

1 INTRODUÇÃO

Há muito tempo tem sido observada a presença de alteração na função vascular em diferentes doenças cardiovasculares, como aterosclerose, hipertensão arterial, diabetes mellitus, insuficiência cardíaca, entre outras, e até mesmo em seus fatores de risco relacionados, como envelhecimento e obesidade. No entanto, ainda não está claro se essa alteração está envolvida no desenvolvimento destas doenças ou se é resultado da progressão das doenças em si (NEGRÃO, SANTOS & ALVES, 2003). Acreditamos ser esta a razão pelo qual existem cada vez mais estudos relacionados à biologia vascular nos últimos anos.

Dentro desta grande área de pesquisa, um tema que vem recebendo atenção especial em meio à ciência é o estudo dos efeitos do treinamento físico no sistema vascular arterial, principalmente em relação ao controle do tônus vasomotor tanto em repouso como durante o exercício.

Atualmente, já é sabido que os vasos sangüíneos são extremamente adaptáveis à prática regular de exercícios físicos, sendo a melhora na função vasomotora um dos principais benefícios decorrentes do treinamento físico aeróbio no sistema cardiovascular (MYERS, 2003).

Muito esforço tem sido feito para se elucidar os mecanismos relacionados ao treinamento físico que expliquem a melhora da função vasomotora, mais especificamente no aumento da dilatação dependente do endotélio e na atenuação da resposta vasoconstritora em diferentes leitos arteriais, tanto em indivíduos saudáveis quanto em pacientes com alteração nesta função (LAUGHLIN, 2004).

Alguns estudos envolvendo cultura de células endoteliais, diferentes espécies animais e humanos sugerem que o principal estímulo envolvido nesta melhora da função vasomotora é o aumento do fluxo sangüíneo observado durante a execução das sessões de exercício aeróbio, acarretando cronicamente nesta resposta adaptativa benéfica (DELP & O'LEARY, 2004; LAUGHLIN, 1995).

Este aumento do fluxo sangüíneo durante o exercício pode conseqüentemente aumentar o estresse de cisalhamento (ou *shear stress*), que é a força exercida pelo sangue corrente paralelamente ao eixo longitudinal dos vasos sangüíneos (NIEBAUER & COOKE, 1996), e estimular a rápida produção de óxido

nítrico (potente vasodilatador) pelas células endoteliais, o que poderia acarretar em uma melhora aguda da resposta vasomotora (HARRISON, WIDDER, GRUMBACH, CHEN, WEBER & SEARLES, 2006). Por outro lado, o aumento do estresse de cisalhamento também é capaz de estimular a liberação vascular de espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido (DUERRSCHMIDT, STIELOW, MULLER, PAGANO & MORAWIETZ, 2006; LAURINDO, PEDRO, BARBEIRO, PILEGGI, CARVALHO, AUGUSTO & DA LUZ, 1994), modulando assim a biodisponibilidade de óxido nítrico.

Assim, sugerimos que ocorra um aumento paralelo da produção de óxido nítrico (NO) e ânions superóxido (O_2^-) sob estímulo do estresse de cisalhamento gerado pelo exercício físico, podendo provocar alterações na vasomotricidade arterial. Porém, muitos estudos apresentam respostas controversas quanto ao efeito agudo do exercício físico nesta função. Com isso, acreditamos ser de grande importância compreender o efeito agudo do exercício físico aeróbio na resposta vasomotora arterial, bem como investigar a participação do óxido nítrico na modulação desta resposta, já que esta é um das principais substâncias que controlam o tônus vasomotor. Além disso, é fundamental investigar também as vias de produção e remoção de ânions superóxido, já que estes estão diretamente envolvidos no controle da biodisponibilidade vascular de NO.

A seguir, discorreremos mais detalhadamente os mecanismos envolvidos no controle do tônus vasomotor e os efeitos do exercício físico aeróbio nesta função, dando um enfoque maior na resposta vasoconstritora arterial, que é alvo deste estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O sistema vascular é responsável por suprir as necessidades dos tecidos, transportando nutrientes, removendo os produtos da excreção, conduzindo hormônios de uma parte a outra do corpo, e em geral, preservando em todos os líquidos teciduais, um ambiente apropriado para as condições ótimas de sobrevivência e funcionamento das células (GUYTON & HALL, 2002). Assim, para

manter a função deste sistema, é necessário um fino controle do tônus vascular com o intuito de promover um adequado fluxo sanguíneo tecidual.

Segundo DELP e LAUGHLIN (1998), o controle do tônus vascular e conseqüente do fluxo sanguíneo é influenciado por uma magnitude de fatores que podem ser divididos em duas categorias gerais: mecanismos de controle cardiovascular central, os quais envolvem os sistemas de controle neural e hormonal; e mecanismos de controle vascular local, incluindo controle metabólico, controle mediado pelo endotélio, respostas propagatórias, controle miogênico e a bomba muscular.

Nesta breve revisão, abordaremos principalmente os mecanismos de controle vascular local que influenciam o tônus, já que utilizamos um sistema de banho de órgãos para vasos isolados. Dentre esses mecanismos de controle local, daremos enfoque no controle mediado pelo endotélio vascular.

