAN, L.O. & LERMAN, A. (2003). Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23, 168-75.

- BONNARDEAUX, A., NADAUD, S., CHARRU, A., JEUNEMAITRE, X., CORVOL, P. & SOUBRIER, F. (1995). Lack of evidence for linkage of the endothelial cell nitric oxide synthase gene to essential hypertension. *Circulation*, 91, 96-102.
- CAI, H. & HARRISON, D.G. (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*, 87, 840-4.
- CHARLES, I.G., SCORER, C.A., MORO, M.A., FERNANDEZ, C., CHUBB, A., DAWSON, J., FOXWELL, N., KNOWLES, R.G. & BAYLIS, S.A. (1996). Expression of human nitric oxide synthase isozymes. *Methods Enzymol*, 268, 449-60.
- CHOWDHARY, S. & TOWNEND, J.N. (1999). Role of nitric oxide in the regulation of cardiovascular autonomic control. *Clin Sci (Lond)*, 97, 5-17.
- DAVIS, M.E., CAI, H., DRUMMOND, G.R. & HARRISON, D.G. (2001). Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways. *Circ Res*, 89, 1073-80.
- DAVIS, M.E., GRUMBACH, I.M., FUKAI, T., CUTCHINS, A. & HARRISON, D.G. (2004). Shear stress regulates endothelial nitric-oxide synthase promoter activity through nuclear factor kappaB binding. *J Biol Chem*, 279, 163-8.
- DENNINGER, J.W. & MARLETTA, M.A. (1999). Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta*, 1411, 334-50.
- DIETZ, N.M., ENGELKE, K.A., SAMUEL, T.T., FIX, R.T. & JOYNER, M.J. (1997). Evidence for nitric oxide-mediated sympathetic forearm vasodilatation in humans. *J Physiol*, 498 (Pt 2), 531-40.
- DIETZ, N.M., RIVERA, J.M., WARNER, D.O. & JOYNER, M.J. (1994). Is nitric oxide involved in cutaneous vasodilation during body heating in humans? *J Appl Physiol*, 76, 2047-53.
- DIMMELER, S., FLEMING, I., FISSLTHALER, B., HERMANN, C., BUSSE, R. & ZEIHNER, A.M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, 399, 601-5.
- DIPPLE, K.M. & MCCABE, E.R. (2000). Phenotypes of patients with "simple" Mendelian disorders are complex traits: thresholds, modifiers, and systems dynamics. *Am J Hum Genet*, 66, 1729-35.

- DYKE, C.K., PROCTOR, D.N., DIETZ, N.M. & JOYNER, M.J. (1995). Role of nitric oxide in exercise hyperaemia during prolonged rhythmic handgripping in humans. *J Physiol*, 488 (Pt 1), 259-65.
- EKLUND, B. & KAIJSER, L. (1976). Effect of regional alpha- and beta-adrenergic blockade on blood flow in the resting forearm during contralateral isometric handgrip. *J Physiol*, 262, 39-50.
- ERBS, S., BAITHER, Y., LINKE, A., ADAMS, V., SHU, Y., LENK, K., GIELEN, S., DILZ, R., SCHULER, G. & HAMBRECHT, R. (2003). Promoter but not exon 7 polymorphism of endothelial nitric oxide synthase affects training-induced correction of endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23, 1814-9.
- FABI, F., ARGOLAS, L., CHIAVARELLI, M. & DEL BASSO, P. (1996). Nitric oxide-dependent and -independent modulation of sympathetic vasoconstriction in the human saphenous vein. *Eur J Pharmacol*, 309, 41-50.
- FAIRCHILD, T.A., FULTON, D., FONTANA, J.T., GRATTON, J.P., MCCABE, T.J. & SESSA, W.C. (2001). Acidic hydrolysis as a mechanism for the cleavage of the Glu(298)-->Asp variant of human endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 276, 26674-9.
- FERREIRO, C.R., CHAGAS, A.C., CARVALHO, M.H., DANTAS, A.P., SCAVONE, C., SOUZA, L.C., BUFFOLO, E. & DA LUZ, P.L. (2004). Expression of inducible nitric oxide synthase is increased in patients with heart failure due to ischemic disease. *Braz J Med Biol Res*, 37, 1313-20.
- FRANSEN, U., BANGSBO, J., SANDER, M., HOFFNER, L., BETAK, A., SALTIN, B. & HELLSTEN, Y. (2001). Exercise-induced hyperaemia and leg oxygen uptake are not altered during effective inhibition of nitric oxide synthase with N(G)-nitro-L-arginine methyl ester in humans. *J Physiol*, 531, 257-64.
- FULTON, D., GRATTON, J.P., MCCABE, T.J., FONTANA, J., FUJIO, Y., WALSH, K., FRANKE, T.F., PAPAPETROPOULOS, A. & SESSA, W.C. (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*, 399, 597-601.
- FURCHGOTT, R.F. & ZAWADZKI, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288, 373-6.

- GESQUIERE, L., LOREAU, N. & BLACHE, D. (2000). Role of the cyclic AMP-dependent pathway in free radical-induced cholesterol accumulation in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med*, 29, 181-90.
- GOVERS, R. & RABELINK, T.J. (2001). Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol*, 280, F193-206.
- GRIFFITH, O.W. & STUEHR, D.J. (1995). Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol*, 57, 707-36.
- HANSEN, J., JACOBSEN, T.N. & VICTOR, R.G. (1994). Is nitric oxide involved in the tonic inhibition of central sympathetic outflow in humans? *Hypertension*, 24, 439-44.
- HARRISON, D.G. (1997). Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest*, 100, 2153-7.
- HAYNES, W.G., NOON, J.P., WALKER, B.R. & WEBB, D.J. (1993). Inhibition of nitric oxide synthesis increases blood pressure in healthy humans. *J Hypertens*, 11, 1375-80.
- HEINZEL, B., JOHN, M., KLATT, P., BOHME, E. & MAYER, B. (1992). Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem J*, 281 (Pt 3), 627-30.
- HIBI, K., ISHIGAMI, T., TAMURA, K., MIZUSHIMA, S., NYUI, N., FUJITA, T., OCHIAI, H., KOSUGE, M., WATANABE, Y., YOSHII, Y., KIHARA, M., KIMURA, K., ISHII, M. & UMEMURA, S. (1998). Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension*, 32, 521-6.
- HINGORANI, A.D. (2001). Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis: John French Lecture 2000. *Atherosclerosis*, 154, 521-7.
- HINGORANI, A.D., LIANG, C.F., FATIBENE, J., LYON, A., MONTEITH, S., PARSONS, A., HAYDOCK, S., HOPPER, R.V., STEPHENS, N.G., O'SHAUGHNESSY, K.M. & BROWN, M.J. (1999). A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation*, 100, 1515-20.
- HOGG, N., KALYANARAMAN, B., JOSEPH, J., STRUCK, A. & PARTHASARATHY, S. (1993). Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. *FEBS Lett*, 334, 170-4.

- HOOPER, W.C., LALLY, C., AUSTIN, H., BENSON, J., DILLEY, A., WENGER, N.K., WHITSETT, C., RAWLINS, P. & EVATT, B.L. (1999). The relationship between polymorphisms in the endothelial cell nitric oxide synthase gene and the platelet GPIIb gene with myocardial infarction and venous thromboembolism in African Americans. *Chest*, 116, 880-6.
- IGNARRO, L.J., BUGA, G.M., WOOD, K.S., BYRNS, R.E. & CHAUDHURI, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 9265-9.
- JOYNER, M.J. & DIETZ, N.M. (1997). Nitric oxide and vasodilation in human limbs. *J Appl Physiol*, 83, 1785-96.
- JOYNER, M.J. & DIETZ, N.M. (2003). Sympathetic vasodilation in human muscle. *Acta Physiol Scand*, 177, 329-36.
- KARANTZOULIS-FEGARAS, F., ANTONIOU, H., LAI, S.L., KULKARNI, G., D'ABREO, C., WONG, G.K., MILLER, T.L., CHAN, Y., ATKINS, J., WANG, Y. & MARSDEN, P.A. (1999). Characterization of the human endothelial nitric-oxide synthase promoter. *J Biol Chem*, 274, 3076-93.
- KATO, N., SUGIYAMA, T., MORITA, H., NABIKA, T., KURIHARA, H., YAMORI, Y. & YAZAKI, Y. (1999). Lack of evidence for association between the endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension. *Hypertension*, 33, 933-6.
- KLATT, P., PFEIFFER, S., LIST, B.M., LEHNER, D., GLATTER, O., BACHINGER, H.P., WERNER, E.R., SCHMIDT, K. & MAYER, B. (1996). Characterization of heme-deficient neuronal nitric-oxide synthase reveals a role for heme in subunit dimerization and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem*, 271, 7336-42.
- KOESLING, D. (1999). Studying the structure and regulation of soluble guanylyl cyclase. *Methods*, 19, 485-93.
- KOJDA, G. & HARRISON, D. (1999). Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res*, 43, 562-71.

