

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares representam a maior causa de mortalidade no mundo sendo a aterosclerose a campeã dos acometimentos cardíacos (BONOW, 2002; POOLE-WILSON, 2007).

Diversas condições em comum que predisõem para o surgimento da aterosclerose como hipertensão, hipercolesterolemia e tabagismo estão associadas à disfunção endotelial (LANDMESSER, HORNIG & DREXLER, 2004).

O estudo das células endoteliais vasculares começou a ganhar espaço em meio à ciência quando investigações pioneiras realizadas por FURCHGOTT & ZAWADSKI (1980) descobriram que a manutenção da integridade endotelial é essencial para a obtenção da resposta vasodilatadora induzida por estímulo farmacológico.

Atualmente, sabe-se que o controle da homeostase vascular pelo endotélio ocorre através da sua capacidade de sentir variações nos tecidos que o circundam e responder adequadamente a esses estímulos através da liberação de substâncias vasoativas que agem como moduladores do fluxo sangüíneo, da agregação plaquetária e da angiogênese (TRIGGLE, HOLLENBERG, ANDERSON, DING, JIANG, CERONI, WIEHLER, NG, ELLIS, ANDREWS, MCGUIRE & PANNIRSELVAM, 2003), tendo maior destaque como molécula vasoprotetora o óxido nítrico (NO) (GEWALTIG & KOJDA, 2002).

Estudos epidemiológicos vêm demonstrando que o treinamento físico aeróbico promove uma variedade de ajustes benéficos ao sistema cardiovascular, inclusive em indivíduos saudáveis, reduzindo a morbidade e mortalidade por doenças cardíacas e, uma importante adaptação benéfica da prática regular de esforços físicos, é a melhora na função endotelial (THOMPSON, BUCHNER, PINA, BALADY, WILLIAMS, MARCUS, BERRA, BLAIR, COSTA, FRANKLIN, FLETCHER, GORDON, PATE, RODRIGUEZ, YANCEY & WENGER, 2003; MYERS, 2003).

Apesar de muitas questões ainda perdurarem acerca dos ajustes endoteliais ao treinamento físico, sabe-se que a melhora no controle da biodisponibilidade do NO é um importante fator. Além do aumento da expressão da enzima que sintetiza o NO endotelial (eNOS) o treinamento físico também reduz a produção de superóxido

ou aumenta a capacidade de tamponar esse ânion, que é o principal regulador negativo do NO (KOJDA & HAMBRECHT, 2005).

Além dos efeitos crônicos do treinamento físico algumas evidências apontam para uma melhora na função endotelial logo após uma sessão de exercício físico (JEN, CHAN & CHEN, 2002; GOTO, NISHIOKA, UMEMURA, JITSUIKI, SAKAGUTCHI, KAWAMURA, CHAYAMA, YOSHIKUMI & HIGASHI, 2007). Entretanto, essa é uma questão ainda em discussão já que os poucos estudos que abordaram os efeitos agudos do exercício apresentaram resultados controversos (DELP & LAUGHLIN, 1997; HARAM, ADAMS, KEMI, BRUBAKK, HAMBRECHT, ELLINGSEN & WISLOFF, 2006).

Entender os eventos que ocorrem durante e imediatamente após uma sessão de esforços é importante para enriquecer o conhecimento dos mecanismos que acarretam nos efeitos a médio e longo prazo do treinamento físico.

Sabe-se que o aumento do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente do estresse físico exercido na parede endotelial, conhecido como estresse de cisalhamento, e as alterações que ocorrem no sistema redox, eventos que serão discutidos com maiores detalhes posteriormente, são importantes desencadeadores das cascatas de sinalização celular para a melhora da regulação do NO. Entretanto, esses fatores devem ocorrer em níveis controlados uma vez que o estresse de cisalhamento exacerbado ou a produção excessiva de espécies oxidantes estão associados à perda da integridade endotelial (KOJDA & HAMBRECHT, 2005).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O endotélio vascular

As células endoteliais situam-se na camada íntima dos vasos estando em contato direto com as células musculares lisas e com o sangue circulante. Apresentam estrutura alongada com o núcleo proeminente e são repletas de organelas intracelulares possuindo atividade metabólica elevada (NASCIMENTO, PATRIARCA & HEIMANN, 2003).

O interesse pelo endotélio aumentou de maneira importante após FURCHGOTT & ZAWADSKI (1980) descobrirem que a presença do endotélio íntegro é fundamental para a obtenção da resposta vasodilatadora a acetilcolina em artérias de coelhos.

Aproximadamente dez trilhões de células endoteliais, o que representa cerca de 1 kg em um indivíduo adulto, recobrem internamente a parede de todo o sistema vascular formando uma extensa monocamada de células interconectadas. Sua localização estratégica e organização estrutural permitem que o endotélio seja capaz de sentir alterações no sistema cardiovascular e responder adequadamente a esses estímulos (GALLEY & WEBSTER, 2004).

O endotélio modula ativamente a manutenção da homeostase vascular, exercendo importante influência autócrina, parácrina e endógena, atuando localmente em células musculares lisas, plaquetas e leucócitos (GALLEY & WEBSTER, 2004).

Essa modulação local exercida pelo endotélio ocorre pela sua capacidade de sentir alterações e responder adequadamente através da liberação de substâncias vasoativas que operam no controle do fluxo sanguíneo, coagulação, proliferação de células musculares lisas e angiogênese. Essas substâncias podem ser divididas em vasodilatadoras, como o óxido nítrico (NO), prostaciclina e fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHFs) e vasoconstritoras, como prostaglandina, endotelina I e algumas espécies reativas de oxigênio (EROs) (MOMBOULI & VANHOUTTE, 1999).

Apesar da diversidade de ações endoteliais na regulação vascular, a medida da função endotelial é atribuída a sua capacidade vasodilatadora. Redução no relaxamento vascular dependente do endotélio tem sido considerada um preditor independente da severidade das doenças cardiovasculares (COOKE, 2003), além disso, o grau de comprometimento endotelial está associado ao risco futuro de eventos cardíacos (GIANOTI & LANDMESSER, 2007).

Como o NO derivado do endotélio é responsável por muitas das funções exercidas pelas células endoteliais, pode ser considerada uma molécula ateroprotetora, sendo a perda no controle da biodisponibilidade do NO um fator determinante na disfunção endotelial (HARRISON, 1997). Devido a importância que

o NO apresenta no endotélio será abordado com maiores detalhes posteriormente.

2.2 O óxido nítrico derivado do endotélio

Quando FURCHGOTT & ZAWADSKI (1980) descobriram que o relaxamento vascular à acetilcolina era dependente da presença do endotélio funcional eles relataram que esse efeito ocorria pela liberação e ação de um fator humoral, posteriormente denominado fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) (FURCHGOTT, CHERRY, ZAWADZKI & JOTHIANANDAN, 1984).

Anos após, foi demonstrado que esse EDRF era o óxido nítrico, uma vez que eram indistinguíveis quanto a atividade biológica, estabilidade, química e que ambos tinham sua ação inibida por hemoglobina e aumentada pela enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), enzima que seqüestra o superóxido e que representa o principal inativador do NO (PALMER, FERRIGE & MONCADA, 1987),.

O NO é uma molécula gasosa, incolor, inorgânica, possui um elétron desemparelhado em sua camada orbital mais externa, sendo portanto, um radical livre, e exerce uma grande diversidade de ações biológicas. A crescente lista de funções exercidas pelo NO pode ser atribuída a sua química exclusiva (ANDREWS, TRIGGLE & ELLIS, 2002) e, além do sistema cardiovascular, o óxido nítrico atua em vários outros sistemas como imune, digestório, reprodutor e muscular (TUTEJA, CHANDRA, TUTEJA & MISRA, 2007).

A variedade de funções exercidas pelo NO é tão complexa quanto a regulação de sua síntese. As enzimas encarregadas em produzir o NO, conhecidas como óxido nítrico síntases (NOS), podem ser divididas em dois grupos: as expressas de maneira constitutiva ou cNOS (neuronal, nNOS e endotelial, eNOS), ou induzida por citocinas (iNOS). O NO sintetizado pelas cNOS caracterizam o NO responsável pela transmissão de sinais celulares regulados sendo produzidos de maneira dependente de Ca^{2+} e calmodulina. Um exemplo clássico de um evento celular mediado pelo NO é o caso do relaxamento das células musculares lisas. Já o NO produzido pela iNOS independe do aumento de Ca^{2+} e calmodulina e corresponde ao NO destinado ao sistema imune, induzida especialmente em macrófagos (MARLETTA & SPIERING, 2003).

A síntese de NO a partir da L-Arginina pode ser dividida em duas etapas. Na primeira fase ocorre a hidroxilação da L-Arginina, formando N-Hidróxi-L-Arginina através da utilização de uma molécula de oxigênio e duas de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). Posteriormente, com um elétron proveniente do NADPH e outro da molécula de oxigênio, N-Hidróxi-L-Arginina é convertida a L-citrulina e NO (ROUSSEAU, LI, COUTURE & YEH, 2005). A seqüência de eventos descrita é representada no esquema abaixo (FIGURA 1, adaptado de ROUSSEAU et al., 2005).

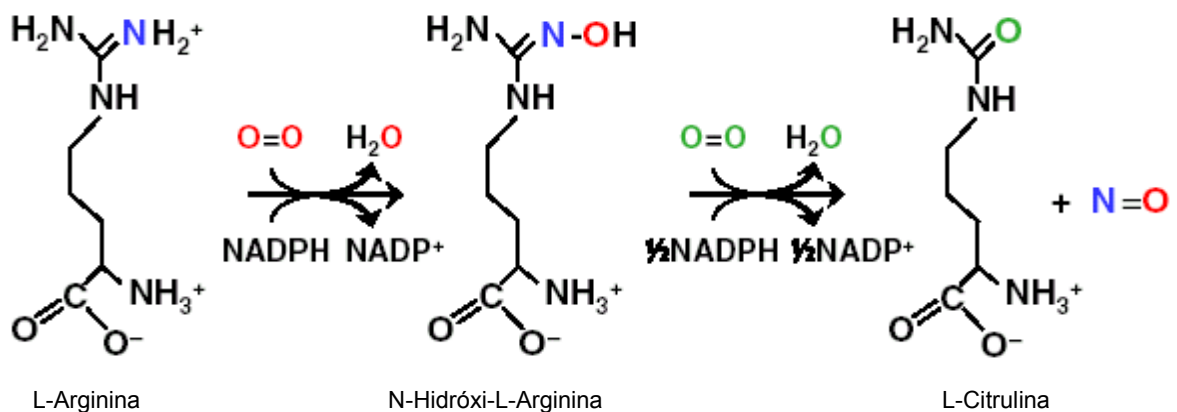


FIGURA 1 - Etapas da formação de NO e L-Citrulina a partir de L-Arginina.

A eNOS está situada principalmente na região das cavéolas da célula endotelial e representa o estado inativo quando ligada a proteína calveolina, principalmente a calveolina-1 (GRATTON, BERNATCHEZ & SESSA, 2004). Entretanto, uma série de estímulos fisiológicos, como o estresse de cisalhamento, e agentes farmacológicos ativam a eNOS por meio da liberação do seu sítio inibitório, sendo esta ativação frequentemente associada ao aumento da concentração de Ca^{2+} e calmodulina (MICHEL & FERON, 1997).

A bioatividade do NO depende basicamente de três fatores: síntese, como descrita anteriormente; inativação, devido à reação com ânions superóxido (O_2^-) e sensibilidade do tecido alvo ao NO (RUSH, TURK & LAUGHLIN, 2003), porém a mensuração dos dois primeiros fatores, síntese e inativação, reflete na biodisponibilidade do NO

A função clássica do NO em produzir o relaxamento das células musculares

lisas vasculares ocorre através da ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (sGC), que por sua vez, catalisa a saída de dois fosfatos da guanosina trifosfato (GTP) aumentando os níveis de guanosina monofosfato cíclico (GMP cíclico). A ativação de proteínas quinases dependentes de GMP cíclico acarreta em eventos que reduzem a concentração de Ca^{2+} intracelular como a saída de Ca^{2+} da célula, seqüestro para o retículo sarcoplasmático, diminuição na entrada do Ca^{2+} e até mesmo redução na sensibilidade de proteínas contráteis ao Ca^{2+} . Representando o conjunto de fatores que promovem o relaxamento dos vasos sanguíneos por mecanismos relacionados à via NO-GMP cíclico (WALSH, KARGACIN, KENDRICK-JONES & LINCOLN, 1995).

A FIGURA 2 ilustra os eventos que estimulam a produção de NO, acarretando no efeito parácrino do relaxamento do músculo liso, bem como a sua inativação pelo ânion superóxido formando o peróxinitrito (ONOO^-), substância que além de não possuir propriedades vasodilatadoras promove danos a estruturas celulares como a oxidação de lipídios .

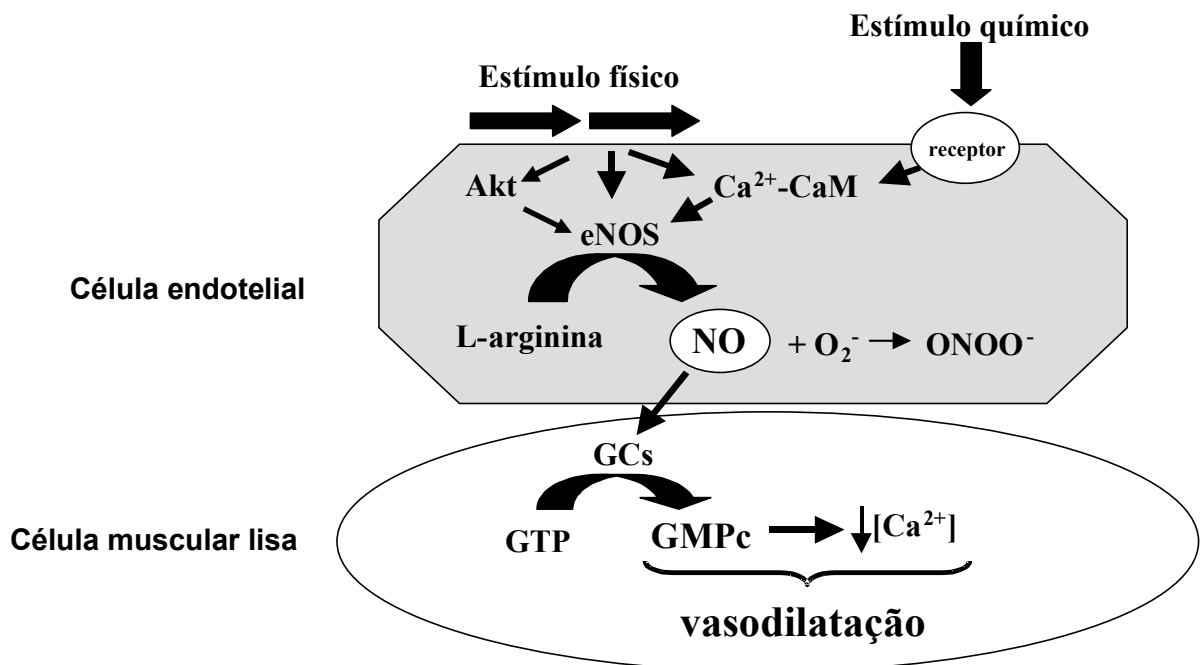


FIGURA 2 - Estímulos e mecanismos envolvidos na síntese e remoção de NO, e seu efeito parácrino no músculo liso vascular que acarretam na vasodilatação (adaptado de HARRISSON, 1997).