Para entendermos melhor como ocorre o controle local do tônus vascular e o efeito do exercício físico na resposta vasomotora, primeiro devemos conhecer as estruturas e as funções dos constituintes dos vasos sanguíneos.

2.1 Vaso Sanguíneo: Estrutura e Função

O vaso sanguíneo, de uma forma geral, é constituído por três camadas principais: externamente ocorre a camada adventícia, constituída de fibras de colágeno; em seguida ocorre a camada média, composta de células musculares lisas; e internamente à luz do vaso ocorre a camada íntima, composta por uma camada única de células endoteliais e uma lâmina basal (MCALLISTER, 1995).

2.1.1 Camada Adventícia

A adventícia corresponde a camada mais externa dos vasos sanguíneos, e suas estruturas variam um pouco entre os leitos vasculares. No tronco pulmonar e aorta existe relativamente pequena condensação de tecido conectivo fibroso que pode ser envolto por tecido adiposo. Já em artérias viscerais, como nos ramos renal

e mesentérico, existem camadas bem organizadas de fibras elásticas e colágenas (GLAGOV, 1984).

Generalizando, esta camada consiste de uma estrutura colagenosa densa que contém numerosos feixes de fibrilas colágenas, fibras elásticas e muitos fibroblastos, juntamente com algumas células de músculo liso, e é sede de canais linfáticos e inervações (BRAUNWALD, 1991).

Devido a esta estrutura, a adventícia possui a função de servir como um tampão mecânico-elástico para prevenir a compressão ou restrição da expansão pulsátil por tecidos e órgãos circundantes, e também a função de nutrir-se e nutrir a camada média, garantindo a função do músculo liso vascular (GLAGOV, 1984).

2.1.2 Camada Média

A camada média é estruturada, em geral, por células musculares lisas, fibras elásticas e fibras de colágeno, e é limitada pelas lâminas elásticas internas e externas, que são lâminas fenestradas de fibras elásticas com numerosas aberturas suficientemente grandes para permitir que as substâncias passem em ambas as direções (GLAGOV, 1984; BRAUNWALD, 1991).

A proporção relativa desses componentes celulares e fibrosos encontrados na camada média é utilizada para classificar as artérias quanto ao tipo elástica ou muscular. Em artérias elásticas, como a aorta, são abundantes fibras de matriz, na forma de lamelas elásticas bem definidas, e feixes de colágeno. Já em artérias musculares, o componente predominante da média é o músculo liso, com fibras de tecido conectivo relativamente menor que em artérias elásticas (GLAGOV, 1984).

A função fundamental da camada média é a geração de forças mecânicas requisitadas para o controle do diâmetro dos vasos (PAUL, 1984) e conseqüentemente a regulação do fluxo sangüíneo e da pressão arterial (WEBB, 2003). Este controle só é possível porque as células musculares lisas são altamente especializadas na função de contração e relaxamento (HILGERS & WEBB, 2005).

As células musculares lisas, apesar de não apresentarem a mesma organização no aparato contrátil que as células musculares estriadas, são construídas morfológicamente similares quanto aos elementos protéicos. Em ambos os tipos, actina e miosina, organizada em filamentos finos e espessos, são os elementos centrais de seus sistemas mecanoquímicos (PAUL, 1984).

Porém, apesar de apresentarem os mesmos elementos protéicos que as células musculares estriadas, as células musculares lisas são capazes de gerar mais força por miosina, de apresentar menor velocidade de contração, e de acarretar em menor custo energético no desenvolvimento ativo de tensão (PAUL, 1984).

2.1.2.1 Mecanismos envolvidos na contração do músculo liso vascular

A contração do músculo liso vascular é involuntária e é regulada principalmente por ativação de receptores de membrana e ativação mecânica (estiramento) das proteínas contráteis actina e miosina (SOMLYO & SOMLYO, 1993; WEBB, 2003).

Estes estímulos que desencadeiam a contração das células musculares lisas ocorrem a partir de fibras vasomotoras do sistema nervoso simpático, hormônios circulantes, agentes autócrinos/parácrinos e outros sinalizadores químicos locais, além de alterações na tensão e estiramento da parede do vaso (HILGERS & WEBB, 2005; ROWELL, 1986).

Independente do estímulo, as células musculares lisas vasculares utilizam o ciclo das pontes cruzadas entre actina e miosina para gerar força e alterações na concentração de íons cálcio (Ca^{2+}) para iniciar a sinalização molecular envolvida no desenvolvimento da contração (HILGERS e WEBB, 2005), mediadas pela abertura de canais de Ca^{2+} presentes na membrana na célula muscular, acarretando no influxo desses íons do meio extracelular, e pela liberação de Ca^{2+} das organelas intracelulares, como o retículo sarcoplasmático (SHAW & MCGRATH, 1996).

Como neste estudo avaliamos a resposta vasoconstritora ao agonista noradrenalina, daremos enfoque nesta revisão aos mecanismos envolvidos na contração induzida por esse neurotransmissor.

