

## AGRADECIMENTOS

À Deus, que nos concede saúde e proteção em todas as jornadas que enfrentamos;

À minha mãe Luiza, ao meu pai Eduardo, e aos meus irmãos Milena, Alexandre, Maurício e Maíta, pelo carinho e apoio que sempre tive, e por tudo o que fizeram e fazem por mim;

À minha namorada Débora, pela paciência, compreensão, apoio, carinho e amor. Uma pessoa maravilhosa que foi fundamental para a realização desta dissertação, estando sempre ao meu lado dando forças para vencer todas as barreiras;

À Vó Elza, Tia Zezé, Tia Lídia e Tia Nely, por me apoiarem e participarem da minha vida;

Ao amigo Léo, que foi o meu braço direito na realização desta dissertação, estando sempre disposto e pronto para ajudar;

Aos amigos Henrique, Gustavo, Bruno, Guerra, Fernandinho, Valtinho, Tiagodoi, Binho, Juliano, Leandro, Tio Fernando, Daniel, Tiagrass, Chimbardinho, Felipe, Nelsinho, Tizziano, Luisinho, Max, Henriphop, Mureta, e a todo a turma do futebol. São muitos nomes que não caberiam nesta página;

À todos os amigos e familiares que me apóiam e fazem parte da minha vida;

Aos amigos que fazem ou fizeram parte do laboratório desde o início do mestrado, Teresa, Nelo, Léo, Carlos Eduardo, Adriana, Camila, Bruce, Juliana e Guga, por me ensinarem muitas coisas e pelo auxílio nos experimentos;

Aos amigos do laboratório da EEFE, Alessandra, Aline, Andréa, Carmão, Diego, Diogo, Ellena, Estéfano, Éverton, Fernanda, Flávio, Jan, Jaú, Júlio, Katt, Maíra, Marcele, Marcelo, Nara, Natale, Natalí, Rodrigo, Telma, Thiago e Vanessa, por todo o auxílio;

Aos amigos do laboratório de Biologia Vascular, Angélica, Célio, Cláudia, Cris, Denise, Elidia, Estevão, João, Laura, Leonora, Luciana, Marcel, Marcos, Maria, Marina, Vanda, Victor e Viviane, por toda a paciência e ajuda;

Às professoras Edilamar e Patrícia Brum, por fazerem parte da minha formação pessoal e profissional, e por servirem de exemplo de competência;

Ao professor Dr. Francisco Laurindo, pelo apoio científico e por manter sempre abertas as portas de seu laboratório para que eu pudesse realizar os experimentos e concluir essa dissertação.

Ao professor Dr. Paulo Rizzo Ramires, por me ingressar no meio científico-acadêmico, por confiar em meu trabalho, pelo apoio científico, pela paciência, pelo exemplo de pessoa e exemplo profissional, e além de tudo pela amizade.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE QUADROS.....	ix
LISTA DE SIGLAS, ABREVIACÕES E SÍMBOLOS.....	x
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Vaso Sangüíneo: Estrutura e Função.....	3
2.1.1 Camada Adventícia.....	3
2.1.2 Camada Média.....	4
2.1.2.1 Mecanismos envolvidos na contração do músculo liso vascular.....	5
2.1.3 Camada Íntima.....	8
2.1.3.1 Óxido Nítrico derivado do endotélio.....	9
2.1.3.1.1 Síntese de óxido nítrico.....	10
2.1.3.1.2 Remoção de óxido nítrico.....	11
2.1.3.2 Função vasomotora mediada pelo óxido nítrico derivado do endotélio.....	12
2.1.3.2.1 Participação do NO na resposta vasoconstritora arterial.....	13
2.2 Efeito crônico do exercício físico na função vasomotora arterial.....	14
2.3 Efeito agudo do exercício físico na resposta vasomotora arterial.....	16
3 OBJETIVOS.....	18
3.1 Gerais.....	18
3.2 Específicos.....	18
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Amostra e manipulação dos animais.....	19

4.2	Esquema experimental.....	20
4.3	Protocolo de esforço máximo.....	20
4.4	Protocolo de exercício físico.....	20
4.5	Remoção e preparação da aorta.....	21
4.6	Estudo da reatividade vascular.....	22
4.6.1	PROTOCOLO 1.....	23
4.6.1.1	Teste de integridade endotelial.....	23
4.6.1.2	Resposta vasoconstritora à noradrenalina.....	23
4.6.1.3	Resposta vasoconstritora ao cloreto de potássio.....	24
4.6.2	PROTOCOLO 2.....	24
4.6.2.1	Resposta vasoconstritora à noradrenalina na presença de L-NAME....	25
4.6.2.2	Resposta vasoconstritora ao cloreto de potássio na presença de L-NAME.....	25
4.6.3	Variáveis avaliadas na reatividade vascular.....	26
4.7	Concentração de proteína.....	26
4.8	Quantificação de nitrato e nitrito vascular.....	27
4.9	Medidas de espécies reativas de oxigênio.....	27
4.9.1	Método quantitativo – lucigenina.....	28
4.9.2	Método qualitativo - hidroetídio (DHE).....	28
4.10	Atividade máxima da enzima superóxido dismutase.....	29
4.11	Análise estatística.....	29
5	RESULTADOS.....	30
5.1	Caracterização dos grupos.....	30
5.2	Reatividade vascular.....	31
5.3	Concentração de nitrato e nitrito vascular.....	40
5.4	Espécies reativas de oxigênio.....	42
5.5	Atividade máxima da enzima superóxido dismutase.....	44
6	DISCUSSÃO.....	45
7	CONCLUSÃO.....	53
	REFERÊNCIAS.....	54