Além do efeito vasodilatador, o NO derivado do endotélio exerce uma série de outras funções nos vasos como a inibição da agregação plaquetária, controle da proliferação celular inibindo a mitose de células musculares lisas, regulação da adesão leucocitária reduzindo a expressão de moléculas de adesão e, finalmente, pode agir como um antioxidante através de sua reação com peróxidos lipídicos (GEWALTIG & KOJDA, 2002).

O conjunto de exemplos citados acima já justificam a importância de mensurar óxido nítrico vascular, porém a quantificação precisa e direta do NO é muito difícil devido a sua curta meia vida e alta reatividade. Entretanto, o assessoramento da biodisponibilidade do NO e, conseqüentemente da função endotelial, pode ser determinado indiretamente pela técnica da reatividade vascular, induzindo a produção de NO por manobras fisiológicas ou farmacológicas que estimulam a vasodilatação dependente do endotélio (DEANFIELD, HALCOX & RABELINK, 2007). Outra maneira indireta também bastante utilizada é a medida de seus produtos mais estáveis como o nitrito e nitrato (LUNDBERG, WEITZBERG & GLADWIN, 2008).

Grande parte do conhecimento a respeito do controle do óxido nítrico no relaxamento vascular advém de estudos que utilizam bioensaios (MONCADA & HIGGS, 2006). Dentre os modelos *in vitro*, o assessoramento da função vasomotora em sistemas de vaso isolado é uma boa ferramenta no estudo do controle da vasomotricidade, uma vez que não sofre interferência de fatores presentes na circulação nem do sistema nervoso (GONZALES, CARTER & KANAGY, 2000). Apesar da capacidade de extrapolação limitada, esse tipo de abordagem permite uma análise mais detalhada dos mecanismos envolvidos na produção do NO bem como a de seus inativadores. Um dos modelos de investigação experimental será abordado com mais detalhes na descrição dos métodos.

2.3 Treinamento físico e função endotelial

É bem estabelecido que o exercício físico contribui significativamente para a manutenção da função cardiovascular (SHEPHARD & BALADY, 1999). Estudos indicam que a capacidade de realizar esforços é uma ferramenta poderosa em prever o surgimento de doenças cardíacas (PRAKASH, MYERS,

FROELICHER, MARCUS, DO, KALISSETTI, FRONING & ATWOOD, 2001) e, segundo MYERS et al. (2002), esse índice pode ser utilizado como um bom preditor de mortalidade, superando outros fatores de risco bem estabelecidos para doenças cardiovasculares.

A melhora da função endotelial representa um dos muitos fatores benéficos do treinamento físico aeróbio. Esse efeito positivo, observado pelo aumento da reatividade vascular, foi descrito tanto em indivíduos (CLARKSON, MONTGOMERY, H.E, MULLEN, DONALD, POWE, BULL., JUBB, WORLD & DEANFIELD, 1999) como em animais saudáveis (MCALLISTER, JASPERSE & LAUGHLIN, 2005; JOHNSON, RUSH, TURK, PRICE & LAUGHLIN, 2001), como quando associados à diversas patologias (KOBAYASHI, TSURUYA, IWASAWA, IKEDA, HASHIMOTO, YASU, UEBA, KUBO, FUJII, KAWAKAMI & SAITO, 2003; MINAMI, ISHIMURA, HARADA, SAKAMOTO, NIWA & NAKAYA, 2002). Ao passo que o sedentarismo é capaz de deprimir a função endotelial (SUVORAVA, LAUER & KOJDA, 2004).

Sabe-se que a prática regular de exercícios físicos acarreta em ajustes vasculares que possibilitam um melhor controle da biodisponibilidade do óxido nítrico. Esse efeito é garantido pelo aumento da expressão da eNOS, como demonstrado por ZANCHI, BECHARA, TANAKA, DEBBAS, BARTHOLOMEU & RAMIRES (2006) e por outros grupos (FLEMING & BUSSE, 2003; FUKAI, SIEGFRIED, FUKAI, CHENG, KOJDA & HARRISON, 2000), e também pela maior atividade dessa enzima (HAMBRECHT, ADAMS, ERBS, LINKE, KRANKEL, SHU, BAITHER, GIELEN, THIELE, GUMMERT, MOHR & SCHULER, 2003). Além da síntese, o treinamento físico também ativa vias que aumentam a capacidade de tamponar o superóxido por aumentar a expressão das diferentes isoformas da superóxido dismutase: extracelular (ec-SOD, FUKAI et al., 2000), citossólica (Cu-Zn SOD, RUSH et al., 2003) e mitocondrial (Mn SOD, YOUNG, KNIGHT, VICKERS, WESTBROOK, MADAMANCHI, RUNGE, ISCHIROPOULOS & BALLINGER, 2004). Garantindo a biodisponibilidade do NO através de sua síntese aumentada e inativação diminuída.

A redução da produção de EROs também é outro importante fator já que ADAMS, LINKE, KRANKEL, ERBS, GIELEN, MOBIUS-WINKLER, GUMMERT, MOHR, SCHULER e HAMBRECHT (2005), demonstraram que o treinamento físico aeróbico foi capaz de reduzir a expressão de subunidades do complexo enzimático

NAD(P)H oxidase (gp91 phox e p22phox), enzima que corresponde a principal fonte de EROs nos vasos e que é presente em níveis elevados em diversas doenças cardiovasculares (CAI, GRIENGLING & HARRISON, 2003).

Fukai et al. (2000), demonstraram que o aumento da expressão da eNOS é de fundamental importância no controle da biodisponibilidade do NO, não somente por sintetizar o NO, mas também, devido à influência que o NO exerce na estimulação da expressão da ec-SOD, uma importante isoforma no controle do estado redox vascular (JUNG, MARKLUND, GEIGER, PEDRAZZINI, BUSSE & BRANDES, 2003).

Entretanto, os mecanismos envolvidos no aumento da expressão da eNOS sob influência do treinamento físico ainda não estão completamente esclarecidos. Acredita-se que o aumento do estresse de cisalhamento na parede dos vasos e que mecanismos ligados à sinalização redox sejam os estímulos iniciais para o desencadeamento de vias que ativam fatores de transcrição para a expressão da eNOS (KOJDA & HAMBRECHT, 2005).

2.4 Estresse de cisalhamento

Devido ao íntimo contato com o sangue circulante, as células endoteliais estão submetidas constantemente ao estresse mecânico gerado pelo fluxo sangüíneo incluindo o estresse por estiramento e o estresse de cisalhamento ou “shear stress” como é freqüentemente conhecido (FISHER, CHIEN, BARAKAT & NEREM, 2001; BOO & JO, 2003).

O estresse de cisalhamento é a força exercida pelo sangue corrente paralelamente ao eixo longitudinal dos vasos sangüíneos (NIEBAUER e COOKE, 1996). Este estresse, assim como diferentes estímulos humorais, influenciam a fosforilação da enzima eNOS e, conseqüentemente a liberação de NO (BOO, HWANG, SYKES, MICHELL, KEMP, LUM & JO, 2002).

Evidências na literatura demonstram que o estresse de cisalhamento aumenta significativamente durante o exercício dinâmico, acompanhando o aumento no débito cardíaco ocasionado pelo esforço (CHENG, HERFKENS & TAYLOR, 2003).

A ativação da expressão da eNOS sob estímulo do estresse de cisalhamento foi demonstrada ser dependente da proteína tirosina quinase c-Src. DAVIS, CAI,

DRUMMOND & HARRISON (2001), verificaram que tanto o aumento do RNA mensageiro da eNOS bem como a maior estabilidade do mesmo ocorrem após a exposição de células endoteliais a um maior estresse de cisalhamento, e que, inibidores da c-Src abolem completamente este aumento.

Posteriormente, DAVIS, CAI, MCCANN, FUKAI & HARRISON (2003) demonstraram que o aumento da expressão em função do treinamento físico ocorre pela mesma via supracitada, uma vez que camundongos heterozigotos para o gene da c-Src apresentaram uma atenuação no aumento da eNOS após um período de treino comparado a animais selvagens.

É bem provável que a produção de NO também seja modulada positivamente durante o exercício físico devido ao maior estresse de cisalhamento. MCCABE, FULTON, ROMAN, & SESSA (2000) verificaram em cultura de células endoteliais que o estresse de cisalhamento aumentado ativa a proteína quinase B (Akt), que por sua vez, fosforila a eNOS em resíduos serina (1177) aumentando a sensibilidade desta enzima ao Ca^{2+} /calmodulina, ou seja, estimulando a síntese de NO sem a necessidade de alterar as concentração basais destes fatores. Além da Akt, evidências acumuladas demonstraram que outras proteínas são capazes de fosforilar e ativar a eNOS como a proteína quinase ativada por AMP (AMPK, BOO et al., 2002) e a cálcio calmodulina quinase (Ca^{2+} -CaM quinase II, CAI, DAVIS, DRUMMOND & HARRISON, 2001). Entretanto, esses mecanismos ainda não foram evidenciados sob estímulo do exercício físico.

2.5 Espécies Reativas de Oxigênio

As Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) são moléculas produzidas por todas células nos organismos aeróbios (McCORD, 2000), sendo que qualquer enzima capaz de metabolizar oxigênio carrega com ela a intencional ou acidental capacidade de gerar EROs (LIU, YEO, OVERVIK-DOUKI, HAGEN, DONIGER, CHYU, BROOKS & AMES, 2005).

Esse conjunto de moléculas que são derivados intermediários da redução incompleta do oxigênio molecular à água pode ser representado pelo ânion

superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (OH^\cdot), e, quando produzidos em excesso, determinam as propriedades tóxicas do oxigênio (KOJDA & HARRISSON, 1999).

Quando a produção de EROs ultrapassa a capacidade de defesa por meio dos mecanismos antioxidantes, ocorre o estado conhecido como estresse oxidativo que é caracterizado pela oxidação excessiva de macromoléculas biológicas como DNA, carboidratos, lipídios e proteínas (CAI & HARRISON, 2000), sendo o estresse oxidativo vascular um reconhecido fator preliminar a muitas condições patológicas no sistema cardiovascular (TANIYAMA & GRIENGLING, 2003). Entretanto, esse estresse pode ser prevenido ou reparado através de intervenções que suprimam as vias metabólicas que geram as EROs ou que multipliquem ou simulem os efeitos dos mecanismos de defesa antioxidantes (LAURINDO, de SOUZA & da LUZ, 1998).

Apesar de popularmente conhecidas por suas características tóxicas, quantidades mínimas de EROs são fundamentais para a manutenção das funções celulares fisiológicas (POLYTARCHOU & PAPADIMITRIOU, 2005). Através do seu envolvimento com reações de perda (oxidação) e ganho (redução) de elétrons, conhecidas como reações redox, as EROs são capazes de alterar a estrutura de diversas substâncias como citado anteriormente.

Atualmente, sabe-se que as alterações exercidas pelas EROs em proteínas representam um tipo de modificação pós traducional que tanto podem ativar como inativar proteínas (HUMPHRIES, PENNYPACKER & TAYLOR, 2007).

A localização específica das fontes de EROs confere especificidade às reações redox (TERADA, 2006) e o reconhecimento dessas moléculas nos mecanismos fisiológicos de sinalização celular também abrangem os ajustes vasculares ao treinamento físico (KOJDA & HAMBRECHT, 2005). Entretanto ainda não se sabe como está a produção de espécies reativas de oxigênio após a realização de esforços.

Sabe-se que o peróxido de hidrogênio, mas não o ânion superóxido, ativa uma cascata de sinalização que promove o aumento da expressão da eNOS (DRUMMOND, CAI, DAVIS, RAMASAMY, & HARRISON, 2000). Além disso, HU, CORDA, ZWEIER, CAPOGROSSI, ZIEGELSTEIN (1998) verificaram oscilações na concentração de Ca^{2+} após a introdução de H_2O_2 no meio de cultura de células

endoteliais e, segundo Cai et al. (2001), o Ca^{2+} , juntamente com a proteína calmodulina (CaM), ativam uma proteína quinase dependente de Ca^{2+} -CaM (Ca²⁺-CaM quinase II) e a mesma ativa a proteína quinase Jannus (Jannus quinase 2), que por sua vez, ativa a expressão da enzima eNOS.

O envolvimento desta via, em função do treinamento físico, foi observado parcialmente por LAUER, SUVORAVA, RUTHER, JACOB, MEYER, HARRISON & KOJDA (2005), verificando que camundongos que superexpressam a catalase, enzima que converte H_2O_2 em água e oxigênio, não aumentam significativamente a expressão da eNOS após 3 semanas de treinamento.

Outra ação do H_2O_2 na bioatividade do NO foi descrita por THOMAS, CHEN & KEANEY (2002) demonstrando que esta espécie reativa de oxigênio não participa somente no aumento da expressão da eNOS, mas também promove a fosforilação desta enzima. Os investigadores verificaram que a introdução de H_2O_2 (250 μM) no meio de cultura de células endoteliais de porcos, aumentou de maneira importante a conversão de L-arginina em L-citrulina e a produção de GMP cíclico.

Estudos indicam que durante a realização de esforços físicos ocorre uma maior produção de EROs (BEJMA & JI, 1999), aumentando a concentração de marcadores de estresse oxidativo em diversas regiões do corpo como músculos esquelético e cardíaco (LIU et al., 2000), fígado (BEJMA, RAMIRES & JI, 2000) e plasma (CHEVION, MORAN, HELED, SHANI, REGEV, ABBOU, BERENSHTEIN, STADTMAN & EPSTEIN, 2003). Lauer et al. (2005), sugeriram que o H_2O_2 , por possuir uma meia vida mais prolongada, seria gerado nos músculos ativos, partindo para a corrente sanguínea e, conseqüentemente aos vasos sanguíneos, porém, esta foi apenas uma hipótese ainda não demonstrada. Outra possibilidade que também não foi investigada é um aumento na produção local nos vasos.

Entretanto, pouco se sabe a respeito da formação local de espécies reativas de oxigênio nos vasos bem como possíveis alterações no estado redox vascular após uma sessão de exercícios e, devido à importância que os mecanismos de sinalização redox exercem nos vasos sanguíneos, é de fundamental importância uma melhor caracterização destes após a realização de exercícios físicos.

2.6 Efeito agudo do exercício na reatividade vascular

Alguns efeitos benéficos do exercício físico podem ser evidenciados imediatamente após a realização do mesmo. Um exemplo dessa ação benéfica imediatamente após o exercício é a melhora nos níveis pressóricos (BRANDÃO RONDON, ALVES, BRAGA, TEIXEIRA, BARRETTO, KRIEGER & NEGRÃO, 2000).

Entretanto, o efeito de uma sessão aguda de exercício na resposta vasomotora dependente do endotélio é ainda um tema controverso.

Em estudos realizados por JEN, CHAN & CHEN (2002) e CHENG et al. (1999), foram verificadas diferenças significativas no relaxamento de segmentos aórticos, quando induzidos farmacologicamente por agonistas vasodilatadores em ratos submetidos a uma sessão de exercício aeróbico. Entretanto, LAUGHLIN et al., (1997) não encontraram diferenças significativas na vasodilatação imediatamente após o exercício. Ao contrário, HARAM et al. (2006) observaram uma queda no efeito dilatador dependente do endotélio em animais submetidos a uma sessão de esforço.