As fibras pós-ganglionares do sistema nervoso simpático são normalmente adrenérgicas, e assim liberam noradrenalina (NE) no sítio efetor vascular (ROWELL, 1986). Após liberada, a noradrenalina liga-se aos receptores adrenérgicos presentes na membrana do músculo liso, que são predominantemente do subtipo α_1 na aorta (vaso alvo deste estudo) (GUIMARÃES & MOURA, 2001) e ativa a enzima fosfolipase C (PLC) através da proteína G acoplada ao receptor. Esta enzima é específica para fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂), e quando ativada promove a hidrólise desses fosfolipídios de membrana gerando dois segundos mensageiros: inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG) (MALARKEY, AIDULIS, BELHAM, GRAHAM, MCLEES, PAUL & PLEVIN, 1996; WEBB, 2003).

A ligação de IP₃ em receptores próprios para este mensageiro no retículo sarcoplasmático resulta na liberação de Ca^{+2} para o citosol, onde este se liga a calmodulina formando o complexo cálcio-calmodulina (Ca^{+2} -CaM), o qual ativa a quinase da cadeia leve de miosina (MLCK). Essa quinase, por sua vez, fosforila a serina 19 da cadeia leve de miosina (MLC) que estimula a actina/miosina ATPase, a ponte cruzada actina/miosina e o desenvolvimento de força.

Em relação ao DAG, esse segundo mensageiro ativa a proteína quinase C (PKC), a qual fosforila proteínas-alvos específicas como a MLC, MLCK, e canais de Ca^{+2} operados por voltagem (VOCCs) (MALARKEY et al., 1996).

Assim, a partir de um mesmo estímulo (noradrenalina) sobre os receptores α_1 -adrenérgicos, ambos os segundos mensageiros agem de forma paralela no desenvolvimento da contração do músculo liso vascular.

A FIGURA 1 ilustra os mecanismos envolvidos na contração da célula muscular lisa desencadeada pela noradrenalina acima descritos.

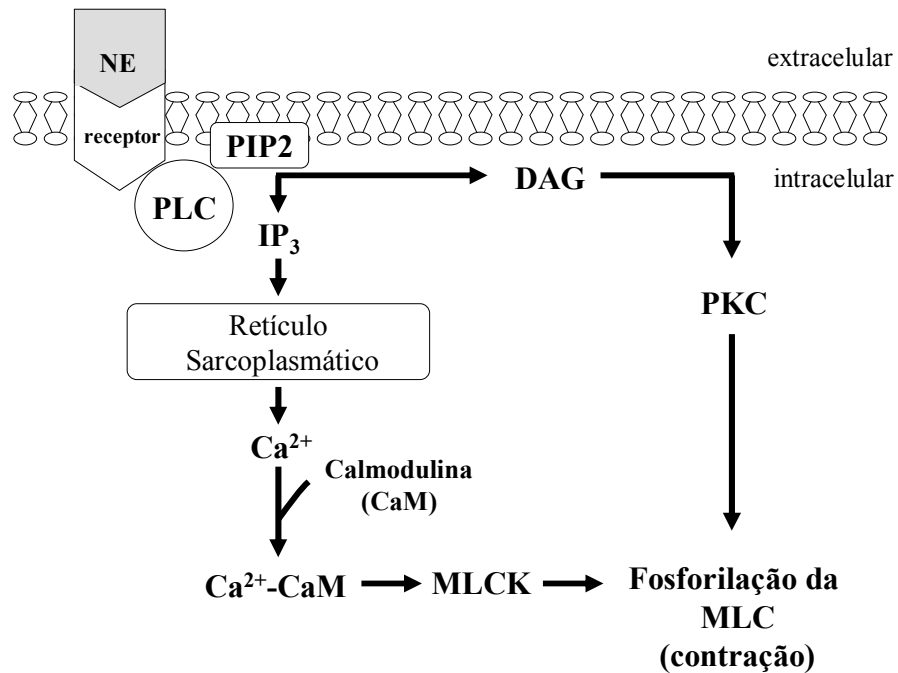


FIGURA 1 - Mecanismos envolvidos na contração da célula muscular lisa vascular induzida por noradrenalina.

Outro estímulo vasoconstritor, muito utilizado em pesquisas *in vitro* com a finalidade de avaliar a resposta constritora independente de receptores adrenérgicos (também utilizado neste estudo), é a adição de concentrações elevadas de cloreto de potássio (KCl) ao meio.

Este aumento na concentração extracelular de íons potássio gera uma alteração no potencial eletroquímico da membrana da célula muscular lisa, acarretando no fechamento de canais de potássio de membrana e aumentando a concentração desse cátion no meio intracelular, o que conseqüentemente gera a despolarização desta célula. Esta despolarização, por sua vez, estimula a abertura dos canais de Ca^{+2} operados por voltagem presentes na membrana e resulta no influxo de Ca^{+2} para o meio intracelular, desencadeando os mecanismos de contração supracitados.

2.1.3 Camada Íntima

A camada íntima, denominada endotélio vascular, é formada por uma monocamada de células endoteliais achatadas e sobrepostas que recobre a luz de todos os vasos sanguíneos, representando uma expressiva massa de tecido (aproximadamente 1 kg em um adulto) e apresentando uma localização estratégica entre o sangue circulante e a camada média de músculo liso (GALLEY & WEBSTER, 2004; GREEN, O'DRISCOLL, BLANKSBY & TAYLOR, 1996). Essas células endoteliais apresentam estrutura alongada com o núcleo proeminente, repleta de organelas intracelulares onde, preenchendo quase a metade da membrana luminal, encontram-se pequenas invaginações denominadas cavéolas, região na qual se verifica a presença de receptores, moléculas efetoras e sinalizadoras e várias substâncias que estimulam a célula endotelial a produzir e liberar substâncias vasoativas (NASCIMENTO, PATRIARCA & HEIMANN, 2003).