**LISTA DE TABELAS**

	Página
TABELA 1 - Efeito máximo (Emax) e sensibilidade (EC50) do agonista constritor noradrenalina nos anéis aórticos dos grupos controle e exercício.....	32
TABELA 2 - Efeito máximo (Emax) e sensibilidade (EC50) ao cloreto de potássio nos anéis aórticos dos grupos controle e exercício.....	34
TABELA 3 - Efeito máximo (Emax) e sensibilidade (EC50) do agonista constritor noradrenalina nos anéis aórticos sem endotélio dos grupos controle e exercício.....	35
TABELA 4 - Efeito máximo (Emax) e sensibilidade (EC50) ao cloreto de potássio nos anéis aórticos sem endotélio dos grupos controle e exercício.....	37
TABELA 5 - Efeito máximo (Emax) e sensibilidade (EC50) à noradrenalina nos anéis aórticos dos grupos controle e exercício pré-incubados com L-NAME.....	38
TABELA 6 - Efeito máximo (Emax) e sensibilidade (EC50) ao cloreto de potássio nos anéis aórticos dos grupos controle e exercício pré-incubados com L-NAME.....	40

**LISTA DE FIGURAS**

	Página
FIGURA 1 - Mecanismos envolvidos na contração da célula muscular lisa vascular induzida por noradrenalina.....	7
FIGURA 2 - Estímulos e mecanismos envolvidos na síntese e remoção de NO, e seu efeito parácrino no músculo liso vascular que acarretam na vasodilação.....	10
FIGURA 3 - Esquema da remoção e preparação da aorta torácica.....	22
FIGURA 4 - Esquema do PROTOCOLO 1 de reatividade vascular.....	24
FIGURA 5 - Esquema do PROTOCOLO 2 de reatividade vascular.....	26
FIGURA 6 - Massa corporal total dos grupos controle e exercício no início dos experimentos.....	30
FIGURA 7 - Média das velocidades máximas individuais atingidas pelos animais dos grupos controle e exercício no início dos experimentos.....	31
FIGURA 8 - Curva concentração-efeito à noradrenalina nos anéis aórticos dos grupos controle e exercício.....	32
FIGURA 9 - Curva concentração-efeito ao cloreto de potássio nos anéis aórticos dos grupos controle e exercício.....	33
FIGURA 10 - Curva concentração-efeito à noradrenalina nos anéis aórticos sem endotélio vascular dos grupos controle e exercício.....	35
FIGURA 11 - Curva concentração-efeito ao cloreto de potássio nos anéis aórticos sem endotélio vascular dos grupos controle e exercício....	36
FIGURA 12 - Curva concentração-efeito à noradrenalina nos anéis aórticos dos grupos controle e exercício pré-incubados com L-NAME ( $10^{-4}$ M).....	38

FIGURA 13 - Curva concentração-efeito ao cloreto de potássio nos anéis aórticos dos grupos controle e exercício pré-incubados com L-NAME ( $10^{-4}$ M).....	39
FIGURA 14 - Concentração de nitrato e nitrito nos homogenatos de anéis aórticos dos grupos controle e exercício.....	41
FIGURA 15 - Foto ilustrativa da marcação por EROs nos cortes de anéis aórticos de um animal do grupo controle e um do exercício, e dos mesmos na presença de peg-SOD.....	43
FIGURA 16 - Níveis de superóxido em homogenatos aórticos dos grupos controle e exercício no estado basal, na inibição da NAD(P)H oxidase (DPI) e na inibição da SOD (DETC).....	44
FIGURA 17 - Atividade máxima da enzima superóxido dismutase em homogenatos de anéis aórticos dos grupos controle e exercício.....	45

**LISTA DE QUADROS**

Página

QUADRO 1 - Seqüência dos protocolos experimentais utilizados no estudo.....	20
---	----