- KORTH, H.G., SUSTMANN, R., THATER, C., BUTLER, A.R. & INGOLD, K.U. (1994). On the mechanism of the nitric oxide synthase-catalyzed conversion of N omega-hydroxyl-L-arginine to citrulline and nitric oxide. *J Biol Chem*, 269, 17776-9.
- KUBES, P., SUZUKI, M. & GRANGER, D.N. (1991). Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 4651-5.
- LACOLLEY, P., GAUTIER, S., POIRIER, O., PANNIER, B., CAMBIEN, F. & BENETOS, A. (1998). Nitric oxide synthase gene polymorphisms, blood pressure and aortic stiffness in normotensive and hypertensive subjects. *J Hypertens*, 16, 31-5.
- LAMBLIN, N., CUIILLERET, F.J., HELBECQUE, N., DALLONGEVILLE, J., LABLANCHE, J.M., AMOUYEL, P., BAUTERS, C. & VAN BELLE, E. (2005). A common variant of endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is associated with collateral development in patients with chronic coronary occlusions. *BMC Cardiovasc Disord*, 5, 27.
- LEPORI, M., SARTORI, C., TRUEB, L., OWLYA, R., NICOD, P. & SCHERRER, U. (1998). Haemodynamic and sympathetic effects of inhibition of nitric oxide synthase by systemic infusion of N(G)-monomethyl-L-arginine into humans are dose dependent. *J Hypertens*, 16, 519-23.
- LI, R., LYN, D., LAPU-BULA, R., ODUWOLE, A., IGHO-PEMU, P., LANKFORD, B., MORGAN, J., NKEMDECHI, S., LIU, G., PACK, C., SILVESTROV, N., VON DEUTSCH, D.A., SONG, Q., ABUKHALAF, I.K. & OFILI, E. (2004). Relation of endothelial nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide level, endothelial function, and blood pressure in African Americans. *Am J Hypertens*, 17, 560-7.
- LUDMER, P.L., SELWYN, A.P., SHOOK, T.L., WAYNE, R.R., MUDGE, G.H., ALEXANDER, R.W. & GANZ, P. (1986). Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*, 315, 1046-51.
- MAEDA, S., TANABE, T., OTSUKI, T., SUGAWARA, J., IEMITSU, M., MIYAUCHI, T., KUNO, S., AJISAKA, R. & MATSUDA, M. (2004). Moderate regular exercise increases basal production of nitric oxide in elderly women. *Hypertens Res*, 27, 947-53.

- MAJMUDAR, N.G., ANUMBA, D., ROBSON, S.C. & FORD, G.A. (1999). Contribution of nitric oxide to beta2-adrenoceptor mediated vasodilatation in human forearm arterial vasculature. *Br J Clin Pharmacol*, 47, 173-7.
- MALEK, A.M., JIANG, L., LEE, I., SESSA, W.C., IZUMO, S. & ALPER, S.L. (1999). Induction of nitric oxide synthase mRNA by shear stress requires intracellular calcium and G-protein signals and is modulated by PI 3 kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, 254, 231-42.
- MARLETTA, M.A. (1993). Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem*, 268, 12231-4.
- MARLETTA, M.A. (1994). Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*, 78, 927-30.
- MARSDEN, P.A., HENG, H.H., SCHERER, S.W., STEWART, R.J., HALL, A.V., SHI, X.M., TSUI, L.C. & SCHAPPERT, K.T. (1993). Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem*, 268, 17478-88.
- MATSUKAWA, K., SHINDO, T., SHIRAI, M. & NINOMIYA, I. (1993). Nitric oxide mediates cat hindlimb cholinergic vasodilation induced by stimulation of posterior hypothalamus. *Jpn J Physiol*, 43, 473-83.
- MATTHEWS, D.R., HOSKER, J.P., RUDENSKI, A.S., NAYLOR, B.A., TREACHER, D.F. & TURNER, R.C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28, 412-9.
- MAYER, B., JOHN, M., HEINZEL, B., WERNER, E.R., WACHTER, H., SCHULTZ, G. & BOHME, E. (1991). Brain nitric oxide synthase is a biopterin- and flavin-containing multi-functional oxido-reductase. *FEBS Lett*, 288, 187-91.
- MCDONALD, K.K., ZHARIKOV, S., BLOCK, E.R. & KILBERG, M.S. (1997). A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric-oxide synthase may explain the "arginine paradox". *J Biol Chem*, 272, 31213-6.
- MICHEL, T. & FERON, O. (1997). Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest*, 100, 2146-52.

- MILNER, P., KIRKPATRICK, K.A., RALEVIC, V., TOOTHILL, V., PEARSON, J. & BURNSTOCK, G. (1990). Endothelial cells cultured from human umbilical vein release ATP, substance P and acetylcholine in response to increased flow. *Proc Biol Sci*, 241, 245-8.
- MIYAHARA, K., KAWAMOTO, T., SASE, K., YUI, Y., TODA, K., YANG, L.X., HATTORI, R., AOYAMA, T., YAMAMOTO, Y., DOI, Y. & ET AL. (1994). Cloning and structural characterization of the human endothelial nitric-oxide-synthase gene. *Eur J Biochem*, 223, 719-26.
- MIYAMOTO, Y., SAITO, Y., KAJIYAMA, N., YOSHIMURA, M., SHIMASAKI, Y., NAKAYAMA, M., KAMITANI, S., HARADA, M., ISHIKAWA, M., KUWAHARA, K., OGAWA, E., HAMANAKA, I., TAKAHASHI, N., KANESHIGE, T., TERAOKA, H., AKAMIZU, T., AZUMA, N., YOSHIMASA, Y., YOSHIMASA, T., ITOH, H., MASUDA, I., YASUE, H. & NAKAO, K. (1998). Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension*, 32, 3-8.
- MIYANO, H., KAWADA, T., SHISHIDO, T., SATO, T., SUGIMACHI, M., ALEXANDER, J., JR. & SUNAGAWA, K. (1997). Inhibition of NO synthesis minimally affects the dynamic baroreflex regulation of sympathetic nerve activity. *Am J Physiol*, 272, H2446-52.
- MONCADA, S., PALMER, R.M. & HIGGS, E.A. (1989). The biological significance of nitric oxide formation from L-arginine. *Biochem Soc Trans*, 17, 642-4.
- MOUNT, P.F., KEMP, B.E. & POWER, D.A. (2007). Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol*, 42, 271-9.
- NABER, C.K., BAUMGART, D., ALTMANN, C., SIFFERT, W., ERBEL, R. & HEUSCH, G. (2001). eNOS 894T allele and coronary blood flow at rest and during adenosine-induced hyperemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281, H1908-12.
- NEGRAO, C.E., HAMILTON, M.A., FONAROW, G.C., HAGE, A., MORIGUCHI, J.D. & MIDDLEKAUFF, H.R. (2000). Impaired endothelium-mediated vasodilation is not the principal cause of vasoconstriction in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 278, H168-74.

- NEGRAO, C.E., TROMBETTA, I.C., BATALHA, L.T., RIBEIRO, M.M., RONDON, M.U., TINUCCI, T., FORJAZ, C.L., BARRETTO, A.C., HALPERN, A. & VILLARES, S.M. (2001). Muscle metaboreflex control is diminished in normotensive obese women. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281, H469-75.
- PALMER, R.M., FERRIGE, A.G. & MONCADA, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327, 524-6.
- PAPAPETROPOULOS, A., RUDIC, R.D. & SESSA, W.C. (1999). Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*, 43, 509-20.
- PEREIRA, A.C., SPOSITO, A.C., MOTA, G.F., CUNHA, R.S., HERKENHOFF, F.L., MILL, J.G. & KRIEGER, J.E. (2006). Endothelial nitric oxide synthase gene variant modulates the relationship between serum cholesterol levels and blood pressure in the general population: new evidence for a direct effect of lipids in arterial blood pressure. *Atherosclerosis*, 184, 193-200.
- PHILIP, I., PLANTEFEVE, G., VUILLAUMIER-BARROT, S., VICAUT, E., LEMARIE, C., HENRION, D., POIRIER, O., LEVY, B.I., DESMONTS, J.M., DURAND, G. & BENESSIONO, J. (1999). G894T polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with an enhanced vascular responsiveness to phenylephrine. *Circulation*, 99, 3096-8.
- POIRIER, O., MAO, C., MALLET, C., NICAUD, V., HERRMANN, S.M., EVANS, A., RUIDAVETS, J.B., ARVEILER, D., LUC, G., TIRET, L., SOUBRIER, F. & CAMBIEN, F. (1999). Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene - no consistent association with myocardial infarction in the ECTIM study. *Eur J Clin Invest*, 29, 284-90.
- RADOMSKI, M.W., PALMER, R.M. & MONCADA, S. (1987). Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*, 2, 1057-8.
- SANDER, M., HANSEN, P.G. & VICTOR, R.G. (1995). Sympathetically mediated hypertension caused by chronic inhibition of nitric oxide. *Hypertension*, 26, 691-5.
- SANTOS, A.C., ALVES, M.J., RONDON, M.U., BARRETTO, A.C., MIDDLEKAUFF, H.R. & NEGRAO, C.E. (2005). Sympathetic activation restrains endothelium-

- mediated muscle vasodilatation in heart failure patients. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289, H593-9.
- SEARLES, C.D. (2006). Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291, C803-16.
- SHAUL, P.W. & ANDERSON, R.G. (1998). Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am J Physiol*, 275, L843-51.
- SHIMASAKI, Y., YASUE, H., YOSHIMURA, M., NAKAYAMA, M., KUGIYAMA, K., OGAWA, H., HARADA, E., MASUDA, T., KOYAMA, W., SAITO, Y., MIYAMOTO, Y., OGAWA, Y. & NAKAO, K. (1998). Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 31, 1506-10.
- SHIOJIMA, I. & WALSH, K. (2002). Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res*, 90, 1243-50.
- SILACCI, P., FORMENTIN, K., BOUZOURENE, K., DANIEL, F., BRUNNER, H.R. & HAYOZ, D. (2000). Unidirectional and oscillatory shear stress differentially modulate NOS III gene expression. *Nitric Oxide*, 4, 47-56.
- STUEHR, D.J. (1997). Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 37, 339-59.
- SUZUKI, T., OKUMURA, K., SONE, T., KOSOKABE, T., TSUBOI, H., KONDO, J., MUKAWA, H., KAMIYA, H., TOMIDA, T., IMAI, H., MATSUI, H. & HAYAKAWA, T. (2002). The Glu298Asp polymorphism in endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary in-stent restenosis. *Int J Cardiol*, 86, 71-6.
- TESAURO, M., THOMPSON, W.C., ROGLIANI, P., QI, L., CHAUDHARY, P.P. & MOSS, J. (2000). Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 2832-5.
- TODA, N. & OKAMURA, T. (2003). The pharmacology of nitric oxide in the peripheral nervous system of blood vessels. *Pharmacol Rev*, 55, 271-324.
- TROMBETTA, I.C., BATALHA, L.T., RONDON, M.U., LATERZA, M.C., KUNIYOSHI, F.H., GOWDAK, M.M., BARRETTO, A.C., HALPERN, A.,