O estudo das células endoteliais vasculares começou a ganhar espaço em meio à ciência a partir de 1980, quando investigações pioneiras de FURCHGOTT e ZAWADISK (1980) demonstraram que o endotélio vascular, muito além de uma simples barreira anatômica, assume papel fundamental no controle do tônus vascular.

A partir de então, o endotélio é hoje considerado um importante elemento envolvido na manutenção da homeostase da parede vascular bem como do controle da circulação (LAUGHLIN, 2004), assumindo diferentes funções como a modulação do tônus vascular, o controle da permeabilidade dos vasos, a proliferação celular local, a deposição da matriz extracelular, a resposta inflamatória e a regeneração aos danos locais (CANNON, 1998).

Essas funções endoteliais decorrem de sua capacidade em sintetizar e liberar substâncias vasoativas (NASEEM, 2005), já que esta monocamada que forma uma rede de transmissão de informações é capaz de detectar mínimas alterações na pressão arterial, fluxo sanguíneo, balanço oxidativo, coagulação, sinal de inflamação e ativação do sistema imune do organismo, podendo responder a estes estímulos de forma adequada, com a participação de todas as células, local ou sistemicamente (NASCIMENTO et al., 2003). Além disso, por estar em íntimo contato com o sangue

circulante, o endotélio vascular também está submetido de maneira constante ao estresse de cisalhamento (BOO & JO, 2003).

A partir destes estímulos físicos, neurais e humorais, encontramos uma lista de substâncias vasoativas que são sintetizadas pelo endotélio vascular, que podem ser divididas em fatores relaxantes derivados do endotélio (óxido nítrico, prostaciclina, monóxido de carbono e fatores hiperpolarizantes) e fatores constritores derivados do endotélio (endotelina-1, angiotensina-II, tromboxano, prostaglandina e espécies reativas de oxigênio) (TRIGGLE, HOLLENBERG, ANDERSON, DING, JIANG, CERONI, WIEHLER, NG, ELLIS, ANDREWS, MCGUIRE & PANNIRSELVAM, 2003). Dentre estas substâncias, o óxido nítrico é considerado o mais importante e mais estudado nos últimos anos, assumindo papel de destaque na manutenção da homeostase vascular (DUSSE, VIEIRA & CARVALHO, 2003; NASEEM, 2005).

2.1.3.1 Óxido Nítrico derivado do endotélio

O óxido nítrico é um radical livre gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons de nitrogênio e oito de oxigênio, e apresenta um elétron desemparelhado em sua última camada de energia, sendo atualmente considerado um dos mais importantes mediadores de processos sinalizadores intra e extracelulares (DUSSE et al., 2003).

Esse gás produzido pelas células endoteliais possui papéis essenciais na proteção dos vasos sanguíneos, como: inibição da agregação plaquetária, da adesão de monócitos e leucócitos, da proliferação do músculo liso vascular, assim como, efeito antioxidativo e vasodilatador (GEWALTIG & KOJDA, 2002; TRIGGLE et al., 2003). Assim, para a manutenção da função endotelial normal, que está diretamente relacionada à biodisponibilidade de óxido nítrico, é necessário um fino equilíbrio entre a taxa de síntese e a taxa de remoção desse agente vasoprotetor (descritas a seguir), onde um desequilíbrio neste sistema pode, cronicamente, acarretar no desenvolvimento da disfunção endotelial (DEANFIELD, HALCOX & RABELINK, 2007).

A FIGURA 2 ilustra os mecanismos de síntese e remoção de NO e seu efeito parácrino no músculo liso, descritos nos tópicos a seguir.