Com relação ao efeito vasoconstritor, HOWARD & DICARLO (1992), observaram uma resposta vasoconstritora à noradrenalina (NE) significativamente atenuada ao comparar coelhos sedentários a outros coelhos logo após a realização de exercícios. Resultados semelhantes foram observados em aorta de ratos por IZAWA, MORIKAWA, INOUE, MIZUTA, YAMASHITA, OHNO & KOMABAYASHI (1995) e BECHARA, TANAKA, JORDÃO, OLIVEIRA & RAMIRES (aceito para publicação 2008). Entretanto, SPIER, LAUGHLIN & DELP (1999) só encontraram reduções significativas na vasoconstrição à noradrenalina após 10 semanas de treinamento.

Estudos demonstrando os mecanismos envolvidos nessa possível melhora da função endotelial após o exercício físico agudo são escassos. CHENG et al. (1999), atribui parcialmente o aumento da vasodilatação à acetilcolina (ACh) e à clonidina (agonista alfa-2 adrenérgicos), a quantidade e sensibilidade aumentada de receptores muscarínicos e alfa-2 adrenérgicos, respectivamente. Ao passo que JEN et al. (2002) observaram que a resposta vasodilatadora otimizada foi correspondente ao aumento da concentração de Ca^{2+} nas células endoteliais quando estimulada por ACh.

O aumento da biodisponibilidade de NO pode ser um importante fator nessa melhora aguda, porém ainda não se sabe como está o equilíbrio entre a produção e

inativação do NO após uma sessão de exercícios.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais:

O presente estudo por objetivo investigar experimentalmente se uma sessão de exercício físico aeróbico é capaz de alterar a resposta vasomotora em aorta de ratos, verificando o efeito do exercício no controle da biodisponibilidade do NO vascular.

3.2 Específicos:

Analisar o efeito de uma sessão de exercício físico aeróbico na:

- resposta vasodilatadora a agentes com ação dependente e independente do endotélio;
- participação da enzima eNOS na vasomotricidade arterial;
- fosforilação das proteínas Akt e eNOS;
- produção dos derivados do metabolismo do NO: nitrato e nitrito;
- produção das espécies reativas de oxigênio: superóxido e peróxido de hidrogênio;
- atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase e
- caracterização do estado redox vascular: peroxidação lipídica e razão glutatona reduzida e oxidada

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostra e manipulação dos animais

A amostra foi formada por 35 ratos Wistar, machos, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que permaneceram em gaiolas com quatro animais, onde foram alimentados com dieta

laboratorial padrão e água “ad libitum”. A temperatura ambiente foi mantida entre 22-23°C e adotou-se ciclo claro/escuro de 12 horas.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, www.cobea.org.br)¹. O projeto de pesquisa (nº2008/03) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo.

Inicialmente, os animais passaram por um período de aclimatação à esteira rolante de 5 dias tendo que se locomover por 10 min a uma velocidade mínima (3m/min).

4.2 Teste de esforço máximo

Após a fase de adaptação à esteira, todos os animais foram submetidos a um teste de esforço máximo para a obtenção dos valores necessários para o cálculo correto da velocidade da esteira durante o exercício agudo.

O teste físico teve início com uma velocidade de 3 m/min tendo um incremento de mais 3 m/min a cada 3 min, sendo realizado até os animais atingirem a exaustão (adaptado de SILVA, BRUM, NEGRÃO & KRIEGER, 1997).

Os ratos foram divididos de acordo com a performance obtida no teste máximo para que os grupos tivessem uma capacidade média similar, sendo separados em dois grupos: controle (CT, n=18) e exercício (EX, n=17).

4.3 Exercício físico agudo

A sessão de exercício físico propriamente dita representa a variável independente do estudo, e foi realizada após um período de pelo menos 72h após o teste de esforço.

Os ratos do grupo EX realizaram uma hora de esforço na esteira sendo os 15 minutos iniciais com velocidade progressiva até atingir 55-60% da velocidade

¹ Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, www.cobea.org.br)

máxima individual, após a fase crescente da velocidade os animais permaneceram por mais 45 minutos a 55-60% totalizando 60 minutos de exercício. Já os ratos do grupo CT foram mantidos em caixas situadas sobre as baias da esteira para que eles fossem submetidos a uma situação semelhante de barulho e tremor.

4.4 Eutanásia, retirada e preparo dos tecidos

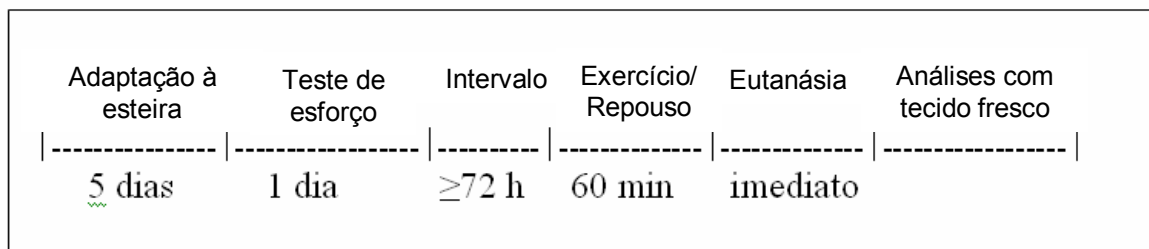
Imediatamente após o exercício, os ratos de ambos os grupos foram eutanasiados em câmara de CO₂ para a realização da cirurgia e coleta dos tecidos.

A aorta torácica de cada animal foi cuidadosamente retirada e colocada em tampão Krebs-Henseleite (em mmol/L: NaCl 115, KCl 4,7, MgSO₄ 1,2, KH₂PO₄ 1,5, NaHCO₃ 25, CaCl₂ 2,5, glicose 11,1; pH 7,4) para a limpeza de sangue e tecidos adjacentes ao músculo liso.

Inicialmente, os vasos foram cortados em anéis de 4-5 mm, sendo alguns anéis utilizados para análises com o tecido fresco e outras imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80°C para posterior homogeneização e análises. Os procedimentos de homogeneização serão descritos com maiores detalhes posteriormente.

Um esquema resumido do protocolo experimental pode ser visualizado no QUADRO 1.

QUADRO 1 - Seqüência Experimental



4.5 Reatividade Vascular

Dois anéis aórticos foram destinados à análise da reatividade vascular sendo suspensos em um banho de órgãos por um par de ganchos de aço inoxidável em cubas de vidro (14 ml), contendo a solução nutriente e tamponadora, Krebs-Henseleit, mantidos em 37°C e aerados com uma mistura de 95% O₂ e 5% CO₂. Um gancho foi conectado ao transdutor de tensão (transdutor isométrico BIOPAC, EUA) para a aquisição da tensão desenvolvida pelos anéis e o outro ao fundo da cuba, para que o vaso permanecesse constantemente banhado na solução de Krebs (ZANCHI et al., 2006).

Inicialmente, os anéis vasculares foram distendidos a uma tensão de repouso de 2 g. Após um período de estabilização de 60 minutos, trocando o tampão a cada 20 minutos e reajustando a tensão basal, as curvas de concentração e efeito (CCE) foram realizadas pelo método das concentrações cumulativas de agonistas (ZANCHI et al., 2006).

Para a obtenção da CCE à acetilcolina (ACh, agente vasodilatador endotélio dependente), foi realizado previamente uma pré-contracção do segmento aórtico pela adição de noradrenalina (NE) na concentração de 10⁻⁷M, que gera uma contracção submáxima bem sustentada (BECHARA et al., aceito para publicação). Após a estabilização do efeito contrátil, foram adicionadas doses crescentes de ACh, analisando-se a resposta vasodilatadora máxima bem como a sensibilidade à acção deste agonista, sendo o intervalo de concentração utilizado de 10⁻¹⁰ até 10⁻⁴ M.

Além da resposta vasodilatadora dependente do endotélio, avaliou-se o relaxamento vascular ao nitroprussiato de sódio (NPS), um doador de óxido nítrico que age de maneira independente do endotélio, sendo a CCE realizada da mesma maneira descrita anteriormente, porém utilizado o NPS (10⁻¹⁰ até 10⁻⁴ M).

Entre as diferentes curvas realizadas, os anéis foram lavados trocando-se seguidamente a solução de Krebs (três vezes por 5 minutos) a fim de retirar as drogas das cubas e evitar qualquer tipo de interferência na análise subsequente.

Outro parâmetro analisado foi a participação da eNOS no relaxamento vascular, por meio da inibição da enzima eNOS com o análogo da L-arginina, N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), realizando a CCE à ACh após a pré-incubação com L-NAME 10⁻⁴ M por 30 minutos.

Alguns poucos anéis foram deendotelizados para avaliar algum possível efeito

do exercício físico no relaxamento a acetilcolina de modo independente do endotélio.

A realização destas curvas possibilita analisar as diferenças nas respostas aos agonistas em cada concentração, análise do efeito máximo ($E_{\text{máx}}$) e da sensibilidade (EC_{50}), ou seja, a concentração necessária do agonista para atingir 50% da resposta máxima.

O protocolo de reatividade vascular resumido bem como os parâmetros analisados podem ser visualizados na ilustração abaixo (FIGURA 3).

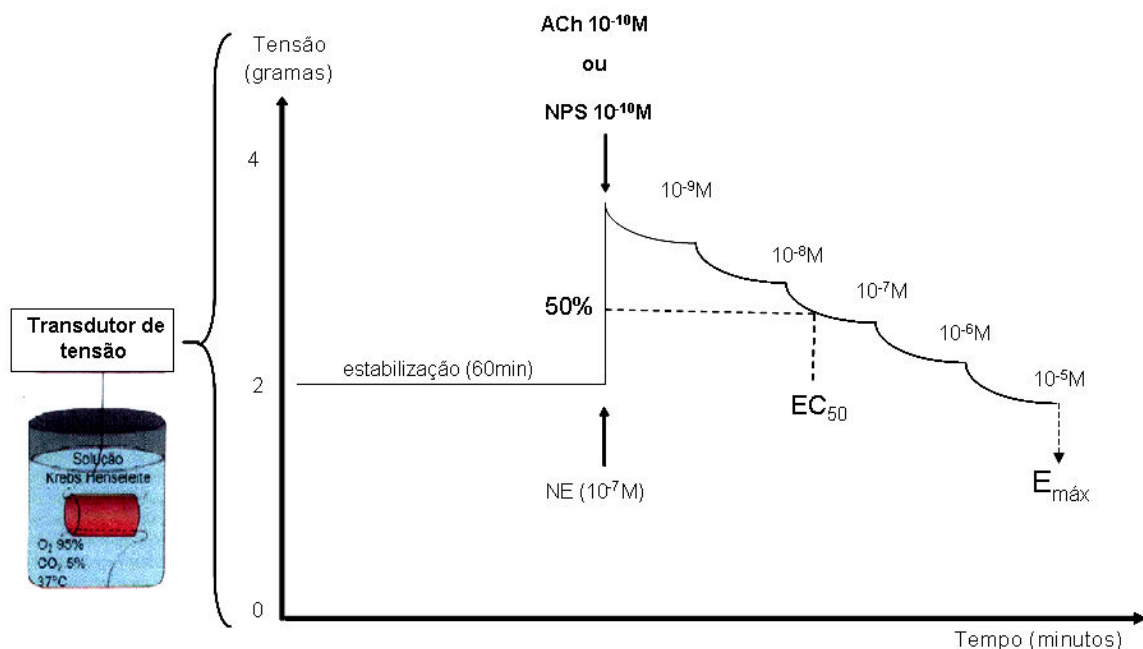


FIGURA 3 – Desenho ilustrativo do protocolo de reatividade vascular e dos parâmetros analisados.

4.6 Quantificação de nitrato e nitrito vascular

Como citado anteriormente, os derivados do metabolismo do NO, nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-), representam um outro indicador da biodisponibilidade do NO, sendo os mesmos, determinados por quimioluminescência no analisador de NO (Sievers, modelo NOA 280, EUA).

Inicialmente, dois anéis por animal foram homogeneizados em tampão fostato salino (PBS, pH 7,4) contendo inibidores de protease (aprotinina 1ug/ml, leupeptina

1ug/ml e fenil-metil-sulfonil 10 mM) e as concentrações de nitrato e nitrito nos homogenatos determinadas conforme descrito (LEITE, DANILOVIC, MORIEL, DANTAS, MARKLUND, DANTAS & LAURINDO, 2003). De maneira breve, este método requer a redução de nitrato e nitrito para óxido nítrico por meio da reação com o cloreto de vanádio ($VnCl_4$) em ácido clorídrico a 95 °C. O óxido nítrico gerado é carregado por N_2 , um gás inerte, a uma câmara de geração de ozônio. A reação entre NO e ozônio gera luz, quantificada por fotomultiplicadoras. As curvas de calibração em níveis múltiplos foram realizadas com a injeção de padrões externos e a concentração dos derivados do NO foram quantificados a partir dos padrões. Os valores medidos de nitrato e nitrito em umol foram corrigidos pela quantidade total de proteínas dos homogenatos (BRADFORD, 1976).

4.7 Expressão das proteínas eNOS, eNOS fosforilada, Akt e Akt fosforilada

A fim de avaliar se o exercício físico promove uma ativação sustentada de uma via responsiva ao estresse de cisalhamento, Akt – eNOS (McCABE et al. 2000), foram analisadas a fosforilação dessas proteínas em resíduos específicos.

Inicialmente, três anéis aórticos de aproximadamente 4 mm foram homogeneizados em tampão de lise na presença de inibidores de protease (aprotinina 1ug/ml, leupetina 1 ug/ml e fenil-metil-sulfonil 10 mM) e fosfatase (pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 10 mM, ortovanato de sódio 1 mM e beta glicerofosfato 2 mM). Após a determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford (1976), alíquotas de 50 ug foram diluídas em tampão de amostra contendo azul de bromofenol 0,02%, mercaptoetanol 10 mM e dodecil sulfato de sódio 10%. As amostras foram posteriormente aquecidas por 5 minutos a 100°C para desnaturação de proteínas e quebra de pontes dissulfeto. As amostras e um padrão de bandas de pesos moleculares conhecidos (Kaleidoscope, Bio-Rad, EUA) foram aplicados ao gel de eletroforese de poliacrilamida 10% e submetidos à corrente elétrica contínua de 50 mA por 120 minutos para separação eletroforética das proteínas.

Após a separação, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema semi seco com corrente elétrica contínua de 0,8 mA/cm²

por 60 minutos (Semiphor, Hoefer-Pharmacia, Suécia). A membrana de nitrocelulose foi rapidamente corada com a solução de Ponceau (Sigma) para visualização da correta transferência de proteínas das amostras e do padrão de pesos moleculares. A membrana foi bloqueada através da incubação com leite 5% preparado em tampão contendo tris, cloreto sódio e tween 0,05% (TBS-T) durante duas horas com o objetivo de minimizar a ligação inespecífica dos anticorpos. Os anticorpos primários anti eNOS total (Upstate, 1:1000) e fosforilado na serina 1177 (Santa Cruz, 1:1000) e os anticorpos anti Akt total (Calbiochem, 1:1000) e fosforilado na (serina473 Santa Cruz) preparados em TBS-T, foram incubados durante toda a noite sob agitação a 4°C. Após a lavagem com TBS-T (3 vezes por dez minutos cada) a membrana foi incubada por 2 horas em temperatura ambiente com os anticorpos secundários específicos para reconhecer os anticorpos primários, sendo os mesmos conjugados com peroxidase. Após novas lavagens, a membrana foi então revelada por método quimioluminescente, (peroxidase-H₂O₂-luminol), utilizando-se para tal fim o kit ECL (Amersham-Pharmacia, Grã-Bretanha). Após 1 minuto de reação, a membrana foi exposta ao filme radiográfico e revelada em equipamento automatizado (Kodak). A expressão protéica foi determinada densitometricamente através de um software de imagem (Scion, USA).