- VILLARES, S.M. & NEGRAO, C.E. (2003). Weight loss improves neurovascular and muscle metaboreflex control in obesity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285, H974-82.
- TSUKADA, T., YOKOYAMA, K., ARAI, T., TAKEMOTO, F., HARA, S., YAMADA, A., KAWAGUCHI, Y., HOSOYA, T. & IGARI, J. (1998). Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun*, 245, 190-3.
- VALLANCE, P. (1997). Exploring vascular nitric oxide in health and disease. The Goulstonian Lecture 1996. *J R Coll Physicians Lond*, 31, 321-7.
- VALLANCE, P., COLLIER, J. & MONCADA, S. (1989). Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet*, 2, 997-1000.
- VASQUEZ-VIVAR, J., KALYANARAMAN, B., MARTASEK, P., HOGG, N., MASTERS, B.S., KAROUI, H., TORDO, P. & PRITCHARD, K.A., JR. (1998). Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 9220-5.
- VERMA, S., BUCHANAN, M.R. & ANDERSON, T.J. (2003). Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. *Circulation*, 108, 2054-9.
- VILA, E. & SALAICES, M. (2005). Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288, H1016-21.
- VO, P.A., REID, J.J. & RAND, M.J. (1992). Attenuation of vasoconstriction by endogenous nitric oxide in rat caudal artery. *Br J Pharmacol*, 107, 1121-8.
- WALTHER, C., GIELEN, S. & HAMBRECHT, R. (2004). The effect of exercise training on endothelial function in cardiovascular disease in humans. *Exerc Sport Sci Rev*, 32, 129-34.
- WANG, X.L., MAHANEY, M.C., SIM, A.S., WANG, J., BLANGERO, J., ALMASY, L., BADENHOP, R.B. & WILCKEN, D.E. (1997). Genetic contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17, 3147-53.
- WANG, X.L., SIM, A.S., WANG, M.X., MURRELL, G.A., TRUDINGER, B. & WANG, J. (2000). Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *FEBS Lett*, 471, 45-50.

- WANG, X.L. & WANG, J. (2000). Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Mol Genet Metab*, 70, 241-51.
- WEISBROD, C.J., MINSON, C.T., JOYNER, M.J. & HALLIWILL, J.R. (2001). Effects of regional phentolamine on hypoxic vasodilatation in healthy humans. *J Physiol*, 537, 613-21.
- WHITE, C.R., BROCK, T.A., CHANG, L.Y., CRAPO, J., BRISCOE, P., KU, D., BRADLEY, W.A., GIANTURCO, S.H., GORE, J., FREEMAN, B.A. & ET AL. (1994). Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 1044-8.
- YOON, S., MOON, J., SHIN, C., KIM, E., JO, S.A. & JO, I. (2002). Smoking status-dependent association of the 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of endothelial nitric oxide synthase gene with plasma nitric oxide concentrations. *Clin Chim Acta*, 324, 113-20.
- YOSHIMURA, M., YASUE, H., NAKAYAMA, M., SHIMASAKI, Y., SUMIDA, H., SUGIYAMA, S., KUGIYAMA, K., OGAWA, H., OGAWA, Y., SAITO, Y., MIYAMOTO, Y. & NAKAO, K. (1998). A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet*, 103, 65-9.
- ZANZINGER, J., CZACHURSKI, J. & SELLER, H. (1994). Inhibition of sympathetic vasoconstriction is a major principle of vasodilation by nitric oxide in vivo. *Circ Res*, 75, 1073-7.

Anexo I



Mem. CC. 0267

São Paulo, 17 de fevereiro de 2005.

Ao
Prof. Dr. Carlos Eduardo Negrão

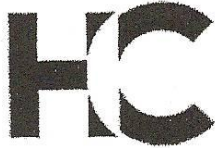
Ref.: Protocolo de Pesquisa SDC 2588/05/008

A Comissão Científica do Instituto do Coração, apreciou na sessão 466/05/02 de 17.2.2005, o Protocolo de Pesquisa SDC 2588/05/008 “**Análise da Atividade Nervosa Simpática e da Vasodilatação Endotélio-Dependente em Indivíduos Portadores do Polimorfismo Glu298Asp da eNOS**”, e foi o seguinte o parecer: “**Aprovado no mérito científico**”.

Atenciosamente,


Selma C. Quiaia Fortunato
Secretária da Comissão Científica
InCor - HC.FMUSP

Anexo II



HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

2092

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 28.04.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 109/05, intitulado: "Análise da Atividade Nervosa Simpática Periférica e da Vasodilatação Endotélio-dependente em Indivíduos Portadores do Polimorfismo Glu298-asp da eNOS" apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA E DE ÉTICA DO INSTITUTO DO CORAÇÃO**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador(a) Responsável: Prof. Dr. Carlos Eduardo Negrão

Pesquisador(a) Executante: Rodrigo Gonçalves Dias

CAPPesq, 28 de abril de 2005.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Anexo III

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE :
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL
.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : Análise da Atividade Nervosa Simpática e da Vasodilatação Endotélio-dependente em Indivíduos Portadores do Polimorfismo Glu298Asp da eNOS.

PESQUISADOR: Rodrigo Gonçalves Dias

CARGO/FUNÇÃO: Doutorado

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº

UNIDADE DO HCFMUSP: Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício do InCor-HC-FMUSP

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 36 meses

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa ; 2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais; 3. desconfortos e riscos esperados; 4. benefícios que poderão ser obtidos; 5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

1. **Justificativa e os objetivos da pesquisa:** Como o senhor/senhora já deve ter ouvido falar, todos nós, seres humanos, temos dentro das células do nosso corpo um código genético, conhecido como DNA. Este DNA é igual para todos nós, mas pode sofrer pequenas alterações que muitas vezes leva a pessoa a ter problemas no coração e na passagem do sangue pelas artérias do corpo. O senhor/senhora está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é verificar como está o fluxo de sangue no seu braço e como o seu cérebro comanda este fluxo de sangue. Estes resultados serão de grande importância, porque nos ajudará a entender a influência de características genéticas no controle da circulação do sangue.

2. **Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais:** **Pletismografia:** serão colocados dois manguitos, um no braço e um no punho, para medição da quantidade de sangue que vai passar pelo braço durante o exame. **Microneurografia:** serão colocadas duas agulhas bem finas na sua perna para sabermos a quantidade de atividade do nervo, ou seja, para sabermos como o seu cérebro controla a quantidade de sangue que passa no seu braço. **Eletrocardiografia:** serão colocados 3 eletrodos no peito para a verificação da frequência cardíaca (número de vezes que o coração bate por minuto). **Cinto Respiratório:** será colocado um cinto logo abaixo do peito para se medir continuamente a respiração (quantas vezes você respira em um minuto). **Punção da Artéria Braquial e Medicamentos:** Será colocada uma agulha numa artéria do seu braço, isto é, um vaso que passa sangue que fica abaixo na veia do braço que normalmente se retira sangue para exames de laboratório. Embora a artéria fique mais profunda que a veia, este procedimento não dói, porque ele será feito depois que for colocada uma substância que anestesia o local da colocação da agulha. A colocação da agulha será feita por um médico/cardiologista que tem bastante experiência neste procedimento. Portanto, você não deve se preocupar com isto. A colocação da agulha na artéria do seu braço será necessária para a aplicação de medicamentos que vão diminuir a passagem de sangue na artéria.

3. **Desconfortos e riscos esperados:** **Pletismografia:** não há riscos, mas poderá haver formigamento passageiro na mão durante a oclusão com o manguito. **Microneurografia:** Não há registros de infecção no local da colocação da agulha em sua perna. O nosso grupo já fez mais de 1000 microneurografias sem nenhum problema de infecção. Durante a colocação das agulhinhas na sua perna, você poderá ter sensação de “choquinho” no peito do pé e dedos do pé, e leve dor no local da agulha. Após o exame você poderá sentir leve dor ou um leve choque ao tocar no local onde foi colocada a agulha ou até um pouco de fraqueza muscular na perna durante as primeiras semanas após o exame. Raramente (1 a cada 600 casos), essas sensações podem durar por um período de até 2 a 3 meses). **Eletrocardiografia:** não há riscos o desconforto. **Cinta Respiratória:** não há riscos ou desconforto. **Infusão Intra-arterial de medicamentos:** Embora não haja descrição de acontecimentos não resolvidos, ou graves, poderá ocorrer risco de infecção (arterite) pela manipulação no local, apesar de todos os cuidados de assepsia que serão tomados. Embora muito pouco provável, poderá ocorrer risco de entrada de ar na artéria, o que poderá ou não ocasionar obstrução da parte mais distante da artéria. Neste caso, será necessário a desobstrução da artéria com a utilização de um catéter. E se o problema persistir, culminando com a diminuição da circulação para a mão, haverá necessidade de cirúrgica de reparação da artéria por meio de enxerto livre com veia. Embora a colocação de medicamentos na sua

artéria vá provocar estreitamento do seu vaso, diminuindo a passagem de sangue no seu antebraço, isto não deve preocupá-lo, porque esta ação ocorre somente no local da aplicação do medicamento. Muitos estudos já demonstraram que estes efeitos somente ocorrem no antebraço, não tendo, portanto, efeitos em nenhum outro local do seu corpo. Já foram realizados em nosso laboratório, mais de 100 procedimentos como este que o senhor (a) irá fazer, sem que houvesse nenhum acidente.

