

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Shirley e Washington, pelo amor incondicional e por sempre me apoiar em tudo o que faço. Aos meus irmãos Gustavo e Renato, que apesar dos quilômetros distância sempre torcem por mim.

À minha namorada Letícia, por todo o carinho e compreensão, por dividir os momentos de alegria e por toda ajuda nos momentos difíceis.

À todos os meus familiares, tia Ká, vó, tios e tias, que fizeram parte de mais esta etapa da minha vida.

Ao meu amigo Luiz, por toda a força desde os tempos da graduação e por participar ativamente deste estudo: desde o projeto até o último dado.

Aos meus colegas do laboratório de Biologia Vascular, Angélica, Célio, Cris, Denise, Diana, D. Elídia, Estevão, João, Luciana, Leonora, Maria Bertoline, Marcel, Márcia, Marina, Nelo, Riberoa, Rita, Vítor e Viviane, por dividir o espaço, conhecimento e por toda a paciência.

Aos amigos Ângela, Laura, Marcus, Victor e Vanda pela amizade, bons momentos e por tudo o que vocês têm me ensinado.

À todo o pessoal do laboratório da EEFE, da Unidade Experimental e demais funcionários do InCor.

À professora Sandra Lia pelo auxílio indireto na escrita dessa dissertação.

Aos colegas do grupo do Paulo, Adriana, Camila, Guga e Teresa, por toda a ajuda.

Ao professor Francisco Laurindo por permitir que esse estudo fosse desenvolvido no laboratório e por todo o apoio científico.

Ao professor Paulo Ramires, pela orientação, paciência, pelo exemplo de pessoa, profissionalismo, professor, integridade e pela relação de amizade que tem comigo e com seu alunos.

À todos aqueles que participaram direta ou indiretamente na realização desta dissertação.

À Deus, por tudo e por me cercar de pessoas boas como estas acima citadas.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE QUADROS.....	vi
LISTA DE SIGLAS, ABREVIACOES E SÍMBOLOS.....	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 O endotélio vascular.....	2
2.2 O xido nítrico derivado do endotélio.....	4
2.3 Treinamento físico e função endotelial.....	7
2.4 Estresse de cisalhamento.....	9
2.5 Espécies Reativas de Oxignio.....	10
2.6 Efeito agudo do exercício na reatividade vascular.....	12
3 OBJETIVOS.....	14
3.1 Gerais.....	14
3.2 Específicos.....	14
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1 Amostra e manipulação dos animais.....	15
4.2 Teste de esforço máximo.....	15
4.3 Exercício físico agudo.....	15
4.4 Eutanásia, retirada e preparo dos tecidos.....	16
4.5 Reatividade Vascular.....	16
4.6 Quantificação de nitrato e nitrito vascular.....	18
4.7 Expressão das proteínas eNOS e Akt: total e fosforilada	19
4.8 Detecção do superóxido: quimioluminescência da lucigenina.....	20

4.9	Detecção do superóxido: oxidação do hidroetídio (DHE).....	21
4.10	Detecção do peróxido de hidrogênio.....	22
4.11	Atividade total da enzima superóxido dismutase.....	22
4.12	Hidroperoxidação lipídica.....	23
4.13	Razão glutatona reduzida e oxidada.....	23
4.14	Análise estatística.....	24
5	RESULTADOS.....	25
5.1	Reatividade Vascular.....	25
5.2	Nitrato e Nitrito.....	28
5.3	Fosforilação da Akt e EnoS.....	29
5.4	Produção de superóxido.....	31
5.5	Peróxido de hidrogênio.....	33
5.6	Atividade total da superóxido dismutase.....	34
5.7	Hidroperoxidação lipídica.....	35
5.8	Razão glutatona reduzida e glutatona oxidada.....	36
6	DISCUSSÃO.....	36
7	CONCLUSÃO.....	40
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Etapas da formação de NO e L-Citrulina a partir de L-Arginina.....	5
FIGURA 2 - Estímulos e mecanismos envolvidos na síntese e remoção de NO, e seu efeito parácrino no músculo liso vascular que acarretam na vasodilação.....	6
FIGURA 3 - Desenho ilustrativo do protocolo de reatividade vascular e dos parâmetros analisados.....	18
FIGURA 4 - Massa corporal total dos grupos controle e exercício no início dos experimentos.....	24
FIGURA 5 - Média das velocidades máximas individuais atingidas pelos animais dos grupos controle e exercício no início dos experimentos.....	25
FIGURA 6A Curva concentração-efeito à acetilcolina nos anéis aórticos dos grupos controle e exercício com o endotélio preservado e com o endotélio removido (inserto).....	26
FIGURA 6B Efeito dilatador máximo à acetilcolina.	26
FIGURA 6C Sensibilidade (EC50) à acetilcolina.....	26
FIGURA 7A Curva concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio e.....	27
FIGURA 7B Sensibilidade (EC50) ao nitroprussiato de sódio.....	27
FIGURA 8 - Curva concentração-efeito à acetilcolina nos anéis aórticos dos grupos controle e exercício pré-incubados com L-NAME (10^{-4} M).....	28
FIGURA 9A Concentração de nitrato nos homogenatos de anéis aórticos dos grupos controle e exercício.....	29