4.8 Detecção do superóxido: quimioluminescência da lucigenina

Como superóxido é um importante modulador da biodisponibilidade do NO e como a sua quantificação precisa não representa uma tarefa simples (TARPEY & FRIDOVICH, 2001) duas metodologias foram empregadas com a finalidade de medir essa espécie reativa de oxigênio.

O método quantitativo para analisar a produção de superóxido vascular foi o da quimioluminescência da lucigenina.

Imediatamente após o sacrifício, dois anéis de 4 mm de comprimento foram incubados por 30 minutos em tampão Krebs-HEPES (pH 7,4), 37°C com 95%O₂/5%CO₂ para a estabilização. Neste período, um anel foi separado para pré-incubação com o ácido dietilcarbâmico (DETC, 1mM), com o intuito de inibir a enzima SOD e o outro foi mantido como controle. Os mesmos foram transferidos para tubos

de cintilação contendo 1ml do tampão Krebs-HEPES e lucigenina 5 uM, conforme descrito por JANISZEWSKI, SOUZA, LIU, PEDRO, ZWEIER & LAURINDO (2002) e a redução da lucigenina pelo superóxido gerado pelos anéis produz luz que é então captada pelo luminômetro (Berthold 9505, EG&G Instruments GmbH, Munich, Germany).

Após a contagem da luminosidade basal, foram adicionados difeniliodonio (DPI, 20 mM), um inibidor da enzima NADP(H) oxidase, e a contagem luminescente foi novamente medida.

A diferença entre o sinal gerado pelo vaso pré incubado com o DETC com o vaso controle (sem incubação), fornece um indicador da participação da SOD em inibir o superóxido além de garantir a especificidade do método. Já a adição de DPI, indica a contribuição do complexo enzimático NADP(H) oxidase na produção do superóxido.

Os resultados foram normalizados pelo peso seco dos segmentos aórticos sendo expresso como cpm/min/mg de peso seco .

4.9 Detecção do superóxido: oxidação do hidroetídio (DHE)

A outra metodologia empregada na mensuração do superóxido utilizada foi a análise dos produtos fluorescentes derivados da oxidação da DHE. Primeiramente, um anel de cada animal foi emblocado em gel de temperatura ótima de congelamento (OCT), para posterior corte de 30 um em criostato.

As lâminas foram incubadas com o DHE (5 uM) por 20 minutos a 37 °C em ambiente úmido e protegido de luminosidade. Após o período de incubação as lâminas foram lavadas duas vezes com tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 e a análise feita em microscópio de fluorescência (modelo Axiovert 200M, Zeiss, Alemanha), método adaptado de MILLER, GUTTERMAN, RIOS, HEISTAD & DAVIDSON (1998).

Os derivados de oxidação da DHE geram uma coloração avermelhada sendo proporcional à produção de ânions superóxido.

Como controle negativo bem como especificidade da espécie reativa analisada, algumas lâminas foram previamente incubadas com a SOD conjugada

com polietilenoglicol (peg-SOD), um mimético da SOD que é capaz de atravessar a membrana da célula inibindo reação do superóxido com o substrato (DHE).

4.10 Detecção do peróxido de hidrogênio

O efeito da modulação pelo exercício físico na formação do peróxido de hidrogênio vascular também foi avaliado.

Para tanto, dois anéis frescos de aproximadamente 4 mm foram imediatamente incubados em tampão Krebs-Hepes com os reagentes “amplex red” (100 μ M) e peroxidase “horseradish” (1 U/ml). A reação catalisada pela peroxidase entre o peróxido de hidrogênio com o substrato “amplex red” forma o produto resofurina sendo o mesmo quantificado em leitor de microplaca em comprimento de onda de 590 nm. Como controle negativo e especificidade do método alguns anéis foram incubados com catalase (1000 U).

O cálculo do peróxido de hidrogênio vascular foi determinado pela comparação com padrões de H_2O_2 e a concentração final corrigida pelo peso seco do tecido (LANDMESSER, HORNIG & DREXLER, 2003).

4.11 Atividade total da enzima superóxido dismutase

A atividade total da enzima superóxido dismutase, ou seja, Cu-Zn SOD mais Mg SOD, foi determinada no segmento aórtico conforme descrito por (INOUE RAMASAMY, FUKAI, NEREM & HARRISON, 1996).

Inicialmente, dois segmentos aórticos de aproximadamente 4 mm foram homogeneizados com pestil e grau sob nitrogênio líquido em tampão Tris-HCl 50 mM, mercaptoetanol 0,1%, DTPA 0,01 mM, pH 7,4 e o pó obtido foi coletado em 300 μ l da solução acima. A seguir, o material foi centrifugado à 10.000 rpm (4°C) durante 10 minutos e o sobrenadante foi então separado para análise.

No espectrofotômetro (modelo U-2001; HITACHI, Japão) monitorou-se a taxa de redução do citocromo-c em 550 nm, induzida pelo superóxido gerado pelo sistema produtor de superóxido, xantina/xantina oxidase. Após a adição do homogenato vascular, que contém as enzimas superóxido dismutase, a taxa de redução do

citocromo c diminui em consequência do seqüestro do superóxido pela SOD. Uma unidade de atividade da SOD é definida como 50% de inibição da absorbância em 550nm, sendo os resultados obtidos normalizados pela concentração de proteínas dos homogenatos (BRADFORD, 1976).

4.12 Hidroperoxidação lipídica

A peroxidação lipídica é um dos marcadores de estresse oxidativo, situações em que a produção de oxidantes excede a capacidade do sistema de defesa antioxidante (REN, 2007).

Analisado em espectrofotômetro (modelo U-2001; HITACHI, Japão), a quantificação de hidroperóxidos lipídicos totais foi realizada em um anel aórtico por animal sendo homogeneizada em tampão fosfato salino e deproteinizado com TCA (10%).

O método descrito por NOUROOZ-ZADEH, TAJADDINI-SARMADI & WOLFF, (1994), se baseia na oxidação do ferro da substância Xylenol Orange (FOX) por hidroperóxidos lipídicos, gerando uma coloração que altera a absorbância de luz em um comprimento de onda de 560 nm. Os resultados foram normalizados pelo conteúdo protéico em parte do homogenato não deproteinizado (BRADFORD, 1976).

4.13 Razão glutathiona reduzida e oxidada

A razão entre a glutathiona reduzida (GSH) e a glutathiona oxidada (GSSG) tem sido extensivamente utilizada para detectar alterações no equilíbrio redox em diversas condições patológicas e após a realização de exercícios (URSO & CLARKSON, 2003).

Para a obtenção desta, as amostras foram homogeneizadas em tampão específico (sucrose 0,32M, EDTA 20mM e HEPES 10 mM), sendo analisadas por cromatografia de alta performance (Waters 464, EUA) acoplado a um detector eletroquímico (ESA, Colouchem, EUA). Inicialmente, foram injetados padrões de GSH e GSSG e as amostras quantificadas pela comparação com os padrões. Os resultados foram normalizados pela concentração protéica (BRADFORD, 1976).

4.14 Análise estatística

Para análise da reatividade vascular será utilizado o programa GraphPad Prism 4 determinando as diferenças significativas pela ANOVA de dois fatores com post hoc de Tukey sendo um fator a concentração das drogas e o outro os tratamentos (exercício e repouso).

As variáveis dependentes: massa corporal, velocidade máxima, sensibilidade aos agonistas (EC_{50}), atividade enzimática, expressão protéica, produção de ânions superóxido e os marcadores de estresse oxidativo foram analisados por teste t de Student não pareado adotando como diferença significativa o valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Uma vez que a variável independente foi uma única sessão de esforço físico é necessária uma amostra bastante homogênea quanto a peso e capacidade de esforço a fim de se evitar qualquer tipo de interferência nas demais variáveis dependentes mensuradas e, como pode ser visto nas FIGURAS 4 e 5 respectivamente, essas características não apresentaram diferenças estatísticas.

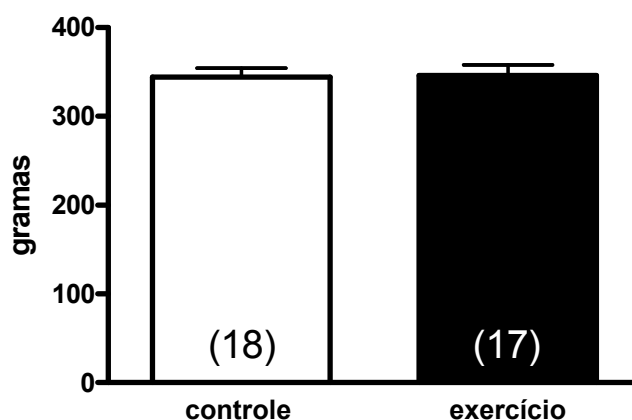


FIGURA 4 – Massa corporal total dos grupos controle e exercício no início dos experimentos. O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses.

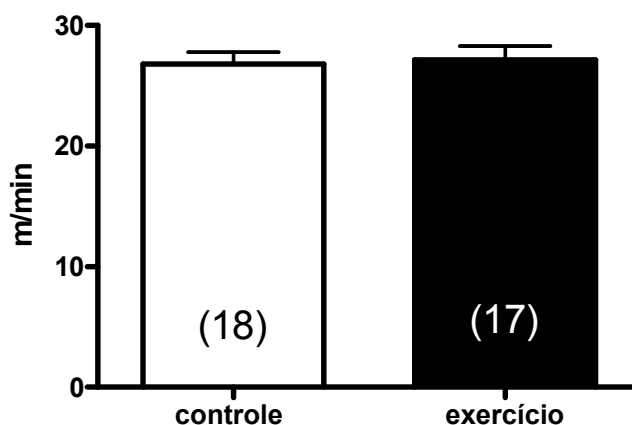


FIGURA 5 – Média das velocidades máximas individuais atingidas pelos animais dos grupos controle e exercício no início dos experimentos. O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses.

5.1 Reatividade Vascular

Os ratos do grupo EX apresentaram um relaxamento significativamente aumentado em relação aos que permaneceram em repouso podendo ser observadas diferenças nas concentrações de $10^{-8,5}$ a 10^{-7} M (FIGURA 6A), na sensibilidade (FIGURA 6B) e na resposta vasodilatadora máxima (FIGURA 6C). Assim como já esperado, os animais de ambos os grupos não vasodilataram na ausência do endotélio (FIGURA 6 inserto).

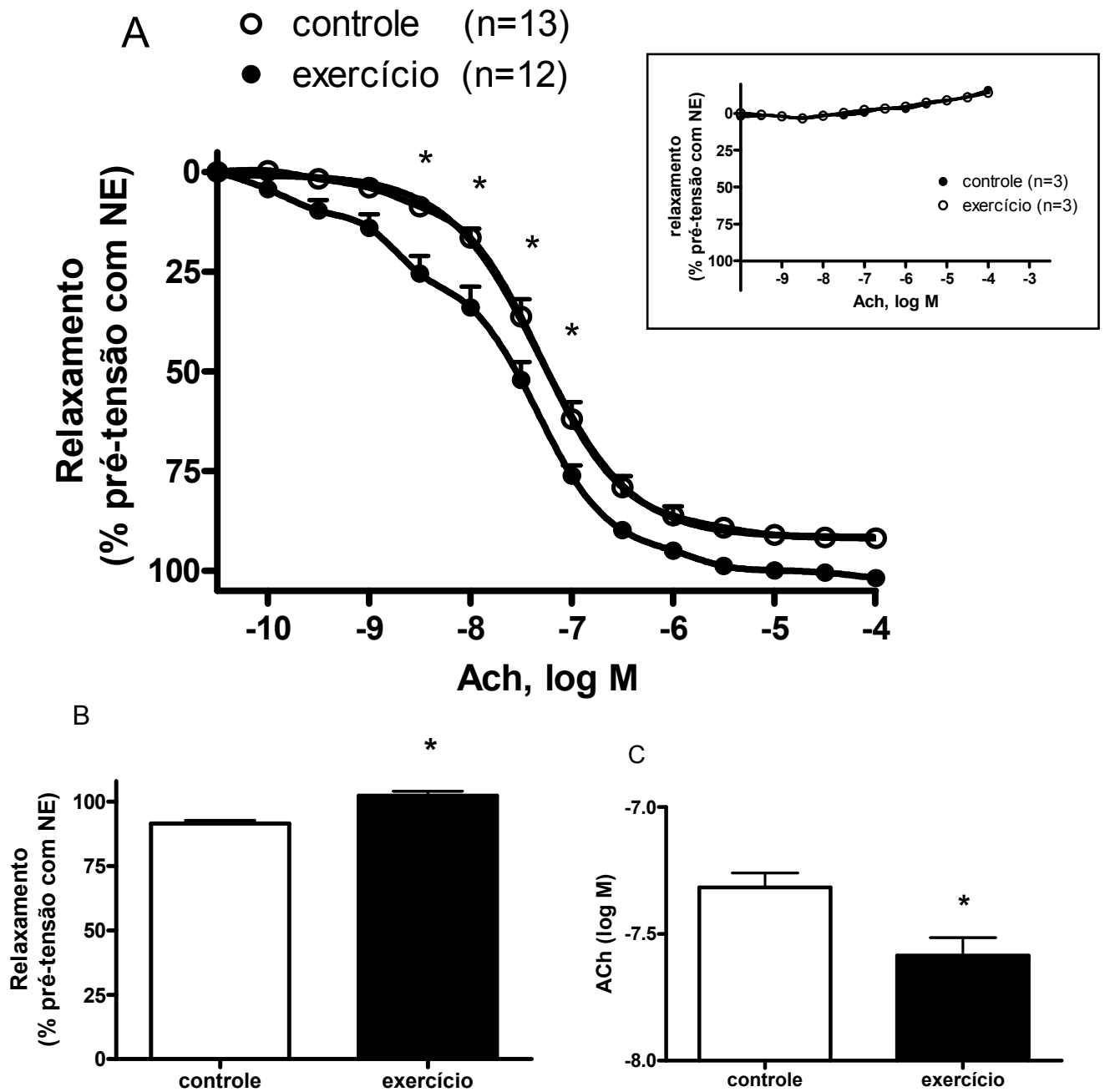


FIGURA 6 – (A) Curva concentração-efeito à acetilcolina nos anéis aórticos dos grupos controle e exercício com o endotélio preservado e com o endotélio removido (inserto). (B) Efeito dilatador máximo à acetilcolina. (C) Sensibilidade (EC₅₀) à acetilcolina. O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses. * p<0,05 vs. controle

Diferente do que se imaginava inicialmente, a resposta dilatadora independente do endotélio foi alterada após a realização do exercício físico, apresentando uma atenuação na sensibilidade nas doses de $10^{-8,5}$ a $10^{-6,5}$ M (FIGURA 7A). Esta menor sensibilidade fica bastante evidente ao analisar a EC_{50} para o nitroprussiato de sódio nos diferentes grupos (FIGURA 7B).