4. Benefícios que poderão ser obtidos: Este estudo é importante para nos auxiliar a entender como as alterações no código genético do ser humano podem influenciar a quantidade de sangue que passa nos vasos do antebraço.

5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo: Não existem procedimentos alternativos que podem ser utilizados neste estudo.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. O senhor terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas.
2. O senhor terá liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da sua assistência.
3. Os resultados de seu exame serão guardados e não fornecidos a ninguém, garantindo a sua privacidade.
4. No caso de intercorrências, a equipe envolvida no estudo assumirá a responsabilidade de prestar a assistência médica necessária ao(a) senhor(a). As intercorrências que necessitem de intervenções médica deverão ser realizadas de imediato pela Dra. Maria Janieire de Nazaré Nunes Alves – Médica Assistente da Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício do Instituto do Coração, HC-FMUSP, co-pesquisadora do projeto.
5. No momento, não existe previsão institucional de indenização para eventuais danos a saúde do(a) senhor(a) decorrentes do estudo. Entretanto, nos comprometemos a dar assistência médica necessária ao(a) senhor(a) para sanar quaisquer danos à sua saúde decorrente do estudo.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Dra. Maria Janieire deNazaré Nunes Alves - Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício - InCor – Av. Dr. Éneas de Carvalho Aguiar, 44 - 1º Subsolo– Tel: 3069-5099/5043/5699 (comercial) ou 9658 9937.

Rodrigo Gonçalves Dias - Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício - InCor – Av. Dr. Éneas de Carvalho Aguiar, 44 1º Subsolo– Tel: 3069-5099/5043/5699 (comercial). Ou (11) 9293 9399

Prof. Dr. Carlos Eduardo Negrão Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício - InCor – Av. Dr. Éneas de Carvalho Aguiar, 44 - 1º Subsolo – Tel: 3069-5099/5043/5699 (comercial) ou 9126-8776

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de _____ de 2007.

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO (Resolução Conselho Nacional de Saúde 196, de 10 outubro 1996)

1. Este termo conterà o registro das informações que o pesquisador fornecerá ao sujeito da pesquisa, em linguagem clara e acessível, evitando-se vocábulos técnicos não compatíveis com o grau de conhecimento do interlocutor.
2. A avaliação do grau de risco deve ser minuciosa, levando em conta qualquer possibilidade de intervenção e de dano à integridade física do sujeito da pesquisa.
3. O formulário poderá ser preenchido em letra de forma legível, datilografia ou meios eletrônicos.
4. Este termo deverá ser elaborado em duas vias, ficando uma via em poder do paciente ou seu representante legal e outra deverá ser juntada ao prontuário do paciente.
5. A via do Termo de Consentimento Pós-Informação submetida à análise da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa -CAPPesq deverá ser idêntica àquela que será fornecida ao sujeito da pesquisa.

Anexo IV



Sociedade Brasileira de Cardiologia



Confere o

Prêmio Eduardo Moacyr Brieger a

Rubio Gonzalez Dias

Por ter obtido o 1º lugar entre os Melhores Temas Livres Orais
na categoria Pesquisa Básica/Experimental no 63º Congresso Brasileiro de Cardiologia.

Cartão, 07 de setembro de 2008.

Antonio Carlos Palandri Chagas

Antonio Carlos Palandri Chagas
Presidente da SBC

Paulo Roberto Ferreira Rossi

Paulo Roberto Ferreira Rossi
Presidente do 63º Congresso da SBC

Luiz Antonio Campos

Luiz Antonio de Almeida Campos
Diretor Científico da SBC



Anexo V

Word count of manuscript: 5,987

Word count of abstract: 245

Total number of figures: 4

Total number of tables: 3

Glu298Asp eNOS Gene Polymorphism Causes Attenuation in Exercise-Induced Reflex
Muscle Vasodilatation

Rodrigo G. Dias^{1,2}; Maria J. N. Alves¹, MD, PhD; Alexandre C. Pereira, MD, PhD¹,
Maria Urbana P.B. Rondon, PhD¹; Marcelo R. Santos¹; José E. Krieger, MD, PhD¹;
Marta H. Krieger, PhD²; Carlos E. Negrão, PhD^{1,3}

¹Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School, Brazil; ²LabCardio,
University of Campinas, Brazil; ³School of Physical Education and Sport, University of
São Paulo , Brazil

Short title: eNOS polymorphism and muscle vasodilatation

Corresponding author:

Carlos Eduardo Negrão, PhD

Instituto do Coração - (InCor)

Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44

Cerqueira César - São Paulo - SP - CEP 05403-000 BRAZIL

Phone: (5511) 3069-5699

FAX: (5511) 3069-5043

e-mail: cndnegrao@incor.usp.br

Abstract

The influence of Glu298Asp eNOS polymorphism in exercise-induced reflex muscle vasodilatation is unknown. We hypothesized that forearm blood flow responses during contralateral handgrip isometric exercise would be attenuated in individuals carrying the Asp298 allele. In addition, these responses would be mediated by reduced nitric oxide availability or increased sympathetic vasoconstriction. From 287 volunteers previously genotyped, we selected 33 healthy individuals to represent three genotypes: Glu/Glu (n=15, age 43±3yr, BMI 22.9±0.3kg/m²), Glu/Asp (n=9, age: 39±3yr, BMI: 24.6±1.2kg/m²) and Asp/Asp (n=9, age 40±4yr, BMI 23.5±0.9kg/m²). Heart rate (HR), mean blood pressure (MBP), and forearm blood flow (FBF, plethysmography) were recorded for 3-min at baseline and 3-min during isometric handgrip exercise. Baseline HR, MBP, FBF and forearm vascular conductance (FVC) were similar among genotypes. FVC responses to exercise were significantly lower in Asp/Asp when compared with Glu/Asp and Glu/Glu (0.07±0.14 vs. 0.64±0.20 and 0.57±0.09 units, respectively, *P*=.002). Further studies showed that intra-arterial infusion of L-NMMA did not change FVC responses to exercise in Asp/Asp, but significantly reduced FVC in Glu/Glu (Δ =0.79±0.14 vs. 0.14±0.09units, *P*=.002). Thus the differences between Glu/Glu and Asp/Asp were no longer observed (*P*=.62). L-NMMA + phentolamine increased similarly FVC responses to exercise in Glu/Glu and Asp/Asp (*P*=.43). MBP and MSNA increased significant and similarly throughout experimental protocols in Glu/Glu and Asp/Asp. Individuals who are homozygous for the Asp298 allele of the eNOS enzyme have attenuated reflex muscle vasodilatation responsiveness to exercise, which seems to be primarily mediated by a reduced nitric oxide bioavailability.

Key Words: nitric oxide, nitric oxide synthase, genetics, exercise, vasodilatation

Introduction

Nitric oxide (NO) is synthesized from L-arginine by the endothelial isoform of nitric oxide synthase (eNOS). The gene encoding eNOS is located in the long arm of chromosome 7 and contains 26 exons spanning 21-Kb of genomic DNA.¹ A single base nucleotide exchange polymorphism within exon 7 (G to T transition) at position 894 results in an exchange of glutamate (Glu) for an aspartate (Asp) aminoacid, respectively, at position 298 in the enzyme.² The potential implication for this eNOS gene exchange is unknown. However, the fact that the 298 residue is located externally in the oxidative domain of the enzyme, i.e., the local binding site for arginine and tetrahydrobiopterin, raises the question that the single base exchange polymorphism within exon 7 at position 894 may result in alteration of the eNOS functionality and, in consequence, NO bioavailability. Although the amino acid exchange is considered to be a conservative substitution, with no measurable difference in enzyme activity between the two forms of the enzyme,² the G894T variant in the eNOS gene may be used as a proxy marker for a functional locus within the eNOS gene.³

NO is a highly reactive free radical mediating many signal transduction pathways involved in the modulation of a variety of phenotypes. Released by the vascular endothelium, NO is considered the mediator of several physiological responses including relaxation of vascular smooth muscle cells and vasodilatation.^{4,5} For example, basal forearm blood flow is reduced by 25 to 50% when pharmacological agents that inhibit NO production are administered.⁶ In addition, the vasodilatation evoked in the resting forearm during handgrip exercise is substantially diminished by an NO inhibitor.⁵

This previous knowledge highlights that NO plays a role in the vascular response to exercise in humans. In addition, if an inter-individual variation of NO production secondary to genetic variation of the eNOS gene exists, the amino acid exchange at position 298 of the eNOS enzyme or a functional locus in the eNOS gene in linkage disequilibrium with this marker can potentially alter the vascular responses during physiological maneuvers in humans.

In the present study, we tested the hypothesis that the reflex muscle vasodilatation in the nonexercising forearm during isometric handgrip exercise would be lower in individuals carrying Asp298 allele than individuals carrying Glu298 allele of the eNOS

enzyme. In addition, we tested the hypothesis that the reduced muscle vasodilatory responses to exercise in individuals carrying Asp298 allele would be NO-mediated. Finally, to rule out the possibility that the decreased forearm vasodilatation in Asp298 carriers would not be a consequence of increased sympathetic nerve activation, forearm blood flow during exercise was studied under local phentolamine blockade and direct measures of muscle sympathetic nerve activity (MSNA).