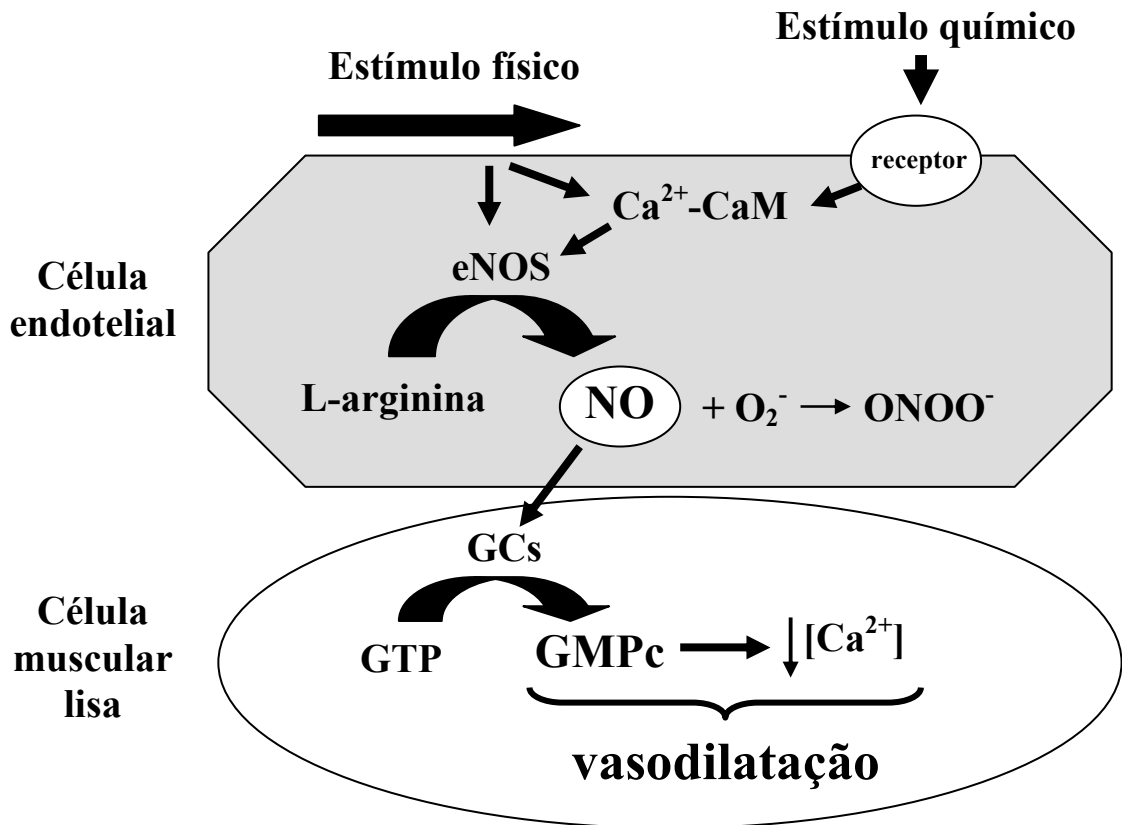


FIGURA 2 - Estímulos e mecanismos envolvidos na síntese e remoção de NO, e seu efeito parácrino no músculo liso vascular que acarretam na vasodilatação.

2.1.3.1.1 Síntese de óxido nítrico

Diversas células são capazes de sintetizar óxido nítrico pela ação das enzimas óxido nítrico sintases (NOS) na presença de co-fatores como a tetrahydrobiopterina (BH_4), dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD), e mononucleotídeo de flavina (FMN), das quais três isoformas destas enzimas foram

identificadas como responsáveis por esta produção. Com base nos tecidos onde estas enzimas foram primeiramente clonadas e caracterizadas, elas foram nomeadas como isoforma I ou neuronal (nNOS), isoforma II ou induzida por citocinas (iNOS), e isoforma III ou endotelial (eNOS) (FORSTERMANN, CLOSS, POLLOCK, NAKANE, SCHWARZ, GATH & KLEINERT, 1994).

No endotélio vascular, a síntese de óxido nítrico é catalisada principalmente pela isoforma endotelial (eNOS), que está localizada na cavéola na sua forma inativa enquanto ligada a proteína calveolina-1 (NASCIMENTO et al., 2003). A partir de estímulos químicos (acetilcolina, bradicinina, entre outros) ocorre aumento da concentração de Ca^{+2} intracelular, favorecendo a interação Ca^{+2} -calmodulina (Ca^{+2} -CaM), complexo este que é capaz de ativar a eNOS. Adicionalmente, o estímulo mecânico (estresse de cisalhamento) também pode ativar esta enzima, porém por uma via independente do aumento de Ca^{+2} intracelular, ativando quinases como proteína quinase B (Akt) e proteína quinase A (PKA), entre outras, que por sua vez, fosforilam a serina 1177 e a serina 635 da eNOS, aumentando a sua sensibilidade ao Ca^{+2} presente no citosol (BOO, HWANG, SYKES, MICHELL, KEMP, LUM & JO, 2002; BOO, SORESCU, BOYD, SHIOJIMA, WALSH, DU & JO, 2002; HAMBRECHT, ADAMS, ERBS, LINKE, KRANKEL, SHU, BAITHER, GIELEN, THIELE, GUMMERT, MOHR & SCHULER, 2003). Sabemos atualmente que esses estímulos mecânicos são os principais ativadores fisiológicos da fosforilação da eNOS (GREEN et al., 1996).

Com a eNOS ativa, ocorre hidroxilação de um dos nitrogênios guanidinos da L-arginina para gerar N^G -hidroxil-L-arginina (NHA) e posteriormente conversão da NHA em L-citrulina e óxido nítrico (NO), a substância mais importante sintetizada pelo endotélio (DUSSE et al., 2003).

2.1.3.1.2 Remoção de óxido nítrico

Um dos principais mecanismos envolvidos na remoção do óxido nítrico é a sua eliminação pela reação com espécies reativas de oxigênio (EROs).

As espécies reativas de oxigênio, produzidas normalmente pelas células durante o metabolismo, representam um grupo de moléculas derivadas da redução

incompleta do oxigênio, e determinam as propriedades tóxicas do oxigênio molecular por serem altamente reativas e capazes de oxidar biomoléculas alterando suas funções (McCORD, 2000). No entanto, quantidades mínimas de EROs são fundamentais para a manutenção das funções celulares fisiológicas, como observado em células endoteliais por POLYTARCHOU e PAPADIMITRIOU (2005).