**LISTA DE SIGLAS, ABREVIACOES E SÍMBOLOS**

ACh	Acetilcolina
Akt	Proteína serina/treonina quinase
ATP	Adenosina trifosfato
BH4	Tetrahidrobiopterina
Ca <sup>+2</sup>	Cálcio
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CaM	Calmodulina
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CTR	Grupo controle
DAG	Diacilglicerol
DETC	cido dietilcarbmico
DHE	Hidroetdio
DPI	difeniliodonio
EC <sub>50</sub>	Concentração eficiente para gerar efeito igual a 50% da resposta máxima
E <sub>max</sub>	Efeito máximo
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
EROs	Espécies reativas de oxignio
EX	Grupo exercício
FAD	Dinucleotídeo de flavina e adenina
FMN	Mononucleotdeo de flavina
GMP <sub>c</sub>	Guanosina monofosfato cíclico
GTP	Guanosina trifosfato
h	Hora
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrognio
HClO	cido hipocloroso
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trifosfato

KCl	Cloreto de potássio
Kg	Quilograma
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potássio monobásico
L-NAME	N-nitro-L-arginine methyl ester
m	Metro
M	Molar
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio
min	Minuto
mL	Mililitro
MLC	Cadeia leve de miosina
MLCK	Quinase da cadeia leve de miosina
mm	Milímetro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
NE	Noradrenalina
NHA	N <sup>G</sup> -hidroxil-L-arginina
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
OH <sup>-</sup>	Radical hidroxil
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
peg-SOD	SOD conjugada com polietilenoglicol
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
PLC	Fosfolipase C
SOD	Superóxido dismutase

ul	Microlitro
VnCl <sub>4</sub>	Cloreto de vanádio
VOCCs	Canais de Ca <sup>+2</sup> operados por voltagem
α	Alfa

## RESUMO

### **EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO SOBRE A RESPOSTA VASOCONSTRITORA EM AORTA DE RATOS**

**Autor: LUIZ ROBERTO GRASSMANN BECHARA**

**Orientador: PROF. DR. PAULO RIZZO RAMIRES**

O presente estudo avaliou, em aorta de ratos, o efeito de uma sessão de exercício físico aeróbio na resposta vasoconstritora dependente e independente de receptores adrenérgicos, assim como a participação dos sistemas de síntese e remoção de óxido nítrico (NO) nestas respostas. Para isso, um grupo de ratos foi submetido a uma sessão de exercício físico em esteira rolante (grupo EX, n=14), enquanto o outro grupo permaneceu em repouso (grupo CTR, n=14), sendo que imediatamente após este período os ratos de ambos os grupos foram sacrificados e foi feita a retirada da aorta torácica para realização de medidas funcionais e bioquímicas in vitro. Resultados: pudemos observar que o grupo EX apresentou menor resposta vasoconstritora máxima à noradrenalina e ao cloreto de potássio quando comparados ao grupo CTR. Esta diferença na reatividade vascular deixou de ser observada nos anéis aórticos com o endotélio removido ou pré-incubados com um inibidor da síntese de NO. Além disso, o grupo EX apresentou maior biodisponibilidade de NO, maiores níveis vasculares de ânions superóxido, e maiores atividades das enzimas NAD(P)H oxidase e superóxido dismutase comparado ao grupo CTR. Esses resultados demonstram que uma única sessão de exercício físico aeróbio é capaz de atenuar a resposta vasoconstritora dependente e independente

de receptores adrenérgicos em aorta de ratos, principalmente por aumentar a biodisponibilidade vascular de óxido nítrico, apesar de aumentar os níveis vasculares de ânions superóxido.

Palavras-chave: exercício físico, vasoconstrição, óxido nítrico, superóxido.

## **ABSTRACT**

### **EFFECTS OF ACUTE AEROBIC EXERCISE ON THE VASOCONSTRICTOR RESPONSE OF RAT AORTA**

**Author: LUIZ ROBERTO GRASSMANN BECHARA**

**Adviser: PROF. DR. PAULO RIZZO RAMIRES**

The present study investigated, in rat aortas, the effect of one bout of aerobic exercise on the adrenergic receptor-dependent and -independent vasoconstrictor response, and the role of nitric oxide (NO) synthesis and scavenging systems on this vasomotor response. One group of rats was submitted to a single bout of exercise on a treadmill (EX group, n=14) and the other one was placed in the treadmill without running (CTR group, n=14). Immediately after this period, both groups were euthanized and the thoracic aorta was removed for functional and biochemical analysis. Results: one bout of exercise attenuated the maximal contractile response to both noradrenaline and potassium chloride compared to CTR group. These differences on vascular reactivity were not observed in aortic rings when the endothelium was removed or aortic rings pre-incubated with a nitric oxide synthesis inhibitor. Additionally, EX group increased NO bioavailability, increased vascular superoxide levels, and increased NAD(P)H oxidase and superoxide dismutase activity compared to CTR group. These results demonstrate that one bout of aerobic exercise is able to attenuate adrenergic receptor-dependent and -independent vasoconstrictor response in rat aorta, mainly by increasing vascular NO bioavailability, despite the enhanced vascular superoxide levels.

Key words: exercise, vasoconstriction, nitric oxide, superoxide