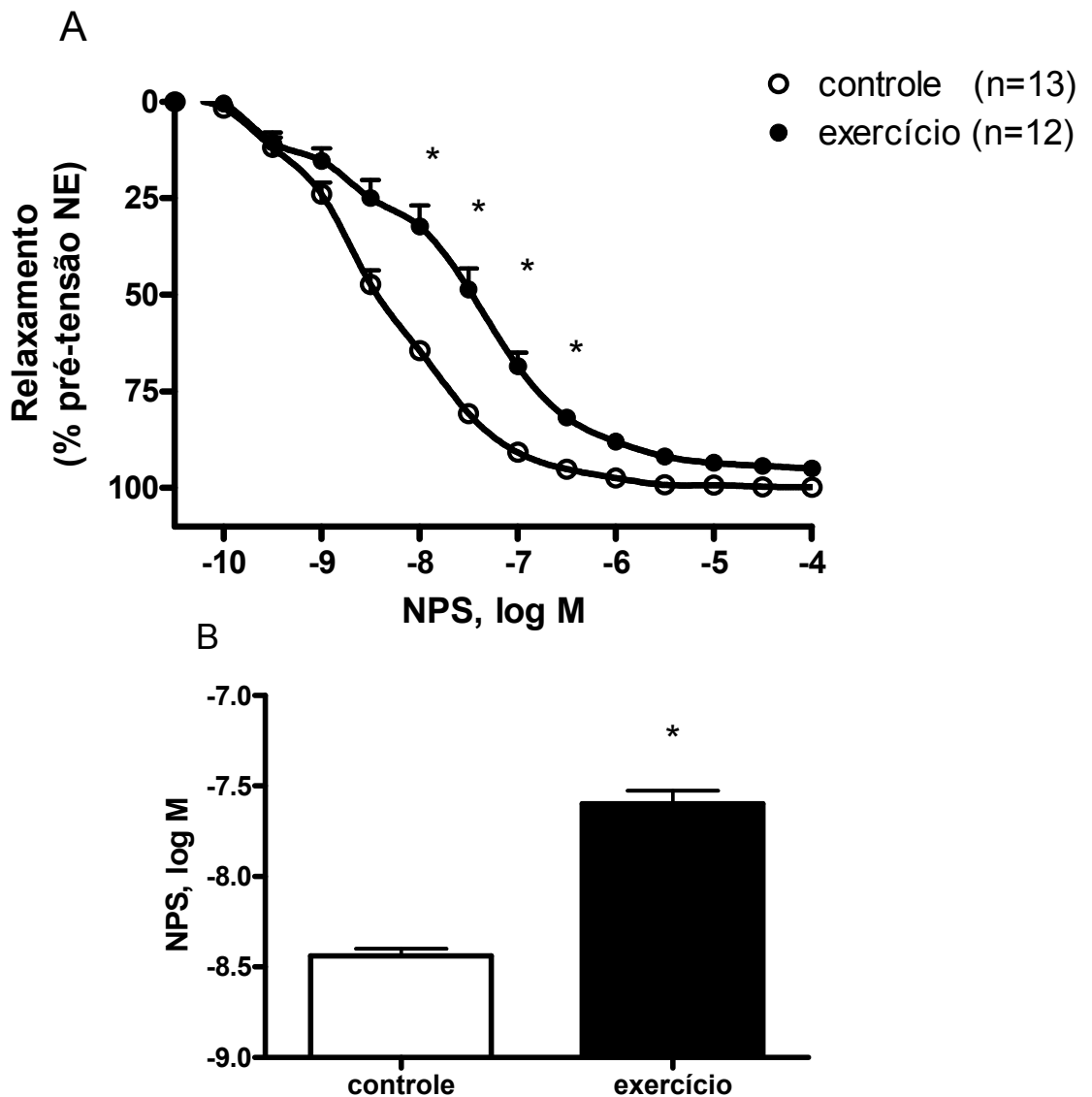


FIGURA 7 – (A) Curva concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio e (B) sensibilidade (EC_{50}) ao nitroprussiato de sódio. O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses. * $p < 0,05$ vs. controle.

A inibição da eNOS com L-NAME (10^{-4} M) diminuiu o relaxamento arterial à acetilcolina de ambos os grupos. Além disso, ao inibir esta enzima a diferença entre os grupos foi abolida (FIGURA 8).

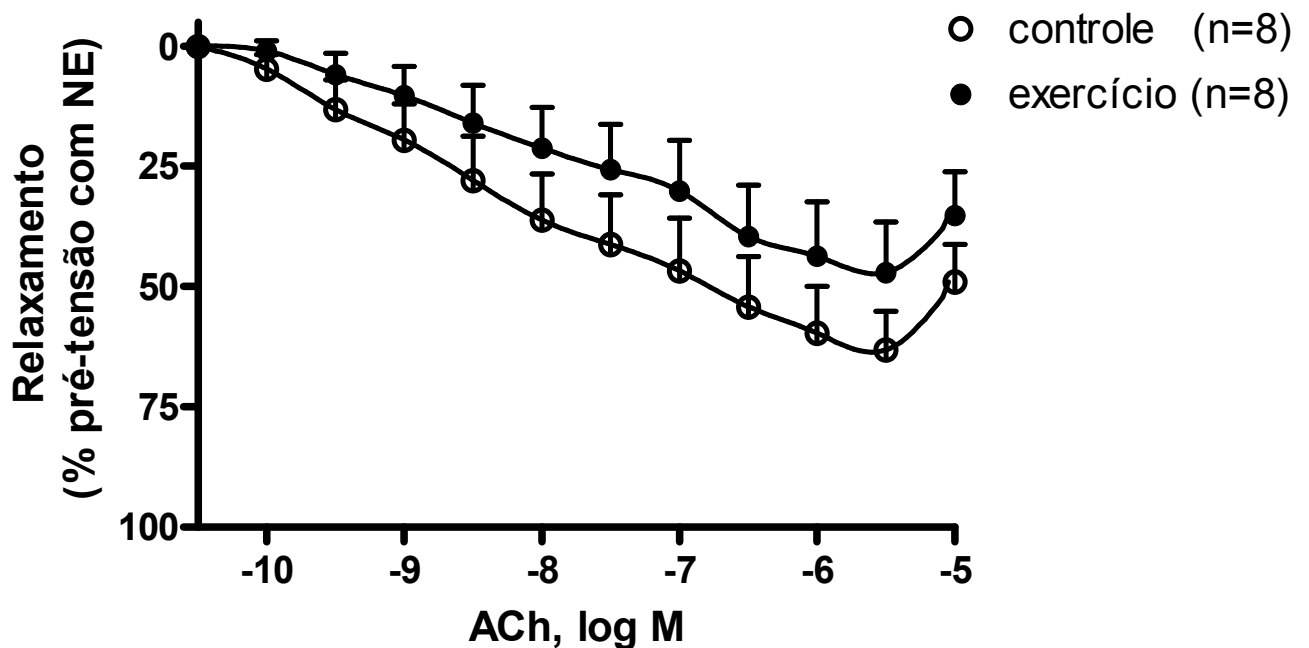


FIGURA 8 – Curva concentração-efeito à acetilcolina nos anéis aórticos dos grupos controle e exercício pré-incubados com L-NAME (10^{-4} M). O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses.

5.2 Nitrato e Nitrito

Uma vez que os animais do grupo EX apresentaram um aumento na vasodilatação dependente do endotélio, foi investigado se a realização de uma sessão de exercício estava associada a uma maior produção dos derivados do NO. Como demonstrado na FIGURA 9, tanto o nitrato (A) como o nitrito (B) apresentaram maiores concentrações na aorta dos animais exercitados.

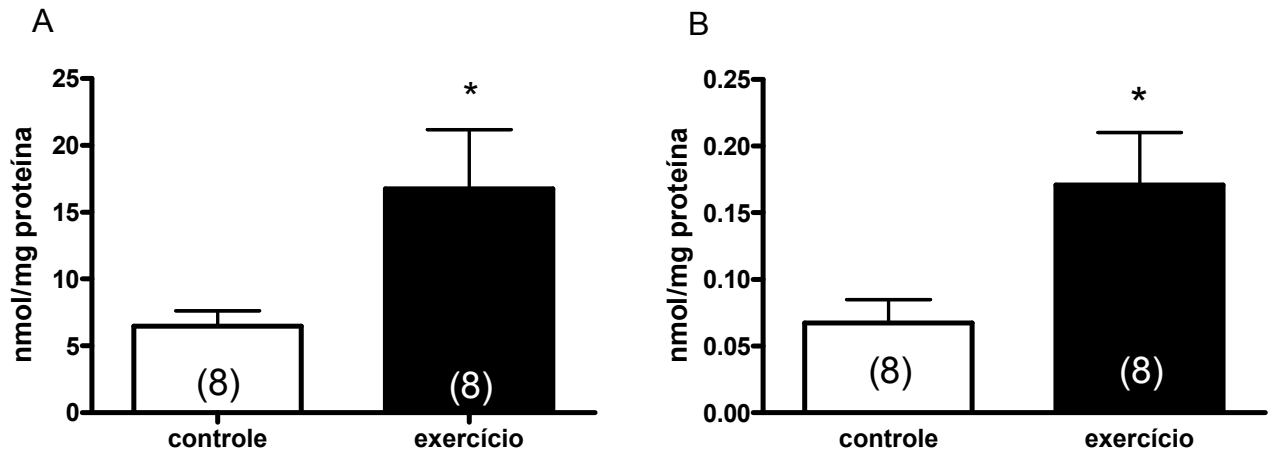


FIGURA 9 – Concentração de nitrato (A) e nitrito (B) nos homogenatos de anéis aórticos dos grupos controle e exercício. O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses. * $p < 0,05$ vs. controle.

5.3 Fosforilação da Akt e eNOS

A maior biodisponibilidade do NO pode ocorrer por uma produção aumentada ou por uma diminuição na sua inativação.

Analisando inicialmente a questão da produção, os ratos exercitados apresentaram uma ativação aumentada da eNOS, demonstrada pela maior fosforilação desta no resíduo Serina 1177 (FIGURA 10A). Além disso, a proteína Akt, uma intermediária na ativação da eNOS em função do estresse de cisalhamento, também apresentou maior fosforilação (FIGURA 10B) em seu sítio responsivo ao estresse de cisalhamento (Serina-473).

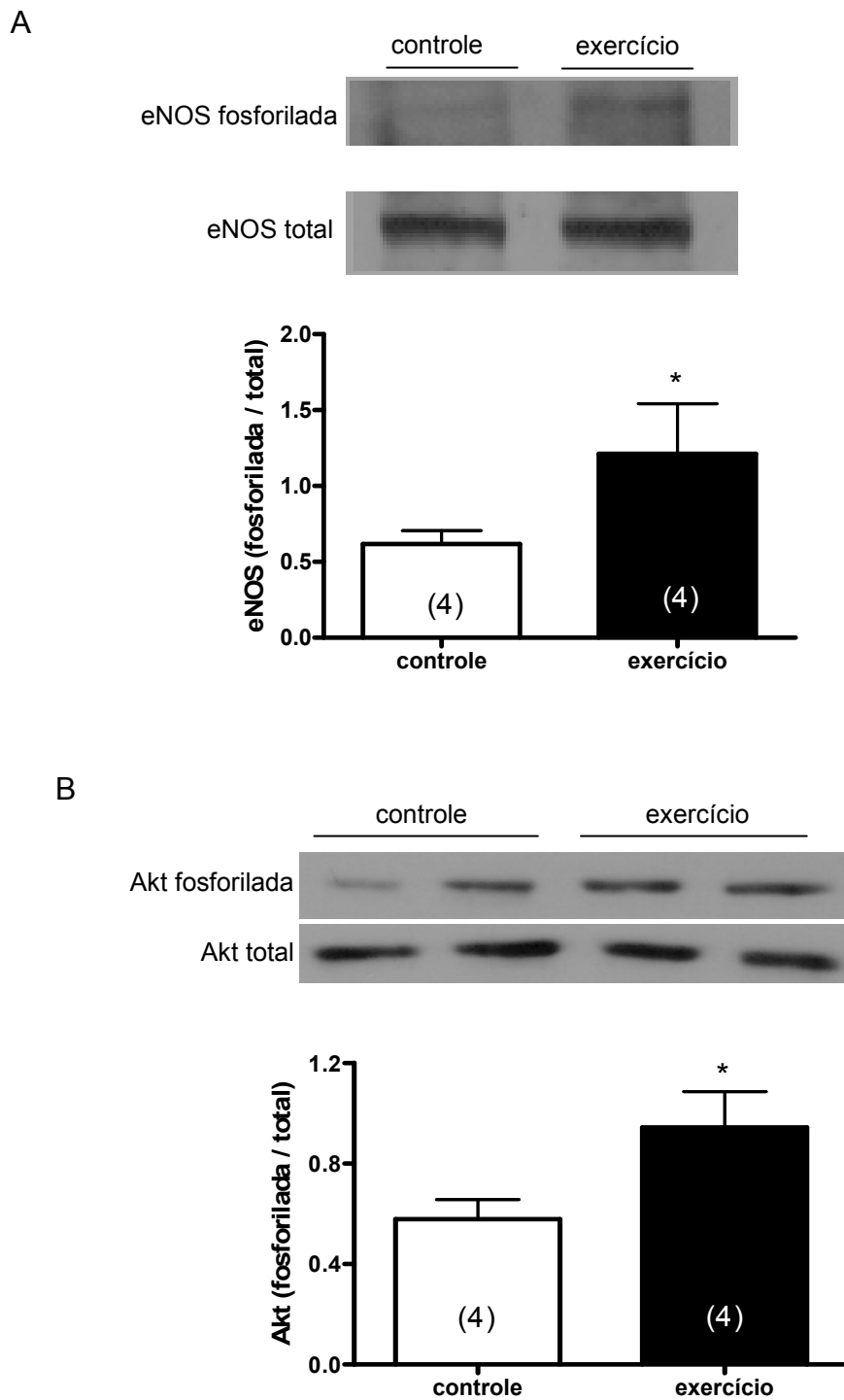


FIGURA 10 – Imunomarcção em homogenato aórtico dos grupos controle e exercício para o conteúdo total e fosforilado das proteínas eNOS (A) e Akt (B). O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses.
* p<0,05 vs. controle.

5.4 Produção de superóxido

A biodisponibilidade do superóxido foi aumentada nos vasos dos animais que realizaram o exercício físico, podendo ser observada tanto pelo método qualitativo (FIGURA 11A) como pelo quantitativo (FIGURA 11B).

A imagem representativa de uma amostra de cinco animais por grupo demonstra também a especificidade do método devido a redução da fluorescência nas lâminas incubadas com a SOD exógena.