Materials and Methods

Study population

From a database of 287 individuals previously genotyped for the Glu298Asp polymorphism of the eNOS enzyme, we selected 33 individuals to represent three genotypes (15 Glu/Glu; 9 Glu/Asp and 9 Asp/Asp). The 33 individuals were carefully selected to avoid gender, age and disease bias in our study. The eligibility for taking part in the study was determined by a healthy status, tobacco consumption and age. The subjects were screened for cardiovascular, endocrine and metabolic disorders. They had no apparent cardiovascular diseases and were men and women, healthy, normotensive, nonsmokers and physically untrained for at least six months. Women in fertile period were studied between the 1st and the 5th day after the onset of menstruation. The individuals were abstained from caffeine, alcohol and fatty diet one day before the studies and these were performed in the postabsorptive state. The Human Subject Protection Committee of the Heart Institute (InCor) and Clinical Hospital, University of São Paulo, Medical School, approved the study protocol and written consent was given by each individual.

Measurements and Procedures

Assessment of the Glu298Asp eNOS Polymorphism Genotype. Genomic DNA was extracted from leukocytes in samples of whole blood following standard techniques. Assessment of specific genotype was carried out following previously published protocol.⁷ Briefly, PCR primers were generated to amplify the 248-bp fragment encompassing the missense Glu298Asp variant (sense and antisense primers were 5'-AAGGCAGGAGACAGTGGATGGA-3' and 5'-

CCCAGTCAATCCCTTTGGTGCTCA-3', respectively). A guanine at nucleotide position 894 results in a glutamic acid at amino acid position 298. A thymine at nucleotide position 894 results in an aspartic acid at amino acid position 298, and a *MboI* restriction enzyme produces two fragments of 158 and 90 bp in length in this case. The restriction digest products were analyzed by electrophoresis on 2.0% agarose gels. Quality control for these assays was assessed by randomly selecting 150 samples to be re-genotyped by two independent technicians. No misgenotyping was observed in this sample.

Forearm Blood Flow. Forearm blood flow was measured by venous occlusion plethysmography as described elsewhere.^{8,9} Forearm blood flow (in milliliters per minute per 100 milliliters) was determined on the basis of a minimum of four separate readings. Forearm vascular conductance, as expressed in units, was calculated by dividing forearm blood flow by mean blood pressure times 100.

Blood Pressure and Heart Rate. Blood pressure was monitored noninvasively and intermittently from an automatic and oscillometric cuff (Dixtal, DX 2710; Brazil, Manaus) placed on the ankle with cuff width adjusted to ankle circumference.^{8,9} The cuff inflated every 30 seconds. When a catheter was placed into the brachial artery, blood pressure was monitored invasively and directly on a bit by bit base (AT/CODAS) at a frequency of 500 Hz. Heart rate was monitored continuously through lead II of ECG.

Muscle Sympathetic Nerve Activity. MSNA was recorded directly from the peroneal nerve using the microneurography technique.⁹ Multiunit postganglionic muscle sympathetic nerve recordings were made using a tungsten microelectrode (tip diameter 5 to 15 μm). The signals were amplified by a factor of 50,000 to 100,000 and bandpassed filtered (700 to 2000 Hz). For recordings and analysis, nerve activity was rectified and integrated (time constant, 0.1 seconds) to obtain a mean voltage display of sympathetic nerve activity that was recorded on paper. All recordings of MSNA met previously established and described criteria. MSNA was quantified as bursts frequency (bursts per minute).

Handgrip Exercise. After the maximum voluntary contraction, (MVC; average of three trials) was obtained, handgrip isometric exercise was performed at 30% of MVC with the dominant arm using a handgrip dynamometer. The individuals were instructed to breathe normally during exercise and to avoid inadvertent performance of a Valsalva maneuver.

Arterial Catheterization. After aseptic technique and subsequently local anesthesia (1% lidocaine) in the non-dominant arm, a 5 cm catheter was placed in the brachial artery. The catheter was connected to a pressure transducer and flushed continuously at 3 ml.h⁻¹ with saline containing 2 units heparin ml⁻¹. A tree-port connector was placed in series with the catheter-transducer system. One port was used to monitor arterial pressure and the other port for drug infusion.

Drugs Preparation and Infusion. Saline (NaCl, 0.09%) was infused into the brachial artery and used as control for drug sequence. The nitric oxide synthase inhibitor N^G-monomethyl-L-arginina (L-NMMA; Clinalfa AG, Laufelfingen, Switzerland) was formulated at a specific concentration using sterile normal saline and infused into the brachial artery at 4 mg.min⁻¹. The α -adrenergic blockade phentolamine (Regitine[®], Ciba Pharmaceutical Co., Summit, NJ, USA) was formulated at a specific concentration using sterile normal saline and infused into the brachial artery at 100 μ m.min⁻¹. Saline and drugs were infused continuously (0.5 ml.min⁻¹) during each sequence using a syringe pump.

Experimental Protocol

Protocol 1. The purpose of this study was to investigate if the 298Asp allele was associated with reduced muscle vasodilatory responses to exercise. The individuals involved in this study are shown in Table 1. All studies were performed in a quiet temperature-controlled (21°C) room in the morning period at approximately the same time of day. After electrocardiogram leads placed on the chest, the arm was positioned for venous plethysmography and the leg was positioned for blood pressure measure. After that, the subject rested quietly for 15 minutes. Baseline forearm blood flow, blood

pressure and heart rate were then recorded for 3 minutes. Handgrip isometric exercise was then performed for 3 minutes. Forearm blood flow, blood pressure and heart rate were recorded continuously during handgrip exercise (Fig. 1). Blood pressure was monitored noninvasively and intermittently from an automatic and oscillometric cuff placed on the ankle with cuff width adjusted to ankle circumference.^{8,9} The cuff inflated every 30s.

Protocol 2. The purpose of this study was to confirm the effect of eNOS polymorphism on forearm blood flow response to exercise. We reasoned that if the Asp/Asp genotype evoked reduced forearm vasodilatation during exercise and this response was due to decreased NO bioavailability, brachial intra-arterial infusion of L-NMMA would abolish the difference between individuals Asp/Asp and Glu/Glu. In addition, to rule out the possibility that the decreased forearm vasodilatation in Asp/Asp was not a consequence of increased sympathetic nerve activation, phentolamine was associated with L-NMMA during exercise, and MSNA was simultaneously evaluated. A subset of 7 Glu/Glu individuals and a subset of 8 Asp/Asp individuals agreed with the invasive procedures and, hence, were enrolled in this protocol. The subject was positioned, and electrocardiogram leads were placed on the chest. An intra-arterial line was placed into the brachial arterial of the non-dominant arm. The catheter was attached to a three-way stopcock for ease of intra-arterial drug infusion. Cuffs for forearm blood flow measurements were placed on the non-dominant arm and the leg was positioned for microneurography. After an adequate nerve recorded site was obtained, the subject rested quietly for 15 minutes. Then, saline was infused (0.5 ml/min) for 5 min and baseline values for forearm blood flow, blood pressure, heart rate and MSNA were recorded for 3 min. Exercise was then carried out for 3 min. Forearm blood flow, blood pressure, heart rate and MSNA were recorded continuously during exercise. After a 15-min rest period, when all parameters returned to baseline, L-NMMA was infused ($4 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1}$; $0.5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) for 5 minutes. Baseline forearm blood flow, arterial pressure, and heart rate were recorded for 3 min. Exercise was then carried out for 3 min under L-NMMA administration. Forearm blood flow, blood pressure, heart rate and MSNA were recorded continuously during exercise. After a 15-min rest period, when all parameters returned to

baseline values, L-NMMA plus phentolamine were infused ($4 \text{ mg}\cdot\text{min}^{-1}$ and $100\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$, respectively; $0.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) for 5 minutes. Handgrip exercise was then performed for 3 min under L-NMMA plus phentolamine. Forearm blood flow, blood pressure, heart rate and MSNA were recorded continuously during exercise. The timeline of the experimental protocol 2 and each sequence of saline and drug infusion are shown in Figure 1.

Statistical Analysis

Data are presented as means \pm SE. The odd ratios (OR) were calculated with 95% confidence interval (CI) and two tailed *p*-values. Data of both demographic characteristics and baseline measurement were subjected to one-way ANOVA. The responses of forearm blood flow, forearm vascular conductance, MSNA, mean blood pressure and heart rate are presented as the absolute changes and were subjected to two-way ANOVA with repeated measures. When significance was found, Scheffé's post-hoc comparisons were performed. Probability values of ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Results

Baseline Measurements

The demographic characteristics and metabolic and vascular measures are shown in Table 1. There were no significant differences in age, weight, height, BMI, and glucose, total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, VLDL-cholesterol, triglycerides levels among Glu/Glu, Glu/Asp and Asp/Asp genotypes. Baseline forearm blood flow and forearm vascular conductance were not different among the three genotypes studied. Similarly, baseline heart rate and mean blood pressure levels were not different among genotypes (Table 2).

Responses to Exercise

Mean blood pressure and heart rate increased significantly and similarly in response to exercise in all three genotypes studied (Table 2). Forearm blood flow during exercise slightly increased in Asp/Asp genotype individuals (Fig. 2). In contrast, forearm blood flow significantly increased throughout exercise in Glu/Glu and Glu/Asp genotypes

(Fig. 2). The comparisons among genotypes showed that the magnitude of response in forearm blood flow during exercise was significantly greater in Glu/Glu and Glu/Asp genotypes when compared with Asp/Asp genotype. Similar results were found in forearm vascular conductance. This parameter significantly increased during exercise in Glu/Glu and Glu/Asp genotypes, but not in Asp/Asp genotype. Thus the magnitude of response was significantly greater in Glu/Glu and Glu/Asp genotypes than in Asp/Asp genotype (Fig. 2).