Segundo KOJDA e HARRISON (1999), ânions superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HClO), óxido nítrico (NO), radical hidroxil (OH^-) e peroxinitrito ($ONOO^-$) são as espécies reativas de maior relevância para a biologia vascular. Em mamíferos, as principais fontes geradoras dessas EROs são a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, a enzima xantina oxidase e o complexo enzimático pró-oxidante nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NAD(P)H oxidase) (KOJDA & HARRISON, 1999), das quais esta última é considerada a principal geradora de espécies reativas nos vasos sanguíneos

Quando a produção das EROs excede a capacidade de defesa por meio dos mecanismos antioxidantes, como a enzima superóxido dismutase (SOD), dentre outras, ocorre o estado caracterizado como estresse oxidativo (CAI & HARRISON, 2000), onde o NO pode reagir ainda dentro da célula endotelial com ânion superóxido (O_2^-) ou outras EROs e ser inativado e convertido a peroxinitrito ($ONOO^-$), uma espécie reativa nitrogenada extremamente lesiva para esta célula (NASCIMENTO et al. 2003).

Portanto, a manutenção do equilíbrio redox vascular é essencial para a preservação da biodisponibilidade do óxido nítrico.

2.1.3.2 Função vasomotora mediada pelo óxido nítrico derivado do endotélio

Um dos principais efeitos do óxido nítrico nos vasos sanguíneos é o controle do tônus vascular. Isto porque esse radical livre desempenha uma potente ação vasodilatadora.

Este efeito vasodilatador do NO ocorre em função de sua difusão do endotélio para a célula muscular lisa. No interior destas células, o NO interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase, alterando a conformação desta enzima, tornando-a ativa. A guanilato ciclase catalisa a saída de dois grupamentos

fosfato da molécula guanosina trifosfato (GTP), formando a guanosina monofosfato cíclico (GMPc). O aumento da concentração de GMPc ativa a proteína quinase dependente de GMPc (PKG), a qual promove diminuição da entrada de Ca^{+2} para a célula, inibição da liberação de Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático e aumento do seqüestro de Ca^{+2} para o retículo sarcoplasmático, além de alterar o estado de fosforilação da cadeia leve de miosina, resultando assim no relaxamento da célula muscular lisa (CARVALHO, FORTES, PASSAGLIA & NIGRO, 2003; DUSSE et al., 2003; WEBB, 2003).

Esse conceito de que o NO derivado do endotélio controla o tônus vascular de modo parácrino foi extremamente inovador e relevante na área de biologia vascular. As pesquisas realizadas sobre a função endotelial têm utilizado manobras fisiológicas e/ou farmacológicas que estimulem a vasodilatação dependente do endotélio, a qual está relacionada diretamente com a biodisponibilidade de óxido nítrico, para avaliar a integridade desta função (DEANFIELD et al., 2007). Ainda hoje, o termo disfunção endotelial é freqüentemente utilizado para designar a perda da capacidade vasodilatadora mediada pelo óxido nítrico derivado do endotélio, apesar das células endoteliais exercerem várias outras funções (LAURINDO, 2003).

2.1.3.2.1 Participação do NO na resposta vasoconstritora arterial

Em relação ao controle vasomotor, o óxido nítrico parece não estar apenas envolvido em promover a vasodilatação arterial, mas também apresenta um importante papel em atenuar a resposta vasoconstritora das artérias.

Esse efeito do óxido nítrico na resposta vasoconstritora ocorre pela ativação de sua síntese paralelamente ao estímulo constritor, já que existe uma via de comunicação entre as células endoteliais e musculares lisas mediada por “gap junctions” (DORA, XIA & DULING, 2003), onde alterações no potencial de membrana de um tipo celular podem alterar a função dos canais de cálcio operados por voltagem do outro tipo de célula (XIA, LITTLE & DULING, 1995).

Assim, a partir destas junções intercelulares, um aumento na concentração de Ca^{+2} no músculo liso vascular sob estímulo à noradrenalina,

agonista utilizado neste estudo, poderia acarretar em uma maior concentração de Ca^{+2} na célula endotelial. De fato, YASHIRO e DULING (2000) observaram aumento na concentração de Ca^{+2} na célula endotelial paralelo ao aumento no Ca^{+2} citosólico do músculo liso, acarretando em uma modulação da constrição mediada pelo endotélio.

Essa modulação ocorre pelo fato de que o aumento na concentração de Ca^{+2} no citosol da célula endotelial ativa a eNOS, que por sua vez, promove maior produção do vasodilatador óxido nítrico, atenuando a vasoconstrição (DORA, DOYLE & DULING, 1997).

2.2 Efeito crônico do exercício físico na função vasomotora arterial

Inúmeros estudos têm demonstrado que o treinamento físico aeróbio promove uma variedade de adaptações benéficas ao sistema cardiovascular. Em função disto, a utilização desse tipo de atividade física aumentou bastante nos últimos anos como forma de prevenção e terapia no combate às patologias e fatores de risco cardiovascular, como insuficiência cardíaca, hipertensão arterial, diabetes mellitus, aterosclerose, doença da artéria coronária, entre outros (MYERS, 2003; THOMPSON, BUCHNER, PINA, BALADY, WILLIAMS, MARCUS, BERRA, BLAIR, COSTA, FRANKLIN, FLETCHER, GORDON, PATE, RODRIGUEZ, YANCEY & WENGER, 2003).