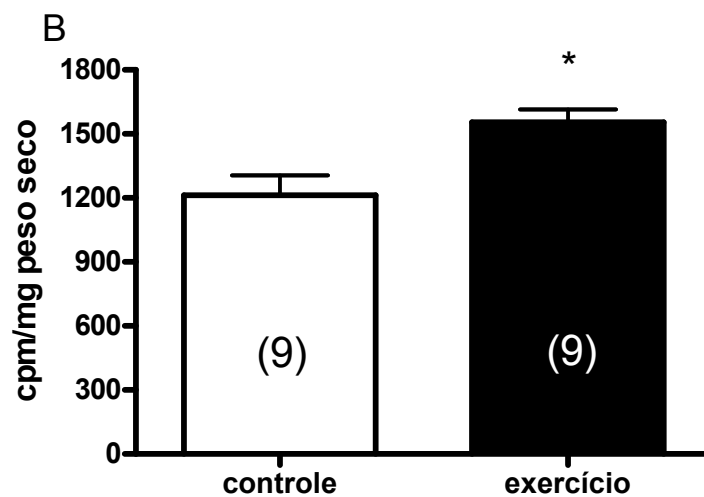
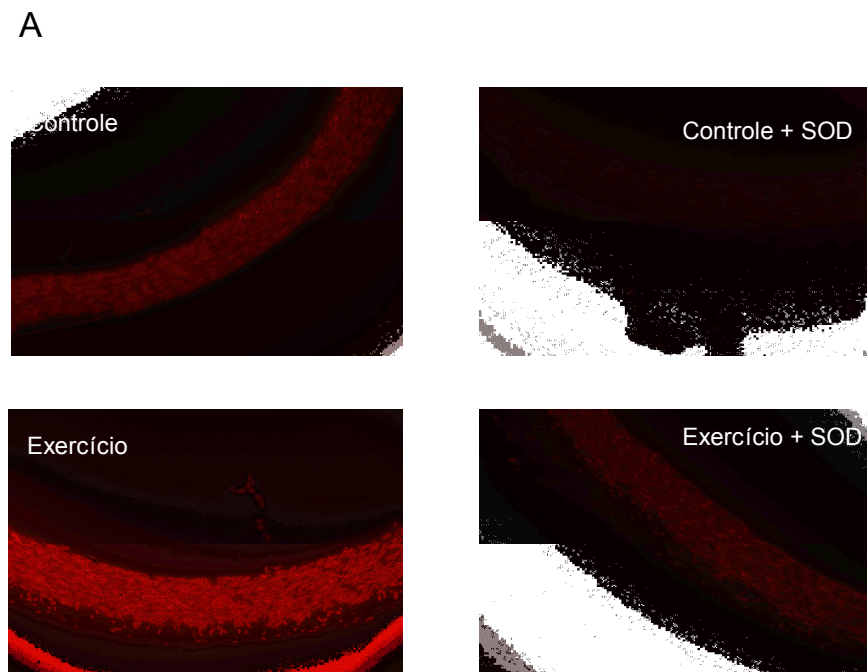


FIGURA 11 – (A) Foto representativa da marcação por superóxido pela oxidação da DHE nos cortes de anéis aórticos de um animal do grupo controle e exercício e dos mesmos na presença de peg-SOD. (B) Quantificação do superóxido pela quimiluminescência da lucigenina em animais do grupo controle e exercício. O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses. *p<0,05 vs. controle.

O aumento na produção de superóxido no grupo EX pode ter ocorrido devido à maior ativação do complexo enzimático NADP(H) oxidase uma vez que a incubação com o seu inibidor normalizou o sinal luminescente ao nível dos animais que permaneceram em repouso (FIGURA 12).

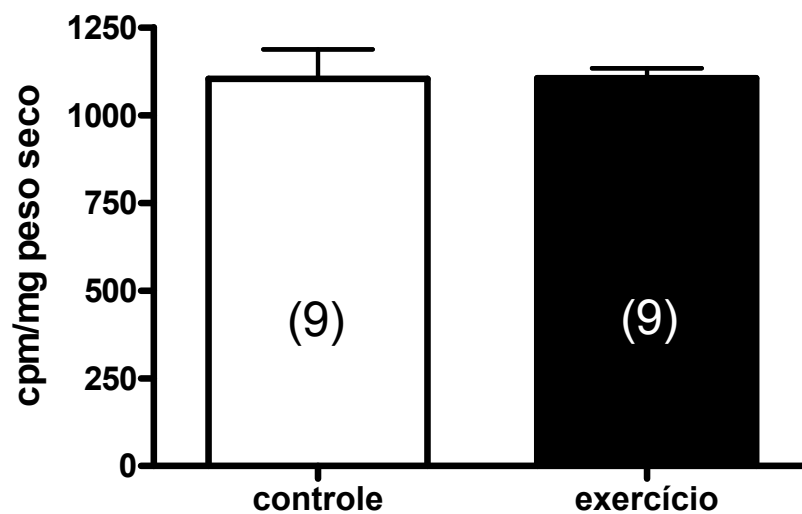


FIGURA 12- Quantificação do superóxido pela quimiluminescência da lucigenina em anéis de animais do grupo controle e exercício incubados com DPI (20 mM). O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses. *p<0,05 vs. controle.

Assim como esperado, a inibição da SOD nos anéis com DETC 1 mM aumentou de maneira importante os níveis de superóxido (FIGURA 13) tanto no grupo controle (sem DETC = 1212 ±93 vs. com DETC = 1592±80, p<0,05) como no grupo exercício (sem DETC = 1554 ±60 vs. com DETC = 2398 ±86, p<0,05), porém

este aumento foi mais exacerbado nos animais exercitados $56 \pm 9\%$ comparado aos animais que permaneceram em repouso $35 \pm 7\%$.

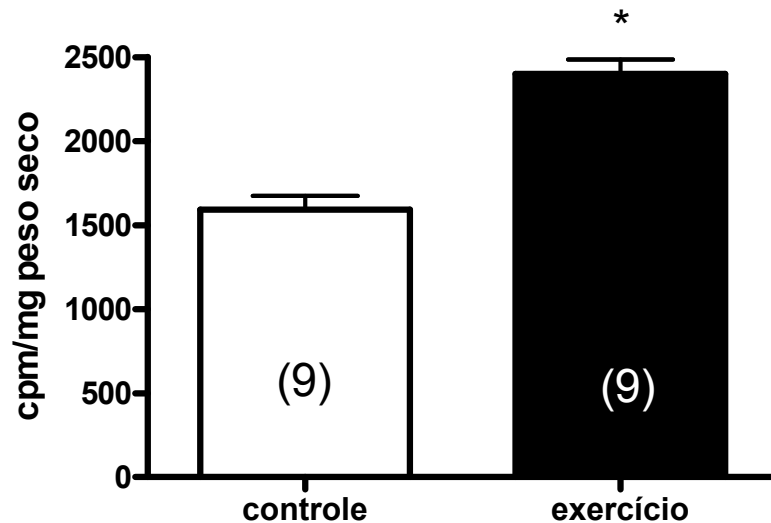


FIGURA 13- Quantificação do superóxido pela quimiluminescência da lucigenina em anéis de animais do grupo controle e exercício incubados com DETC (1 mM). O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses. *p<0,05 vs. controle.

5.5 Peróxido de hidrogênio

Além do superóxido, o peróxido de hidrogênio vascular também foi aumentado na aorta dos animais exercitados como demonstrado na (FIGURA 14).

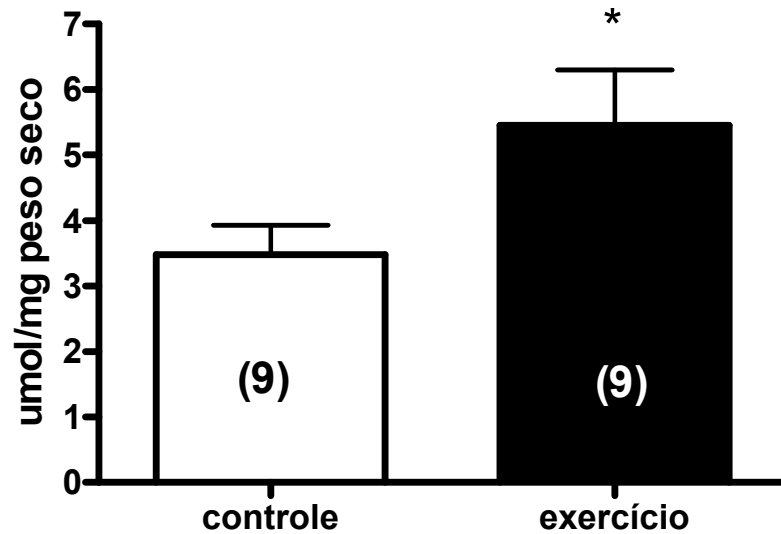


FIGURA 14- Quantificação do peróxido de hidrogênio em anéis de animais do grupo controle e exercício. O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses. *p<0,05 vs. controle.

5.6 Atividade total da superóxido dismutase

Apesar de observar uma maior participação no tamponamento do superóxido nos animais exercitados com a incubação com DETC (FIGURA 13), a análise da atividade da SOD no homogenato vascular não apresentou diferenças estatísticas (FIGURA 15), porém observa-se uma tendência de aumento no grupo EX (p=0,069).

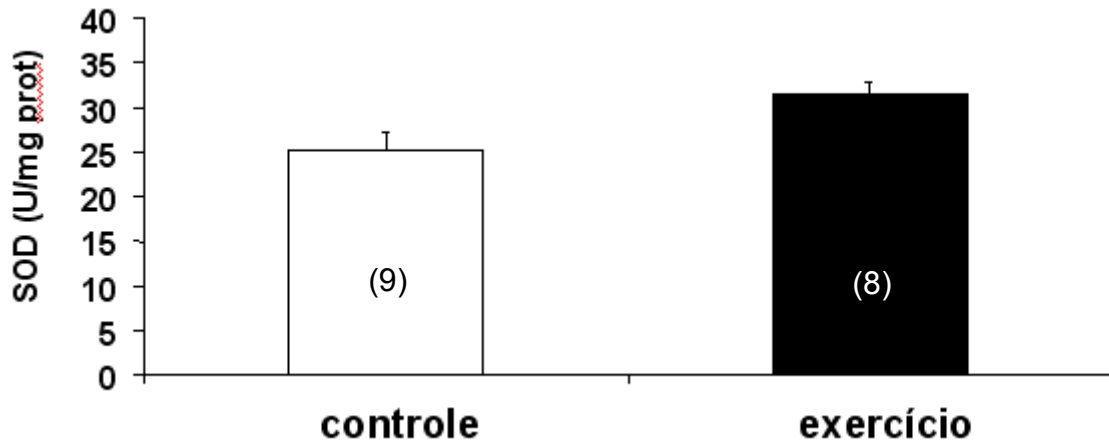


FIGURA 15 - Atividade total da enzima superóxido dismutase (SOD) em homogenatos de anéis aórticos dos grupos controle e exercício. O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses.

5.7 Hidroperoxidação lipídica

A maior produção de espécies reativas de oxigênio no grupo EX poderia estar associada a um aumento nos marcadores de estresse oxidativo, porém isso não foi evidenciado quando analisada a peroxidação lipídica vascular (figura 16).

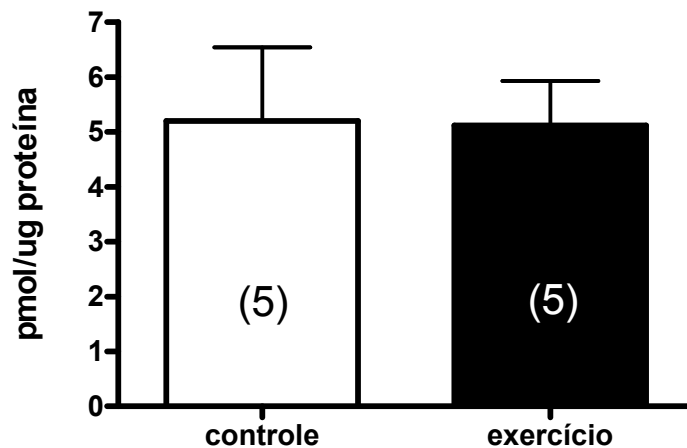


FIGURA 16- Quantificação de hidroperóxidos lipídicos em homogenato vascular de animais do grupo controle e exercício. O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses.

5.8 Razão glutaciona reduzida e glutaciona oxidada

Outro importante marcador de estresse oxidativo é a relação entre a glutaciona reduzida e oxidada, que também não foi diferente entre os grupos (figura 17).

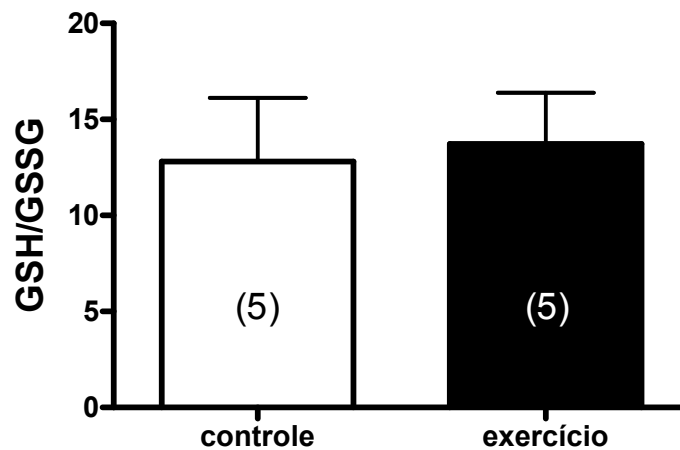


FIGURA 17- Razão entre glutaciona reduzida (GSH) e glutaciona oxidada (GSSG) em homogenato vascular de animais do grupo controle e exercício. O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo é o primeiro a analisar o efeito de uma única sessão de exercício físico aeróbico na função vasodilatadora endotelial estudando de maneira detalhada os diferentes mecanismos que controlam a biodisponibilidade do NO, em aorta de ratos.

Os resultados obtidos são importantes para a construção do conhecimento dos ajustes agudos do exercício físico no sistema vasomotor, bem como para o entendimento de alguns processos bioquímicos envolvidos em respostas fisiológicas.

Embora pareça trivial, a homogeneidade da amostra estudada é um fator de fundamental importância para garantir que os efeitos observados tenham ocorrido

em função da sessão de exercício empregada. Estudos têm demonstrado que tanto a idade (SCHRAGE, EISENACH, & JOYNER, 2007) como a capacidade de física (KASIKCIOGLU, OFLAZ, KASIKCLOGU, KAYSERILIOGLU, UMMAN & MERIC, 2005) são fatores que influenciam a função endotelial. Evidências como estas, justificam o fato da divisão em grupos em que tanto o peso, que é relativamente proporcional à idade do rato, como o desempenho no teste máximo não sejam diferentes entre os grupos.

O estudo foi inicialmente motivado pelas controvérsias a respeito das alterações na regulação do relaxamento arterial dependente endotélio. Enquanto JEN et al. (2002) e GOTO et al. (2007) observaram um efeito positivo na função endotelial após uma sessão de exercícios aeróbicos, DELP & LAUGHLIN (1997) não observaram nenhuma alteração, ao passo que HARAM et al. (2006) evidenciaram até mesmo uma redução na vasodilatação à acetilcolina.

Essas diferenças podem ter ocorrido por inúmeras discrepâncias metodológicas existentes entre os estudos citados como o protocolo de exercício utilizado, a espécie estudada, o leito vascular analisado, etc.