Baseline Measurements with Blockage of eNOS and Sympathetic Vasoconstrictor Activity

L-NMMA slightly reduced forearm blood flow and forearm vascular conductance in Glu/Glu and Asp/Asp genotypes when compared with saline levels (Fig. 3). L-NMMA plus phentolamine similarly increased forearm blood flow and forearm vascular resistance conductance in Glu/Glu and Asp/Asp genotypes (Fig. 3). L-NMMA and L-NMMA plus phentolamine infusions did not significantly change mean blood pressure, heart rate and MSNA levels in both Glu/Glu and Asp/Asp genotype groups.

Response to Exercise with Blockage of eNOS and Sympathetic Vasoconstrictor Activity

Confirming the results obtained in the protocol 1, forearm blood flow and forearm vascular conductance during exercise with saline infusion were significantly lower in Asp/Asp genotype when compared with Glu/Glu genotype (Fig. 4). L-NMMA infusion caused no significant changes in forearm blood flow and forearm vascular conductance responses to exercise in carriers of Asp/Asp genotype. In contrast, forearm blood flow and forearm vascular conductance responses to exercise were significantly reduced in the Glu/Glu genotype (Fig. 4). Thus, the difference between the Glu/Glu and the Asp/Asp genotypes was no longer observed. L-NMMA plus phentolamine infusion increased significantly and similarly forearm blood flow and forearm vascular conductance responses to exercise in both Glu/Glu and Asp/Asp genotype groups. Heart rate and mean blood pressure responses to exercise with L-NMMA and L-NMMA plus phentolamine increased significantly and similarly in Glu/Glu and Asp/Asp genotypes (Table 3). In regard to MSNA, exercise significantly increased MSNA levels in Glu/Glu and Asp/Asp

genotypes. The comparison between genotypes showed no significant difference in the magnitude of increase in MSNA during exercise with L-NMMA and L-NMMA plus phentolamine in Glu/Glu genotype and Asp/Asp genotype (Table 3).

Discussion

The main and new finding of the present study is that Glu298Asp polymorphism of the eNOS enzyme is functionally associated with attenuated vasodilatation in the nonexercising forearm during sustained isometric handgrip exercise. Moreover, the attenuated muscle vasodilatation response only occurs in Asp298 homozygous individuals, since the vasodilatation in heterozygous individuals (Glu/Asp) is virtually similar to that observed in wild-type individuals (Glu/Glu). This finding suggests that the presence of a Glu298 allele is sufficient to overcome a possible deficiency resultant from the Asp298 allele.

Accumulated evidence shows that the reflex muscle vasodilatation during physiological maneuvers, including exercise, is the result of the equilibrium between the vasodilatory forces and vasoconstrictor forces. In addition, it is known that muscle vasodilatation depends, in great part, upon NO production from the endothelial cells and the degree of sympathetic nerve activation.^{10,11} Thus, it would be reasonable to suspect that the attenuated muscle vasodilatation in Asp/Asp individuals was due to reduced NO bioavailability, augmented sympathetic activation, or both. Our study provides evidence that the attenuated reflex muscle vasodilatation in individuals encoding the Asp/Asp genotype of the eNOS gene is a consequence of a reduced endothelial NO bioavailability, since local intra-arterial infusion of L-NMMA, in contrast to Glu/Glu individuals, did not significantly change forearm blood flow responses to exercise in Asp/Asp individuals. Moreover, L-NMMA abolishes the difference in forearm blood flow responses to exercise between individuals encoding the Asp/Asp and Glu/Glu forms of the eNOS enzyme. It is unlikely that the sympathetic nerve activation explains the blunted muscle vasodilatation in individuals carrying the Asp/Asp genotype. Firstly, no differences in forearm blood flow responses during eNOS and post-junctional α -adrenoceptors blockage in Asp/Asp and Glu/Glu genotypes were observed. Secondly, the post-ganglionic sympathetic discharge recorded directly from the peroneal nerve using the

technique of microneurography showed that MSNA levels were not different between the two genotypes studied.

Asp298 allele has been associated with some pathological conditions such as hypertension¹², acute myocardial infarction¹³, acetylcholine-induced coronary spasm¹⁴, coronary vasomotor dysfunction¹⁵, lower collateral development in chronic coronary occlusion¹⁶, and coronary in-stent restenosis¹⁷. In addition, enhanced responsiveness to phenylephrine in patients carrying the Asp298 form of the eNOS enzyme, submitted to cardiac surgery, has been reported.¹⁸ Our study extends the knowledge that Asp298 allele in homozygosis reduces endothelial-dependent vasodilatation during physiological maneuver in healthy, non-smoking individuals with no apparent cardiovascular and metabolic disease. In addition, these findings raise the possibility that the diminished endothelial-mediated muscle vasodilatation anticipates the vascular dysfunction in individuals who are homozygous for Asp/Asp of the eNOS gene.

Limitations

Enzymatic studies using recombinant eNOS have showed that enzyme activity is not affected by the Asp298 substitution of the eNOS protein² and, hence, the precise Asp²⁹⁸-Pro²⁹⁹ bond does not seem to be susceptible to proteolytically cleavage.¹⁹ However, these findings do not rule out the possibility that an unknown proteolytic mechanism or a post-translational regulation could be modulated *in vivo* by the Asp298 allele.

The substitution of glutamate for aspartate is considered a conservative replacement. Thus, the attenuated muscle vasodilatation during exercise may be due to a locus elsewhere in the eNOS gene or in its vicinity that is in linkage disequilibrium with the Glu298Asp polymorphism²⁰. Nevertheless, these findings do not rule out the possible use of the G894T variant as a marker for a functional locus.

One could argue that gene association studies are difficult to interpret, since one gene may confer a small to moderate effect in a particular trait, especially in phenotypes controlled by a large number of genes. Although this thought is particularly true in the

case of vascular reactivity, our study is consistent with the idea that NO bioavailability plays a role in the muscle vasodilatory responses in individuals encoding the Glu/Glu genotypes. The augmented forearm blood flow responses in Glu/Glu genotype were virtually abolished after L-NMMA administration. These findings suggest that eNOS is highly functional in the modulation of vascular responsiveness during physiological maneuver in Glu/Glu individuals. On the other hand, the lowered NO bioavailability seems to explain, at least in part, the reduced reflex muscle vasodilatation during exercise in individuals who are homozygous for Asp/Asp of the eNOS gene.

One could raise the question that the diminished forearm blood flow responses in Asp/Asp individuals was mediated by a lowered perfusion pressure rather than a local vasodilatation. This argument seems unlikely, since blood pressure levels throughout experimental protocols were similar in Asp/Asp and Glu/Glu individuals. Moreover, forearm vascular conductance, which takes into consideration forearm blood flow and mean arterial pressure, was significantly lower in Asp/Asp individuals. Similarly, it is unlikely that the reduced forearm blood flow responses during exercise were due to the lowered cardiac output. Heart rate levels during exercise were not different between Asp/Asp and Glu/Glu genotypes.

Perspectives

The present study shows an association between Asp/Asp genotype of the eNOS enzyme and reduced reflex muscle vasodilatation during isometric handgrip. Since NO-mediated muscle vasodilatation is an expected response during exercise and, in addition, suggestive of endothelial-mediated vascular function, a blunted response to this physiological maneuver may predict a higher susceptibility to certain cardiovascular diseases potentially linked with genetic variation of the eNOS gene.

It has been well documented that exercise capacity depends upon muscle blood flow supply during exercise, which is achieved by an increase in cardiac output and muscle vasodilatation. Thus, it is reasonable to expect that the aerobic capacity is lower in individuals who are homozygous for the Asp/Asp form of the eNOS enzyme than in

individuals who are heterozygous (Glu/Asp) or wild-type (Glu/Glu) for the eNOS enzyme.

Previous studies have consistently demonstrated that exercise training improves endothelial function in healthy individuals and cardiac patients.^{21,22} In addition, Erbs et al.²³ reported that exercise training improves endothelial function in patients with stable coronary artery disease genotyped for the Glu298Asp eNOS polymorphism. Even though exercise training provoked a lower increase in average peak velocity in coronary and left internal mammary artery to acetylcholine in patients Asp/Asp than in patients Glu/Glu and Glu/Asp, it changed the paradox vasoconstriction to vasodilatation in patients homozygous for Asp298. Thus, exercise training should be considered a strategy to improve vascular function in humans with the Asp/Asp genotype for the eNOS enzyme.

In conclusion, the lowered reflex muscle vasodilatory responsiveness during exercise in individuals homozygous for Asp/Asp provides evidence for the understanding of the genetic regulation of vascular responses mediated by eNOS enzyme during physiological maneuvers in humans.

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP # 2005/59740-7) and, in part, by Fundação Zerbini. Rodrigo Gonçalves Dias was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP (#FAPESP 04/14292-4). Dr. Carlos E Negro and Dra. Maria U Rondon were supported by Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq # 304304/2004-2 and #305159/2005-4, respectively).

References

- 1- Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem.* 1993; 268:17478-17488.
- 2- Hingorani AD. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis: John French Lecture 2000. *Atherosclerosis.* 2001; 154:521-527.
- 3- Pereira TV, Rudnicki M, Cheung BM, Baum L, Yamada Y, Oliveira PS, Pereira AC, Krieger JE. Three endothelial nitric oxide (NOS3) gene polymorphisms in hypertensive and normotensive individuals: meta-analysis of 53 studies reveals evidence of publication bias. *J Hypertens.* 2007; 25:1763-1774.
- 4- Dyke CK, Proctor DN, Dietz NM, Joyner MJ. Role of nitric oxide in exercise hyperaemia during prolonged rhythmic handgripping in humans. *J Physiol.* 1995; 488(Pt 1):259-265.
- 5- Dietz NM, Engelke KA, Samuel TT, Fix RT, Joyner MJ. Evidence for nitric oxide-mediated sympathetic forearm vasodilatation in humans. *J Physiol.* 1997; 498 (Pt 2):531-540.
- 6- Joyner MJ, Dietz NM. Sympathetic vasodilation in human muscle. *Acta Physiol Scand.* 2003; 177:329-336.
- 7- Pereira AC, Sposito AC, Mota GF, Cunha RS, Herkenhoff FL, Mill JG, Krieger JE. Endothelial nitric oxide synthase gene variant modulates the relationship between serum cholesterol levels and blood pressure in the general population: new evidence for a direct effect of lipids in arterial blood pressure. *Atherosclerosis.* 2006; 184:193-200.
- 8- Negrao CE, Hamilton MA, Fonarow GC, Hage A, Moriguchi JD, Middlekauff HR. Impaired endothelium-mediated vasodilation is not the principal cause of vasoconstriction in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 278:H168-H174.
- 9- Trombetta IC, Batalha LT, Rondon MU, Laterza MC, Kuniyoshi FH, Gowdak MM, Barretto AC, Halpern A, Villares SM, Negrao CE. Weight loss improves neurovascular and muscle metaboreflex control in obesity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 285:H974-H982.