A melhora da função vasomotora é também um dos muitos fatores benéficos associados ao treinamento físico aeróbio. Este efeito positivo é observado pelo aumento da vasodilatação dependente do endotélio e atenuação da resposta vasoconstritora à agonistas adrenérgicos tanto em indivíduos quanto em animais saudáveis (CHEN, LI & CHEN, 1994; CHIES, DE OLIVEIRA, PEREIRA, DE ANDRADE & CORREA, 2004; CLARKSON, MONTGOMERY, MULLEN, DONALD, POWE, BULL, JUBB, WORLD & DEANFIELD, 1999; DELP & LAUGHLIN, 1997; JOHNSON, RUSH, TURK, PRICE & LAUGHLIN, 2001; MCALLISTER, JASPERSE & LAUGHLIN, 2005; OLTMAN, PARKER, ADAMS & LAUGHLIN, 1992; SPIER, LAUGHLIN & DELP, 1999), porém é mais evidente quando associado às diversas patologias e seus fatores de risco (KOBAYASHI, TSURUYA, IWASAWA, IKEDA,

HASHIMOTO, YASU, UEBA, KUBO, FUJII, KAWAKAMI & SAITO, 2003; MEYER, KUNDT, LENSCHOW, SCHUFF-WERNER & KIENAST, 2006; MINAMI, ISHIMURA, HARADA, SAKAMOTO, NIWA & NAKAYA, 2002; SPIEKERMANN, LANDMESSER, DIKALOV, BREDT, GAMEZ, TATGE, REEPSCHLAGER, HORNIG, DREXLER & HARRISON, 2003), ao passo que o sedentarismo pode deprimir estas respostas (SUVORAVA, LAUER & KOJDA, 2004).

Essa melhora da resposta vasomotora decorrente do treinamento físico parece estar relacionada ao aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico (LEWIS, DART, CHIN-DUSTING & KINGWELL, 1999; SUVORAVA et al., 2004), que ocorre em função da maior expressão e atividade da enzima óxido nítrico sintase endotelial (HAMBRECHT et al., 2003; SHEN, ZHANG, ZHAO, WOLIN, SESSA & HINTZE, 1995; WOODMAN, MULLER, LAUGHLIN & PRICE, 1997) e das diferentes isoformas da enzima superóxido dismutase (FUKAI, SIEGFRIED, FUKAI, CHENG, KOJDA & HARRISON, 2000; RUSH, TURK & LAUGHLIN, 2003; YOUNG, KNIGHT, VICKERS, WESTBROOK, MADAMANCHI, RUNGE, ISCHIROPOULOS & BALLINGER, 2005), garantindo sua síntese aumentada e inativação diminuída.

Porém, a redução da produção de espécies reativas de oxigênio também deve ser outro fator apontado, já que ADAMS, LINKE, KRANKEL, ERBS, GIELEN, MOBIUS-WINKLER, GUMMERT, MOHR, SCHULER e HAMBRECHT (2005) demonstraram que o treinamento físico aeróbio foi capaz de reduzir a expressão de subunidades da NAD(P)H oxidase (gp91 phox e p22phox), enzima que corresponde à principal fonte geradora dessas espécies reativas nos vasos (CAI, GRIENDLING & HARRISON, 2003).

Assim, apesar de os mecanismos ainda não estarem completamente estabelecidos, já existe um consenso na literatura quanto ao efeito benéfico do treinamento físico aeróbio na resposta vasomotora.

Considerando que este efeito crônico se dá pela soma das alterações hemodinâmicas que ocorrem durante a execução das sessões do treino, é extremamente importante conhecer os efeitos agudos do exercício físico aeróbio na função vasomotora, assim como as principais vias envolvidas nesta resposta, os quais podem acarretar neste efeito crônico benéfico.

2.3 Efeito agudo do exercício físico na resposta vasomotora arterial

O exercício físico aeróbio é caracterizado por promover alterações expressivas na demanda metabólica. Para que essa demanda seja então suprida, o organismo responde com algumas alterações hemodinâmicas promovendo um maior fluxo sanguíneo para os músculos em atividade, o que acarreta em um maior estresse de cisalhamento na parede dos vasos (DELP & LAUGHLIN, 1998).

Evidências na literatura demonstram que o estresse de cisalhamento aumenta significativamente durante o exercício dinâmico acompanhado pelo aumento no débito cardíaco (CHENG, HERFKENS & TAYLOR, 2003). Este aumento do estímulo mecânico pode estimular a produção endotelial de óxido nítrico pelo aumento da atividade e/ou expressão gênica da enzima responsável por sua síntese, a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (HARRISON et al., 2006).

Por outro lado, o aumento do estresse de cisalhamento também é capaz de estimular a NAD(P)H oxidase a liberar espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido, modulando assim a biodisponibilidade de óxido nítrico (DUERRSCHMIDT et al., 2006; LAURINDO et al., 1994).

Assim, este aumento paralelo da produção de óxido nítrico e ânions superóxido sob estímulo do estresse de cisalhamento gerado pelo exercício físico pode provocar alterações agudas no comportamento vasomotor arterial.