Ao comparar os estudos que utilizaram a mesma espécie e o mesmo leito arterial do presente estudo, pode-se destacar que a intensidade e duração do exercício agudo podem ter sido o grande diferencial nos resultados obtidos. Uma vez que o estudo de HARAM et al. (2006), que observou uma redução na sensibilidade e no efeito máximo à ACh após o exercício, submeteu os ratos a um protocolo de exercício intervalado, com os animais se exercitando por uma hora sendo 4 minutos a 80-89% do consumo máximo de oxigênio e 2 minutos a 65-70% do consumo máximo. Já o estudo de DELP & LAUGHLIN (1997), utilizou uma carga absoluta de exercício (uma hora com intensidade de 30 m /min e inclinação da esteira de 15%) podendo variar a intensidade relativa e, possivelmente, refletir na não alteração na reatividade vascular observada. Ao passo que o estudo que observou uma melhora no relaxamento (CHENG et al., 2002), apesar de ter utilizado também um exercício extenuante (protocolo incremental até a exaustão) o término da sessão aguda variou conforme a capacidade de cada animal.

Optamos por utilizar uma intensidade de exercício (55-60% da velocidade máxima individual) que encontra-se dentro da zona de treinamento físico utilizada

para fins terapêuticos (THOMPSON et al., 2003). A escolha da intensidade, além de se basear nos estudos supracitados, também levou em consideração que se tratavam de ratos sedentários.

Já a opção por adotar como objeto de estudo a porção torácica da aorta, foi devido ao fato de este ser primeiro grande vaso de condutância a sentir os efeitos do aumento do débito cardíaco durante o exercício e, conseqüentemente, sofrer um aumento importante do estresse de cisalhamento. Além disso, a análise de um grande vaso também possibilitou a realização de uma abordagem mecanística mais aprofundada.

A partir dos resultados obtidos, pode-se dizer com maior segurança que o efeito positivo do exercício físico na função endotelial é ocasionado por uma ativação sustentada da eNOS, uma vez que a inibição desta enzima aboliu a diferença na vasodilatação entre os grupos. Além disso, as concentrações aumentadas de nitrato e nitrito bem como a maior imunomarcagem das proteínas eNOS e Akt em resíduos que foram descritos por serem ativados pelo estresse de cisalhamento, dão um suporte adicional à dependência da eNOS no aumento diferencial na vasodilatação à acetilcolina observada no grupo exercitado.

A menor responsividade ao nitroprussiato de sódio nos animais exercitados, que inicialmente não era esperada, também é outro fator que corrobora com a maior produção endógena de NO pelas células endoteliais. Uma vez que já se demonstrou que vasos com uma produção interna aumentada de NO possuem uma menor sensibilidade à doadores exógenos de NO (MARTENS & KOJDA, 2001).

Outra importante contribuição do presente estudo é a de que o exercício físico agudo também aumenta a produção vascular de superóxido. Além disso, essa maior produção ocorre em função de um aumento na ativação do complexo enzimático NADP(H) oxidase, uma vez que a sua inibição restaurou os níveis de superóxido igualando ao de animais que permaneceram em repouso.

DUERSCHIMIDT et al. (2006) demonstraram que o estresse de cisalhamento em cultura de células endoteliais, além de ocasionar um aumento na síntese de NO, também ativa a produção de superóxido via NADP(H) oxidase. Possivelmente, este efeito paradoxal poderia ser um mecanismo protetor a fim de

evitar um aumento excessivo na vasodilatação, porém essa é uma hipótese ainda não confirmada e que merece mais estudos.

A atividade total da enzima superóxido dismutase também foi aumentada, ao analisar anéis frescos de animais exercitados quando incubados com DETC. Apesar de não apresentar diferenças estatísticas na mensuração da atividade da SOD no homogenato vascular, cabe destacar que o aumento observado de 29% na atividade da SOD após o exercício pode ter efeito fisiológico importante no controle da ação excessiva do superóxido, garantindo assim, a biodisponibilidade aumentada de NO.

Além de auxiliar na manutenção do óxido nítrico por seqüestrar o superóxido, a atividade da SOD aumentada também pode ter contribuído para o aumento de 59% na produção do peróxido de hidrogênio vascular no grupo exercitado, uma vez que essa espécie reativa de oxigênio é o produto da dismutação de duas moléculas de superóxido. Esse efeito também pode ter contribuído para a maior ativação da síntese de óxido nítrico, uma vez que THOMAS et al. (2002) demonstraram um aumento na fosforilação da eNOS ao tratar células endoteliais com peróxido de hidrogênio.

Além disso, o aumento do peróxido de hidrogênio vascular em função do exercício físico, reforça a idéia de alterações mediadas por reações redox para ocasionar os ajustes crônicos do treinamento físico, como a maior expressão da eNOS (LAUER et al., 2005).

O conceito de oxidantes como moléculas sinalizadoras têm se tornado cada vez mais popular, e o presente estudo fornece uma evidência adicional para o sistema de sinalização redox como algo relativamente controlado (TERADA, 2006), uma vez que nem a peroxidação lipídica (importante índice de lesão oxidativa), nem a razão entre a glutathiona reduzida e glutathiona oxidada foram alteradas após a realização do exercício. Efeitos que podem ter sido garantidos pelo complexo sistema de defesa antioxidante, que, apesar de não ser capaz de impedir a produção de espécies oxidantes, consegue suprimir os efeitos deletérios da produção excessiva destes.

As contribuições do presente estudo somadas às evidências da literatura permitem a realização do seguinte esquema:

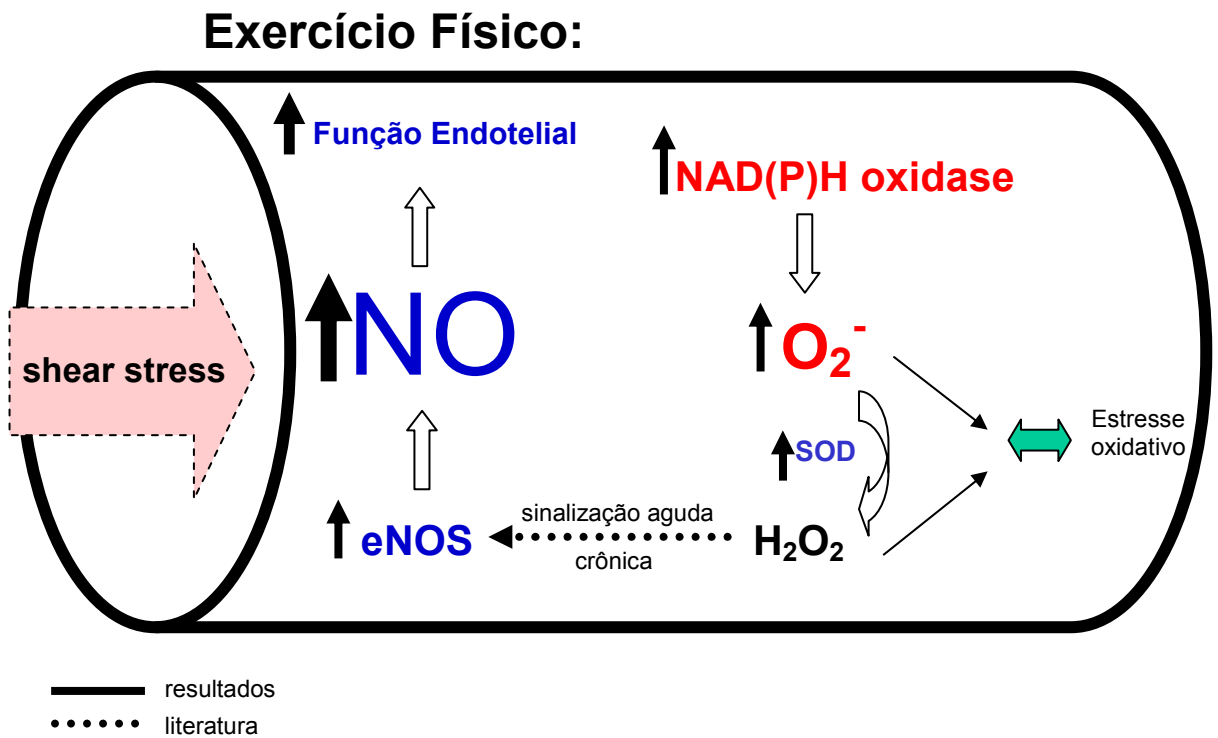


FIGURA 18 – Sumário esquemático dos resultados representando o efeito do exercício físico no controle da biodisponibilidade do NO. As indicações assinaladas com setas contínuas (—) são observações provenientes do presente estudo e as indicações com setas tracejadas (- - -) são resultados provenientes da literatura e são discutidos acima.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que o exercício físico aeróbico melhora a função vasomotora dependente do endotélio em aorta de ratos

normais e que esse efeito é garantido por um aumento na biodisponibilidade do óxido nítrico vascular. Por sua vez, a maior biodisponibilidade de NO ocorre devido a sua síntese aumentada pela eNOS e é auxiliada pela maior ativação da SOD uma vez que a produção de superóxido também é aumentada em função da ativação da NADP(H) oxidase.

O exercício físico também aumenta a formação do peróxido de hidrogênio nos vasos e apesar da maior produção de espécies reativas de oxigênio, a realização do esforço moderado (55-60% capacidade máxima) não está associada a uma situação de estresse oxidativo vascular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, V.; LINKE, A.; KRANKEL, N.; ERBS, S.; GIELEN, S.; MOBIUS-WINKLER, S.; GUMMERT, J.F; MOHR, FW.; SCHULER, G.; HAMBRECHT, R. Impact of regular physical activity on the NAD(P)H oxidase and angiotensin receptor system in patients with coronary artery disease. Circulation, v. 111, p. 555-62, 2005.

ANDREWS, K.L.; TRIGGLE, C.R.; ELLIS, A. NO and the vasculature: where does it come from and what does it do? Heart Failure Review, v. 7, n. 4, p. 423-45, 2002.

BEJMA, J.; JI, L.L. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. Journal of Applied Physiology, v. 87, p. 465-70, 1999.

BEJMA, J.; RAMIRES, P.; JI, L.L. Free radical generation and oxidative stress with ageing and exercise: differential effects in the myocardium and liver. Acta Physiologica Scandinavica, v. 169, p. 343-51, 2000.

BONOW RO, SMAHA LA, SMITH SC JR, MENSAH GA, LENFANT C. World Heart Day 2002: the international burden of cardiovascular disease: responding to the emerging global epidemic. Circulation. v. 106, p. 1602-5, 2002.

BOO, Y.C.; JO, H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol.*, v. 285: p. C499-508, 2003.

BOO, Y.C.; SORESCU, G.; BOYD, N.; SHIOJIMA, I.; WALSH, K.; DU, J.; JO, H. *Shear stress* stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A. *Journal of Biological Chemistry*, v.277, p.3388-96, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. v. 72, p. 248-54, 1976.

BRANDÃO RONDON, M.U.; ALVES, M.J.; BRAGA, A.M.; TEIXEIRA, O.T.; BARRETTO, A.C., KRIEGER; E.M.; NEGRÃO, C.E. Postexercise blood pressure reduction in elderly hypertensive patients. *Journal of American College Cardiology*, v. 39, n. 4, p. 676-682, 2002.

CAI, H.; DAVIS, M.E.; DRUMMOND, G.R.; HARRISON, D.G. Induction of endothelial NO synthase by hydrogen peroxide via a Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II/janus kinase 2-dependent pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 21, p. 1571-6, 2001.

CAI, H.; GRIENGLING, K.K.; HARRISON, D.G. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacology Science*, v. 24, p. 471-8, 2003.

CAI, H.; HARRISON, D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation Research*, v.87, p.840-44, 2000.

CHENG, L.; YANG, C.; HSU, L.; LIN, M.T.; JEN, C.J.; CHEN, H. Acute exercise enhances receptor-mediated endothelium-dependent vasodilation by receptor upregulation. *Journal of Biomedical Science*, v. 6, p. 22-7, 1999.

CHENG, C.P.; HERFKENS, R.J.; TAYLOR, C.A. Abdominal aortic hemodynamic conditions in healthy subjects aged 50-70 at rest and during lower limb exercise: in vivo quantification using MRI. Atherosclerosis, v.168, p.323-31, 2003.

CHEVION, S.; MORAN, D.S.; HELED, Y.; SHANI, Y.; REGEV, G.; ABBOU, B.; BERENSHTEIN, E.; STADTMAN, E.R.; EPSTEIN, Y. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 100, p. 5119-23, 2003.

CLARKSON, P.; MONTGOMERY, H.E.; MULLEN, M.J.; DONALD, A.E.; POWE A.J.; BULL, T.; JUBB, M.; WORLD, M.; DEANFIELD, J.E. Exercise training enhances endothelial function in young men. Journal of American College Cardiology, v. 33, p. 1379-85, 1999.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, v.72, p.248-54, 1976.

COOKE, J.P. Flow, NO, and atherogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 100, n. 3, p. 768-770, 2003.

DAVIS, M.E.; CAI, H.; DRUMMOND, G.R.; HARRISON, D.G. Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways. Circulation Research, v. 89, p. 1073-80, 2001.

DAVIS, M.E.; CAI, H.; MCCANN, L.; FUKAI, T.; HARRISON, D.G. Role of c-Src in regulation of endothelial nitric oxide synthase expression during exercise training. American Journal of Physiology Heart Circulatory Physiology, v. 284, p. H1449-53, 2003.

DEANFIELD, J.E.; HALCOX, J.P.; RABELINK, T.J. Endothelial function and

dysfunction: testing and clinical relevance. Circulation, v. 115, n. 10, p. 1285-95, 2007.

DELP, M.D.; LAUGHLIN, M.H. Time course of enhanced endothelium-mediated dilation in aorta of trained rats. Medicine & Science in Sports & Exercise, v.29. p.1454-61, 1997.

DRUMMOND, G.R.; CAI, H.; DAVIS, M.E.; RAMASAMY, S.; HARRISON, D.G. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. Circulation Research, v. 86, p. 347-54, 2000.

DUERRSCHMIDT, N.; STIELOW, C.; MULLER, G.; PAGANO, P.J.; MORAWIETZ, H. NO-mediated regulation of NAD(P)H oxidase by laminar shear stress in human endothelial cells. Journal of Physiology, v. 576, p. 557-67, 2006.

FISHER, A.B.; CHIEN, S.; BARAKAT, A.I.; NEREM, R.M. Endothelial cellular response to altered shear stress. American Journal of Physiology Lung Cellular Molecular Physiology, v. 281, p. L529-533, 2001.

FLEMING, I.; SCHULZ, C.; FICHTLSCHERER, B.; KEMP, B.E.; FISSLTHALER, B.; BUSSE, R. AMP-activated protein kinase (AMPK) regulates the insulin-induced activation of the nitric oxide synthase in human platelets. Journal of Thrombosis and Haemostasis, v. 90, n. 5, p. 863-871, 2003.

FUKAI, T.; SIEGFRIED, M.R.; FUKAI, U.M.; CHENG, Y.; KOJDA, G.; HARRISON, D.G. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. Journal of Clinical Investigation, v.105, p.1631-39, 2000.

FURCHGOTT, R.F.; CHERRY, P.D.; ZAWADZKI, J.V.; JOTHIANANDAN, D. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. Journal of Cardiovascular Pharmacology, v. 6, p. S336-43, 1984.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADSKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature, v.288, p.373-6, 1980.

GALLEY, H.F.; WEBSTER, N.R. Physiology of the endothelium. British journal of anaesthesia, v.93, p.105-13, 2004.

GEWALTIG, M.T.; KOJDA, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. Cardiovascular Research, v.55, p.250-60, 2002.