- 10- Joyner MJ, Dietz NM. Nitric oxide and vasodilation in human limbs. *J Appl Physiol*. 1997; 83:1785-1796.
- 11- Santos AC, Alves MJ, Rondon MU, Barretto AC, Middlekauff HR, Negrao CE. Sympathetic activation restrains endothelium-mediated muscle vasodilatation in heart failure patients. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 289:H593-H599.
- 12- Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Hamanaka I, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamizu T, Azuma N, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Itoh H, Masuda I, Yasue H, Nakao K. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension*. 1998; 32:3-8.
- 13- Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T, Ochiai H, Kosuge M, Watanabe Y, Yoshii Y, Kihara M, Kimura K, Ishii M, Umemura S. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension*. 1998; 32:521-526.
- 14- Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H, Sugiyama S, Kugiyama K, Ogawa H, Ogawa Y, Saito Y, Miyamoto Y, Nakao K. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet*. 1998; 103:65-69.
- 15- Naber CK, Baumgart D, Altmann C, Siffert W, Erbel R, Heusch G. eNOS 894T allele and coronary blood flow at rest and during adenosine-induced hyperemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; 281:H1908-H1912.
- 16- Lamblin N, Cuilleret FJ, Helbecque N, Dallongeville J, Lablanche JM, Amouyel P, Bauters C, Van Belle E. A common variant of endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is associated with collateral development in patients with chronic coronary occlusions. *BMC Cardiovasc Disord*. 2005; 5:27.
- 17- Suzuki T, Okumura K, Sone T, Kosokabe T, Tsuboi H, Kondo J, Mukawa H, Kamiya H, Tomida T, Imai H, Matsui H, Hayakawa T. The Glu298Asp polymorphism in endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary in-stent restenosis. *Int J Cardiol*. 2002; 86:71-76.
- 18- Philip I, Plantefeve G, Vuillaumier-Barrot S, Vicaut E, LeMarie C, Henrion D, Poirier O, Levy BI, Desmonts JM, Durand G, Benessiano J. G894T polymorphism in the

endothelial nitric oxide synthase gene is associated with an enhanced vascular responsiveness to phenylephrine. *Circulation*. 1999; 99:3096-3098.

19- Fairchild TA, Fulton D, Fontana JT, Gratton JP, McCabe TJ, Sessa WC. Acidic hydrolysis as a mechanism for the cleavage of the Glu(298)-->Asp variant of human endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 2001; 276:26674-26679.

20- Tesauro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP, Moss J. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97:2832-2835.

21- Maeda S, Tanabe T, Otsuki T, Sugawara J, Iemitsu M, Miyauchi T, Kuno S, Ajisaka R, Matsuda M. Moderate regular exercise increases basal production of nitric oxide in elderly women. *Hypertens Res*. 2004; 27:947-953.

22. Walther C, Gielen S, Hambrecht R. The effect of exercise training on endothelial function in cardiovascular disease in humans. *Exerc Sport Sci Rev*. 2004; 32:129-134.

23. Erbs S, Baither Y, Linke A, Adams V, Shu Y, Lenk K, Gielen S, Dilz R, Schuler G, Hambrecht R. Promoter but not exon 7 polymorphism of endothelial nitric oxide synthase affects training-induced correction of endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23:1814-1819.

Legends

Figure 1. Timeline of experimental protocols (see Experimental Protocol for explanation). FBF, forearm blood flow; BP, blood pressure; HR, heart rate; MSNA, muscle sympathetic nerve activity.

Figure 2. Individual forearm blood flow (FBF; Panel A) and forearm vascular conductance (FVC; Panel B) responses (absolute change) during 30% maximal voluntary contraction (MVC) handgrip exercise in individuals encoding Glu/Glu, Glu/Asp and Asp/Asp of the eNOS gene.

* Note that both FBF and FVC responses were significantly lower in Asp/Asp genotype when compared with Glu/Glu, Glu/Asp genotypes.

Figure 3. Baseline forearm blood flow (FBF) and forearm vascular conductance (FVC) during saline, L-NMMA and L-NMMA + phentolamine intra-arterial infusion in individuals encoding Glu/Glu and Asp/Asp of the eNOS gene. *, vs. L-NMMA, $P < 0.05$.

Figure 4. Forearm blood flow (FBF) and forearm vascular conductance (FVC) responses (absolute change) during 30% maximal voluntary contraction (MVC) handgrip exercise in individuals encoding Glu/Glu and Asp/Asp of the eNOS gene. Note that L-NMMA abolished the differences between individuals encoding Glu/Glu and Asp/Asp of the eNOS gene. In addition, no differences between groups were observed during L-NMMA plus phentolamine infusion. *, within group comparisons vs. baseline; †, between group comparisons; ‡, significant difference vs. baseline, pooled data of both groups, $P < 0.05$.

Table 1. Baseline measurements in individuals encoding Glu/Glu, Glu/Asp and Asp/Asp of the eNOS gene.

	Glu/Glu	Glu/Asp	Asp/Asp	<i>P</i>
<i>N</i>	15	9	9	
<i>Demographic characteristics</i>				
Age, years	43 ± 3	41 ± 3	40 ± 4	0.76
Sex, F/M	12/3	6/3	6/3	0.71
Weight, kg	60.2 ± 1.5	68.0 ± 2.4	61.8 ± 3.9	0.08
Height, cm	162 ± 2	170 ± 3	161 ± 3	0.10
BMI, kg/m ²	22.9 ± 0.3	23.7 ± 1.0	23.5 ± 0.9	0.64
<i>Metabolic measurements</i>				
Glucose, mg/dl	92 ± 2	92 ± 4	84 ± 3	0.11
Total Cholesterol, mg/dl	193 ± 10	177 ± 10	193 ± 7	0.48
LDL-cholesterol, mg/dl	123 ± 8	121 ± 9	128 ± 6	0.86
HDL-cholesterol, mg/dl	50 ± 3	41 ± 2	47 ± 3	0.13
VLDL-cholesterol, mg/dl	20 ± 3	17 ± 3	17 ± 3	0.67
Triglycerides, mg/dl	87 ± 7	87 ± 13	84 ± 13	0.97
<i>Vascular measurements</i>				
FBF, ml.min ⁻¹ .100ml ⁻¹	1.81 ± 0.09	1.80 ± 0.23	1.79 ± 0.17	0.99
FVC, units	2.03 ± 0.12	1.90 ± 0.24	1.89 ± 0.17	0.80

Values are mean ± SE. M, male; F, female; BMI, body mass index; HR, heart rate; MBP, mean blood pressure.

Table 2. Baseline and absolute changes in heart rate (HR) and mean blood pressure (MBP) during 30% maximal voluntary contraction (MVC) handgrip exercise in individuals encoding Glu/Glu, Glu/Asp and Asp/Asp of the eNOS gene.

		Exercise			
		Baseline	1 min	2 min	3 min
<i>HR, beats/min</i>	<i>Glu/Glu</i>	69 ± 2	3±1‡	6±1‡	10±1‡
	<i>Glu/Asp</i>	69 ± 4	4±1	7±5	11±7
	<i>Asp/Asp</i>	63 ± 3	4±1	8±1	12±1
<i>MBP mmHg</i>	<i>Glu/Glu</i>	91 ± 3	3±1‡	8±2‡	15±2‡
	<i>Glu/Asp</i>	94 ± 2	1±1	8±2	12±2
	<i>Asp/Asp</i>	95 ± 3	3±1	10±2	15±2

Values are mean ± SE. ‡ pooled data of all three groups vs. baseline.

Table 3. Baseline and absolute changes in heart rate, mean blood pressure, and muscle sympathetic nerve activity during 30% maximal voluntary contraction (MVC) handgrip exercise with saline, L-NMMA, and L-NMMA + phentolamine intra-arterial infusions in individuals encoding Glu/Glu and Asp/Asp of the eNOS gene.