FIGURA 9B	Concentração de nitrito nos homogenatos de anéis aórticos dos grupos controle e exercício.....	29
FIGURA 10A	Imunomarcção em homogenato aórtico dos grupos controle e exercício para o conteúdo total e fosforilado da proteína eNOS.....	30
FIGURA 10B	Imunomarcção em homogenato aórtico dos grupos controle e exercício para o conteúdo total e fosforilado da proteína Akt.....	30
FIGURA 11A	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.....	31
FIGURA 11B	Quantificação do superóxido pela quimiluminescência da lucigenina em animais do com.....	31
FIGURA 12	Quantificação do superóxido pela quimiluminescência da lucigenina em anéis de animais do grupo controle e exercício incubados com DPI (20 mM).....	32
FIGURA 13 -	Quantificação do superóxido pela quimiluminescência da lucigenina em anéis de animais do grupo controle e exercício incubados com DETC (1 mM).....	33
FIGURA 14 -	Quantificação do peróxido de hidrogênio em anéis de animais do grupo controle e exercício.....	34
FIGURA 15 -	Atividade total da enzima superóxido dismutase (SOD) em homogenatos de anéis aórticos dos grupos controle e exercício.....	35
FIGURA 16 -	Quantificação de hidroperóxidos lipídicos em homogenato vascular de animais do grupo controle e exercício.....	35
FIGURA 17 -	Razão entre glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) em homogenato vascular de animais do grupo controle e exercício.....	36

LISTA DE QUADROS

Página

QUADRO 1 - Seqüência experimental..... 16

LISTA DE SIGLAS, ABREVIACOES E SÍMBOLOS

ACh	Acetilcolina
Akt	Proteína serina/treonina quinase
ATP	Adenosina trifosfato
BH4	Tetrahidrobiopterina
Ca ⁺²	Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CaM	Calmodulina
cNOS	óxido nítrico sintase constitutiva
CO ₂	Dióxido de carbono
CT	Grupo controle
DETC	cido dietilcarbmico
DHE	Hidroetdio
DPI	Difeniliodonio
EC ₅₀	Concentração eficiente para gerar efeito igual a 50% da resposta máxima
E _{max}	Efeito máximo
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
EROs	Espécies reativas de oxignio
EX	Grupo exercício
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona Oxidada
GTP	Guanosina trifosfato
h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico

L-NAME	N-nitro-L-arginine methyl ester
m	Metro
M	Molar
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NE	Noradrenalina
NHA	N ^G -hidroxil-L-arginina
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NPS	Nitroprussiato de sódio
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH ⁻	Radical hidroxil
ONOO ⁻	Peroxinitrito
peg-SOD	SOD conjugada com polietilenoglicol
Ser	Serina
SOD	Superóxido dismutase
ul	Microlitro
VnCl ₄	Cloreto de vanádio

RESUMO

EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBICO NO RELAXAMENTO AÓRTICO DE RATOS E NO CONTROLE DA BIODISPONIBILIDADE DO ÓXIDO NÍTRICO

Autor: LEONARDO YUJI TANAKA

Orientador: PROF. DR. PAULO RIZZO RAMIRES

O presente estudo avaliou o efeito do exercício físico aeróbico na função vasomotora dependente do endotélio em aorta de ratos bem como os mecanismos envolvidos na regulação da biodisponibilidade do NO. Para tanto, um grupo de animais foi submetido a uma sessão de exercício (EX, n=17) enquanto o outro grupo permaneceu em repouso (CT, n=18). Imediatamente após o exercício, os ratos de ambos os grupos foram eutanasiados para a retirada da aorta torácica para análises funcionais e bioquímicas. Resultados: observamos que o grupo exercitado apresentou uma melhora no relaxamento dependente do endotélio com um efeito máximo de 12%, sendo esse efeito relacionado a um aumento na ativação da eNOS. Apesar de aumentar o NO, os animais do grupo EX apresentaram níveis aumentados de superóxido (28%), efeito que foi associado à maior ativação do complexo enzimático NAD(P)H oxidase. Além do superóxido, o peróxido de hidrogênio também foi aumentado nos animais exercitados porém a maior produção de espécies reativas de oxigênio não foi suficiente para causar um estresse oxidativo vascular. Esses resultados demonstram que uma única sessão de exercício físico aeróbico é capaz de melhorar a vasodilatação dependente do endotélio por aumentar a biodisponibilidade de NO e que a produção de espécies reativas oxigênio também aumenta porém em níveis controlados .

Palavras-chave: exercício físico, vasodilatação, óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio

ABSTRACT

EFFECTS OF ACUTE AEROBIC EXERCISE ON VASODILATION RESPONSE OF RAT AORTA AND REGULATION OF NITRIC OXIDE BIOAVAILABILITY

Author: LEONARDO YUJI TANAKA

Adviser: PROF. DR. PAULO RIZZO RAMIRES

The present study evaluated the effect of aerobic physical exercise on endothelium-dependent vasomotor function of rat aorta as well the mechanisms involved in nitric oxide bioavailability control. One group of rats was submitted to one bout of exercise (EX, n=17) while the other one was placed on the treadmill without running (CT, n=18). Immediately after exercise both group were sacrificed and the thoracic aorta was removed for functional and biochemical analysis. Results: we observed that EX group showed an improvement on endothelium-dependent relaxation (12%) and it was related to increase on eNOS activation. Despite increased nitric oxide levels, EX group demonstrated higher superoxide production (28%) that was associated to NAD(P)H oxidase activation. Additionally, hydrogen peroxide also increased in EX group but the increase in reactive oxygen species was not enough to cause oxidative stress. Theses results demonstrate that one bout of aerobic exercise can improve endothelium-dependent vasodilation by increasing NO bioavailability, and that reactive oxygen species also increases but in a controlled fashion.

Key words: physical exercise, vasodilation, nitric oxide, reactive oxygen species