GIANNOTTI, G.; LANDMESSER, U. Endothelial dysfunction as an early sign of atherosclerosis. Herz, v. 32, n. 7, p. 568-572, 2007.

GONZALES, R.J.; CARTER, R.W.; KANAGY, N.L. Laboratory demonstration of vascular smooth muscle function using rat aortic ring segments. Advanced in Physiology Education, v. 24, n. 1, p. 13-21, 2000.

GRAHAM, D.A.; RUSH, J.W. Exercise training improves aortic endothelium-dependent vasorelaxation and determinants of nitric oxide bioavailability in spontaneously hypertensive rats. Journal of Applied Physiology, v. 96, p. 2088-96, 2004.

GRATTON, J.P.; BERNATCHEZ, P.; SESSA, W.C. Caveolae and caveolins in the cardiovascular system. Circulation Research, v. 94, n. 11, p. 1408-17, 2004.

HAMBRECHT, R.; ADAMS, V.; ERBS, S.; LINKE, A.; KRANKEL, N.; SHU, Y.; BAITHER, Y. GIELEN, S.; THIELE, H.; GUMMERT, J.F.; MOHR, F.W.; SCHULER, G. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. Circulation Research. v.107, p.3152-58, 2003.

HARAM, P.M.; ADAMS, V.; KEMI, O.J.; BRUBAKK, A.O.; HAMBRECHT, R. ELLINGSEN, O.; WISLOFF, U. Time-course of endothelial adaptation following acute and regular exercise. European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation, v. 13, n. 4, p. 585-591, 2006.

HARRISON, D.G. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. The Journal of Clinical Investigation, v.100, p.2153-7, 1997.

HOWARD, M.G.; DICARLO, S.E. Reduced vascular responsiveness after a single bout of dynamic exercise in the conscious rabbit. Journal of Applied Physiology, v. 73, p. 2662-7, 1992.

HU, Q.; CORDA, S.; ZWEIER, J.L.; CAPOGROSSI, M.C.; ZIEGELSTEIN, R.C. Hydrogen peroxide induces intracellular calcium oscillations in human aortic endothelial cells. Circulation, v. 97, p. 268-75, 1998.

HUMPHRIES, K.M.; PENNYPACKER, J.K.; TAYLOR, S.S. Redox regulation of cAMP-dependent protein kinase signaling: kinase versus phosphatase inactivation. Journal of Biological Chemical, v. 282, n. 30, p. 22072-9, 2007.

INOUE, N.; RAMASAMY, S.; FUKAI, T.; NEREM, R.M.; HARRISON, D.G. *Shear stress* modulates expression of Cu/Zn superoxide dismutase in human aortic endothelial cells. Circulation Research, v.79, p.32-37, 1996.

IZAWA, T.; MORIKAWA, M.; INOUE, M.; MIZUTA, T.; YAMASHITA, H.; OHNO, H.; KOMABAYASHI, T. Acute or chronic exercise alters angiotensin II-induced contraction of rat aorta. The Japanese Journal of Physiology, v.45, p.1093-100, 1995.

JANISZEWSKI, M.; SOUZA, H.P.; LIU, X.; PEDRO, M.A.; ZWEIER, J.L.; LAURINDO, F.R. Overestimation of NADH-driven vascular oxidase activity due to lucigenin artifacts. Free Radicals in Biology and Medicine, v.32, p.446-453, 2002.

JEN, C.J.; CHAN, H.P.; CHEN, H.I. Acute exercise enhances vasorelaxation by modulating endothelial calcium signaling in rat aortas. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology, v.282, p.H977-82, 2002.

JOHNSON, L.R.; RUSH, J.W.; TURK, J.R.; PRICE, E.M.; LAUGHLIN, M.H. Short-term exercise training increases ACh-induced relaxation and eNOS protein in porcine pulmonary arteries. Journal of Applied Physiology, v.90, p.1102-10, 2001.

JUNG, O.; MARKLUND, S.L.; GEIGER, H.; PEDRAZZINI, T.; BUSSE, R. BRANDES, R.P. Extracellular superoxide dismutase is a major determinant of nitric oxide bioavailability: in vivo and ex vivo evidence from ecSOD-deficient mice. Circulation Research, v. 93, p. 622-629, 2003.

KASIKCIOGLU, E.; OFLAZ, H.; KASIKCIOGLU, H.A.; KAYSERILIOGLU, A.; UMMAN, S.; MERIC, M. Endothelial flow-mediated dilatation and exercise capacity in highly trained endurance athletes. Tohoku Journal of Experimental Medicine, v.205, n.1, p.45-51, 2005.

KOBAYASHI, N.; TSURUYA, Y.; IWASAWA, T.; IKEDA, N.; HASHIMOTO, S.; YASU, T.; UEBA, H.; KUBO, N.; FUJII, M.; KAWAKAMI, M.; SAITO, M. Exercise training in patients with chronic heart failure improves endothelial function predominantly in the trained extremities. Circulation Journal, v.67, p.505-10, 2003.

KOJDA, G.; HAMBRECHT, R. Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? Cardiovascular Research, v. 67, n. 2, p.187-197, 2005.

KOJDA, G.; HARRISON, D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. Cardiovascular Research, v.43, n.3, p.562-71, 1999.

LANDMESSER, U.; HORNIG, B.; DREXLER, H. Endothelial function: a critical

determinant in atherosclerosis? Circulation, v. 109, n. 21, p. 1127-33, 2003.

LAUER, N.; SUVORAVA, T.; RUTHER, U.; JACOB, R.; MEYER, W.; HARRISON, D.G.; KOJDA, G. Critical involvement of hydrogen peroxide in exercise-induced up-regulation of endothelial NO synthase. Cardiovascular Research, v. 65, p. 254-62, 2005.

LAUGHLIN, M.H. Joseph B. Wolfe memorial lecture. Physical activity in prevention and treatment of coronary disease: the battle line is in exercise vascular cell biology. Medicine & Science in Sports & Exercise, v.36, p.352-62, 2004.

LAURINDO, F.R.M.; de SOUZA, H.P.; da LUZ, P.L. Estresse oxidativo: um denominador comum de condições vasculares patológicas. Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, v. 2, p. 344-355, 1998.

LEITE, P.F.; DANILOVIC, A.; MORIEL P.; DANTAS K.; MARKLUND, S.; DANTAS, A.P.V.; LAURINDO, R.M. Sustained decrease in superoxide dismutase activity underlies constrictive remodeling after balloon injury in rabbits. Arteriosclerosis and Thrombosis in Vascular Biology, v.23, p.2197-2202, 2003.

LIU, J.; YEO, H.C.; OVERVIK-DOUKI, E.; HAGEN, T.; DONIGER, S.J.; CHYU, D.W.; BROOKS, G.A.; AMES, B.N. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. Journal of Applied Physiology, v. 89, p. 21-28, 2000.

LUNDBERG JO, WEITZBERG E, GLADWIN MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. Nature Reviews Drug Discovery, v. 7, n. 2, p. 156-167, 2008.

MARLETTA, M.A.; SPIERING, M.M. Trace elements and nitric oxide function. Journal of Nutrition, v. 133, n. 5, p. 1431S-3S, 2003.

MARTENS, D.; KOJDA, G. Impaired vasodilator response to organic nitrates in isolated basilar arteries. British Journal of Pharmacology, v. 132, n. 1, p. 30-36, 2001.

MCCABE, T.J.; FULTON, D.; ROMAN, L.J.; SESSA, W.C. Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation. Journal of Biological Chemical, v. 275, p. 6123-8, 2000.

McALLISTER, R.M.; JASPERSE, J.L.; LAUGHLIN, M.H. Nonuniform effects of endurance exercise training on vasodilation in rat skeletal muscle. Journal of Applied Physiology, v.98, p.753-61, 2005.

MCCORD, J.M. The evolution of free radicals and oxidative stress. American Journal of Medicine, v. 108, p. 652-9, 2000.

MICHEL, T.; FERON, O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? Journal of Clinical Investigation, v. 100, n. 9, p. 2146-52, 1997.

MILLER, F.J.; GUTTERMAN, D.D.; RIOS, C.D.; HEISTAD, D.D.; DAVIDSON, B.L. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. Circulation Research, v.82, p.1298-305, 1998.

MINAMI, A.; ISHIMURA, N.; HARADA, N.; SAKAMOTO, S.; NIWA, Y.; NAKAYA, Y. Exercise training improves acetylcholine-induced endothelium-dependent hyperpolarization in type 2 diabetic rats, Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. Atherosclerosis, v.162, p.85-92, 2002.

MOMBOULI, J.V.; VANHOUTTE, P.M. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. Journal of Molecular Cellular Cardiology, v. 31, n.1, p. 61-74, 1999.

MONCADA, S.; HIGGS, E.A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. British Journal of Pharmacology, v. 147, n.1, p. S193-201, 2006.

MYERS, J.; PRAKASH, M.; FROELICHER, V.; DO, D.; PARTINGTON, S.; ATWOOD, J.E. Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. New England Journal Medicine, v. 346, n.11, p.793-801, 2002.

MYERS, J. Exercise and cardiovascular health. Circulation, v.107, p.e2-e5, 2003.

NASCIMENTO, C.A.; PATRIARCA, G.; HEIMANN, J.C. Estrutura orgânica do endotélio vascular. In: Endotélio e doenças cardiovasculares. Da LUZ, P.L.; LAURINDO, F.R.M.; CHAGAS, A.C.P. São Paulo: Atheneu, 2003.

NIEBAUER, J.; COOKE, J.P. Cardiovascular effects of exercise: role of endothelial shear stress. Journal of the American College of Cardiology, v. 28: p. 1652-60, 1996.

NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SARMADI, J.; WOLFF, S.P. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. Analytical Biochemical., v. 220: p. 403-9, 1994.

PALMER, R.M.; FERRIGE, A.G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature, v. 327, p. 524-6, 1987

POLYTARCHOU, C.; PAPADIMITRIOU, E. Antioxidants inhibit human endothelial cell functions through down-regulation of endothelial nitric oxide synthase activity. European Journal of Pharmacology, v.510, p.31-8, 2005.

POOLE-WILSON, P.A. Cardiovascular health in Europe: a global problem. Journal of the American College of Cardiology, v. 49, n. 1, p. 117-119, 2007.

PRAKASH, M.; MYERS, J.; FROELICHER, VF.; MARCUS, R.; DO, D.; KALISETTI, D.; FRONING, J.; ATWOOD, J.E. Diagnostic exercise tests on 4000 consecutive

men. American Heart Journal, v. 142, n. 1, p.127-35, 2001.

REN, J. Influence of gender on oxidative stress, lipid peroxidation, protein damage and apoptosis in hearts and brains from spontaneously hypertensive rats. Clinical and Experimental Pharmacology Physiology, v. 34, n. 5-6, p. 432-438, 2007.

ROUSSEAU, D.L.; LI, D.; COUTURE, M.; YEH, S.R. Ligand-protein interactions in nitric oxide synthase. Journal of Inorganic Biochemistry., v. 99, n.1, p. 306-23, 2005.

RUSH, J.W.; TURK, J.R.; LAUGHLIN, M.H. Exercise training regulates SOD-1 and oxidative stress in porcine aortic endothelium. American Journal of Physiology, v.284, p.H1378-87, 2003.

SCHRAGE, W.G.; EISENACH J.H.; JOYNER, M.J. Ageing reduces nitric-oxide- and prostaglandin-mediated vasodilatation in exercising humans. The Journal of Physiology, v.579, p.227-36. 2007.

SHEPHARD, R.J.; BALADY, G.J. Exercise as cardiovascular therapy. Circulation, v. 99, n.7, p. 963-72, 1999.

SILVA, G.J.; BRUM, P.C.; NEGRÃO, C.E.; KRIEGER, E.M. Acute and chronic effects of exercise on baroreflexes in spontaneously hypertensive rats. Hypertension, v. 30, n. 3, p. 714-719, 1997.

SPIER S.A.; LAUGHLIN M.H.; DELP M.D. Effects of acute and chronic exercise on vasoconstrictor responsiveness of rat abdominal aorta. Journal of Applied Physiology. v.87, p.1752-7, 1999.

SUVORAVA, T.; LAUER, N.; KOJDA, G. Physical inactivity causes endothelial dysfunction in healthy young mice. Journal of the American College of Cardiology, v.44, p.1320-7, 2004.

TANIYAMA, Y.; GRIENGLING, K.K. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. Hypertension, v. 42, p. 1075-81, 2003.

TARPEY, M.M.; FRIDOVICH, I. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. Circulation Research, v. 89, p. 224-36, 2001.

TERADA, L.S. Specificity in reactive oxidant signaling: think globally, act locally. Journal of Cellular Biology, v. 174, n. 5, p. 615-623, 2006.

THOMAS, SR.; CHEN, K.; KEANEY, J.F. Jr. Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. Journal of Biological Chemical, v. 277, p. 6017-24, 2002.

THOMPSON, P.D.; BUCHNER, D.; PINA, I.L.; BALADY, G.J.; WILLIAMS, M.A.; MARCUS, B.H.; BERRA, K.; BLAIR, S.N.; COSTA, F.; FRANKLIN, B.; FLETCHER, G.F.; GORDON, N.F.; PATE, R.R.; RODRIGUEZ, B.L.; YANCEY, A.K.; WENGER, N.K. AHA scientific statement. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from the council on clinical cardiology (subcommittee on exercise, rehabilitation, and prevention) and the council on nutrition, physical activity, and metabolism (subcommittee on physical activity). Circulation Research, v.107, p.3109-16, 2003.

TRIGGLE, C.R.; HOLLENBERG, M.; ANDERSON, T.J.; DING, H.; JIANG, Y.; CERONI, L. WIEHLER, W.B.; NG, E.S.; ELLIS, A.; ANDREWS, K.; MCGUIRE, J.J.; PANNIRSELVAM, M. The endothelium in health and disease: a target for therapeutic intervention. Journal of Smooth Muscle Research, v.39, p.249-67, 2003.

TUTEJA, N.; CHANDRA, M.; TUTEJA, R.; MISRA, M.K. Nitric Oxide as a Unique Bioactive Signaling Messenger in Physiology and Pathophysiology. Journal of Biomedical and Biotechnology, v. 2004, n. 4, p. 227-237, 2004.

URSO, M.L.; CLARKSON, P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. Toxicology, v. 189, p. 41-54, 2003.

WALSH, M.P.; KARGACIN, G.J.; KENDRICK-JONES, J.; LINCOLN, T.M. Intracellular mechanisms involved in the regulation of vascular smooth muscle tone. Canadian Journal Physiol Pharmacol, v. 73, n.5, p. 565-73, 1995.

YOUNG, C.G.; KNIGHT, C.A.; VICKERS, K.C.; WESTBROOK, D.; MADAMANCHI, N.R.; RUNGE, M.S.; ISCHIROPOULOS, H.; BALLINGER, S.W. Differential effects of exercise on aortic mitochondria. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology, v.288, p.H1683-9, 2005.

ZANCHI, N.E.; BECHARA, L.R.G.; TANAKA, L.Y.; DEBBAS, V. BARTHOLOMEU, T.; RAMIRES, P.R. Efeito do treinamento físico aeróbico sobre a bioatividade do óxido nítrico e a vasodilatação aórtica. Revista Brasileira de Educação Física e Esporte, v. 20, n.4, p. 239-247, 2006.