		Baseline	Exercise		
			1 min	2 min	3 min
<i>Saline</i>					
<i>HR, beats/min</i>	<i>Glu/Glu</i>	70 ± 4	3±1‡	6±2‡	4±1‡
	<i>Asp/Asp</i>	73 ± 3	6±1	10±2	7±3
<i>MBP, mmHg</i>	<i>Glu/Glu</i>	86 ± 4	6±1‡	10±2‡	11±2‡
	<i>Asp/Asp</i>	85 ± 6	8±3	12±2	9±3
<i>MSNA, bursts/min</i>	<i>Glu/Glu</i>	13 ± 4	2±1	5±1‡	8±2‡
	<i>Asp/Asp</i>	18 ± 5	3±1	6±2	11±2
<i>L-NMMA</i>					
<i>HR, beats/min</i>	<i>Glu/Glu</i>	68 ± 4	5±1‡	9±2‡	7±2‡
	<i>Asp/Asp</i>	73 ± 2	8±2	8±2	5±2
<i>MBP, mmHg</i>	<i>Glu/Glu</i>	87 ± 3	7±1‡	14±2‡	10±2‡
	<i>Asp/Asp</i>	87 ± 7	11±3	14±3	8±4
<i>MSNA, bursts/min</i>	<i>Glu/Glu</i>	16 ± 4	3±2	6±2‡	9±6‡
	<i>Asp/Asp</i>	18 ± 4	4±2	7±3	12±3
<i>L-NMMA + Phentolamine</i>					
<i>HR, beats/min</i>	<i>Glu/Glu</i>	69 ± 5	9±2‡	13±4‡	11±3‡
	<i>Asp/Asp</i>	73 ± 2	9±1	9±3	6±3
<i>MBP, mmHg</i>	<i>Glu/Glu</i>	89 ± 3	8±2‡	14±2‡	10±2‡
	<i>Asp/Asp</i>	90 ± 7	12±3	13±3	6±4
<i>MSNA, bursts/min</i>	<i>Glu/Glu</i>	16 ± 4	6±3	6±2‡	14±5‡
	<i>Asp/Asp</i>	19 ± 5	5±2	9±5	10±2

Values are mean ± SE. HR, heart rate; MBP, mean blood pressure; MSNA, muscle sympathetic nerve activity. ‡ = pooled data of both groups vs. baseline.

Figure 1

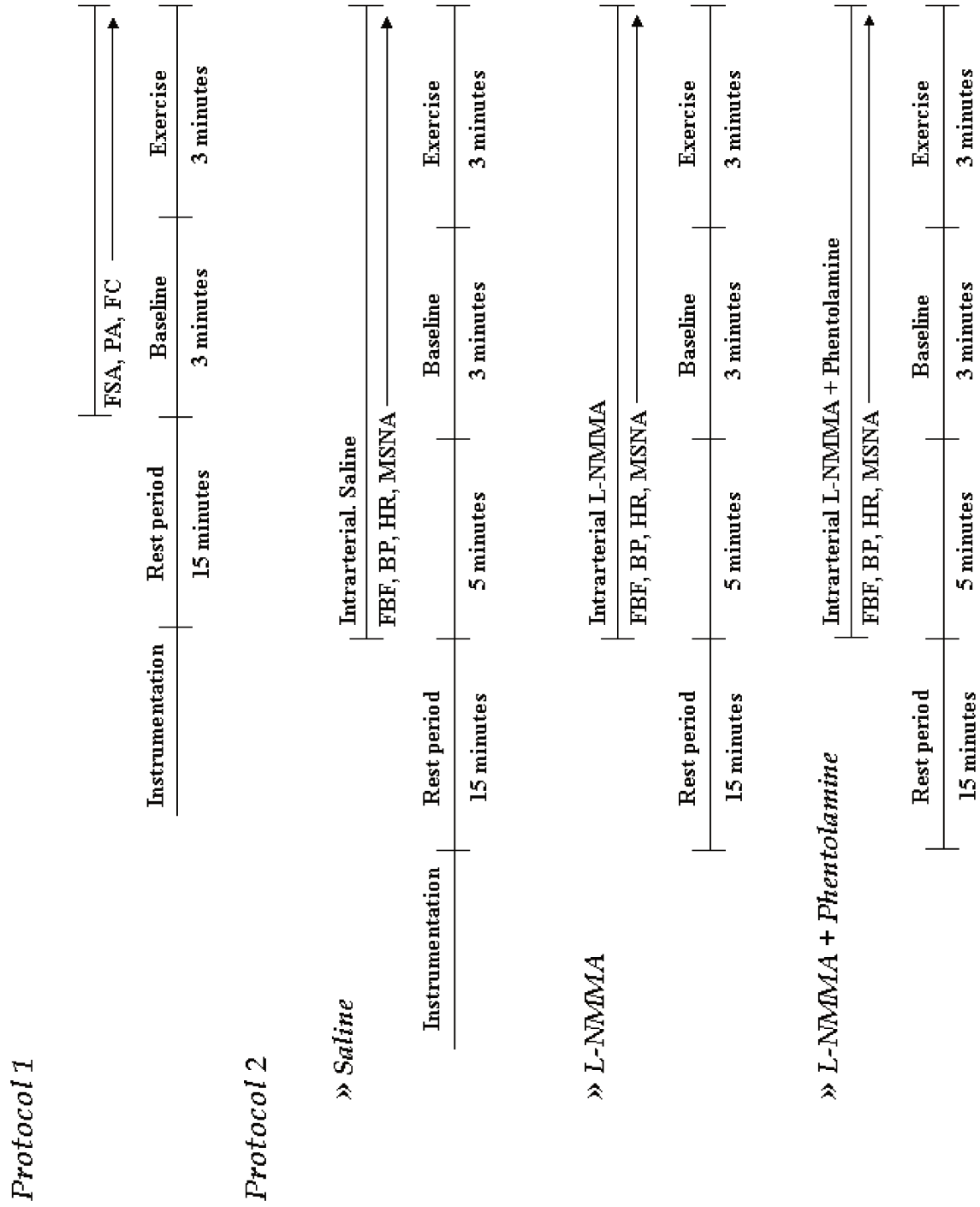


Figure 2

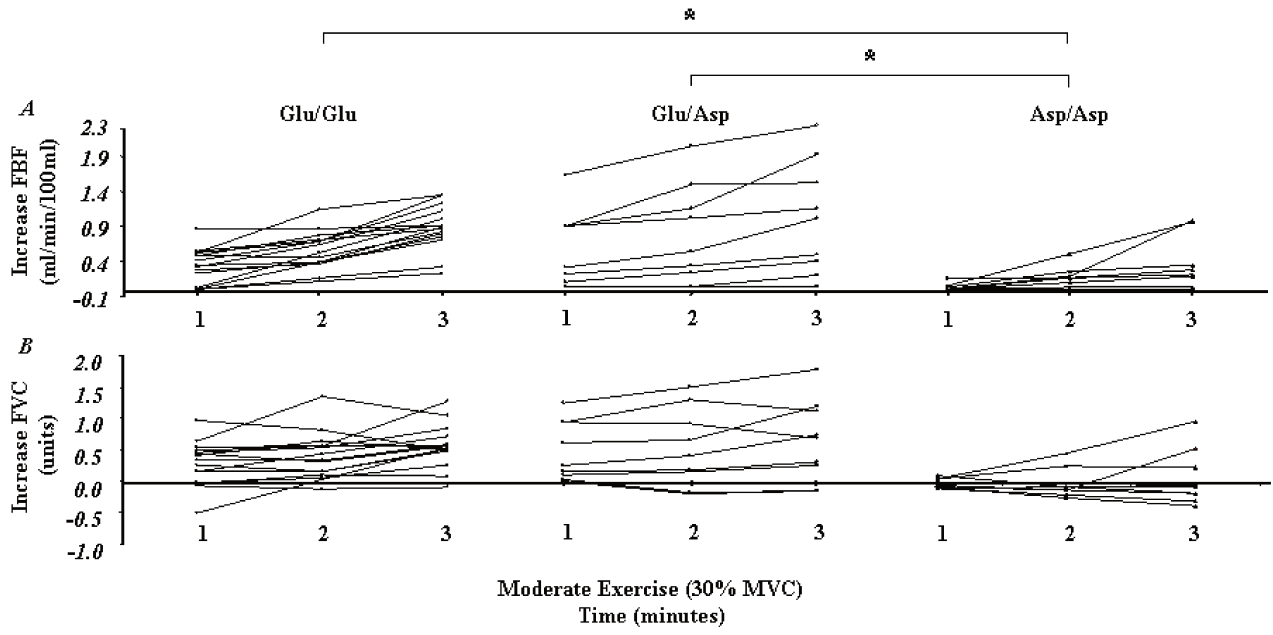


Figure 3

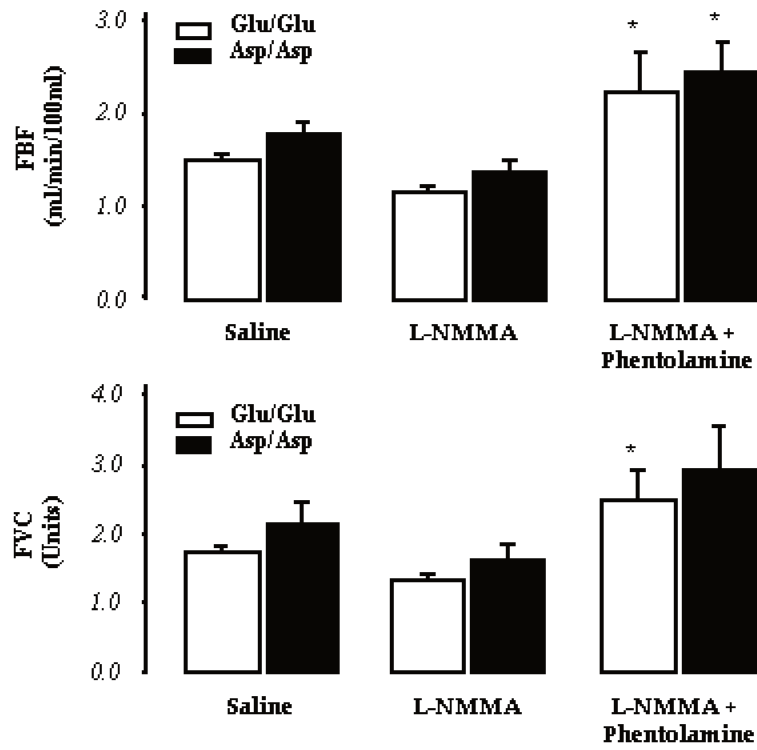


Figure 4