Alguns estudos experimentais demonstram que após uma sessão de exercício físico aeróbio ocorre melhora da resposta vasodilatadora dependente do endotélio em artérias isoladas através de estímulo farmacológico com acetilcolina (CHENG, YANG, HSU, LIN, JEN & CHEN, 1999; JEN, CHAN & CHEN, 2002; TANAKA, BECHARA, BARTHOLOMEU, DEBBAS, SANTOS, LAURINDO & RAMIRES, 2005). Acredita-se que esta resposta está diretamente relacionada a uma aumentada biodisponibilidade de óxido nítrico no vaso.

Em relação à resposta vasoconstritora ao agonista adrenérgico noradrenalina, evidências apontam que após uma única sessão de exercício físico ocorre atenuação desta resposta (IZAWA, MORIKAWA, INOUE, MIZUTA, YAMASHITA, OHNO & KOMABAYASHI, 1995; RUBLE, VALIC, BUCKWALTER,

TSCHAKOVSKY & CLIFFORD, 2002), sendo que outros estudos não encontram esta atenuação (DeLOREY, HAMANN, VALIC, KLUSS, CLIFFORD & BUCKWALTER, 2007) ou só a observam após algumas semanas de treinamento (OLTMAN et al., 1992; SPIER et al., 1999). Outros ainda demonstram um aumento da vasoconstrição a este agonista constritor após sete dias consecutivos de treinamento (McALLISTER & LAUGHLIN, 1997).

Assim, ainda não há um consenso sobre qual o efeito do exercício físico agudo na resposta vasoconstritora à noradrenalina. Além disso, os mecanismos envolvidos nessa possível resposta ainda não estão bem elucidados.

Como a noradrenalina é um agonista adrenérgico não seletivo, ela age no vaso sanguíneo tanto em receptores α_1 -adrenérgicos presentes no músculo liso, gerando vasoconstrição, quanto em α_2 -adrenérgicos endoteliais, estimulando a liberação do vasodilatador óxido nítrico, podendo modular de forma negativa esta resposta contrátil (VANDIER, LE GUENNEC & BEDFER, 2002).

Assim, um possível mecanismo que pode atenuar a resposta vasoconstritora após uma sessão de exercício aeróbio refere-se ao aumento da expressão (upregulation) de receptores α_2 -adrenérgicos endoteliais, como foi observado por CHENG et al. (1999).

No entanto, também foi observado após exercício aeróbio atenuação da resposta vasoconstritora à fenilefrina, um agonista seletivo para receptores α_1 -adrenérgicos (HOWARD et al., 1992), com importante participação do óxido nítrico na modulação desta resposta (PATIL, DICARLO & COLLINS, 1993), mostrando não haver apenas participação dos receptores α_2 -adrenérgicos nesta atenuação.

Em relação ao óxido nítrico, ALLEN, COBB, KRAUS e GOW (2006) demonstraram que após uma sessão de exercício físico aeróbio ocorre aumento da biodisponibilidade basal deste vasodilatador, que também foi evidenciado por nosso grupo (BECHARA, TANAKA, ZANCHI, BARTHOLOMEU, SILVA, BRANDIZZI, LAURINDO & RAMIRES, 2005), assumindo assim um importante papel na modulação das respostas vasomotoras após a sessão de exercício (ENDO, IMAIZUMI, TAGAWA, SHIRAMOTO, ANDO & TAKESHITA, 1994; GILLIGAN, PANZA, KILCOYNE, WACLAWIW, CASINO & QUYYUMI, 1994).

Com isso, outros candidatos a serem moduladores desta resposta atenuada à noradrenalina pode ser a redução da expressão (downregulation) ou sensibilidade dos receptores α_1 -adrenérgicos, ou a maior biodisponibilidade basal de óxido nítrico produzido pelo endotélio vascular.

Dentre estes mecanismos citados, acreditamos ser a aumentada biodisponibilidade de óxido nítrico basal após estresse de cisalhamento do exercício físico o principal responsável pela possível atenuação da resposta contrátil à noradrenalina após uma sessão de exercício aeróbio, já que nosso grupo observou que esta alteração na resposta vasoconstritora deixa de ocorrer na ausência do endotélio vascular (BORGES, BECHARA, TANAKA, JORDÃO, SANTOS, BARTHOLOMEU & RAMIRES, 2007).

Além disso, acreditamos existir grande participação das vias de sinalização redox, envolvendo espécies reativas de oxigênio e sistema antioxidante, no aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico após uma sessão de exercício físico aeróbio.

3 OBJETIVOS

3.1 Gerais

O objetivo do presente estudo foi avaliar, em aorta de ratos, o efeito de uma sessão de exercício físico aeróbio nas respostas vasomotoras aos agonistas constritores noradrenalina e cloreto de potássio, e verificar a participação dos sistemas de síntese e remoção de óxido nítrico nesta resposta.

3.2 Específicos

Avaliar em aorta de ratos submetidos a uma sessão de exercício físico aeróbio e que permaneceram em repouso:

- o efeito constritor máximo e a sensibilidade ao agonista noradrenalina e ao cloreto de potássio;
- a participação do endotélio vascular na resposta vasoconstritora à noradrenalina e ao cloreto de potássio;
- a participação do óxido nítrico na resposta vasoconstritora à noradrenalina e ao cloreto de potássio;
- a biodisponibilidade basal de óxido nítrico vascular;
- os níveis vasculares de espécies reativas de oxigênio;
- a atividade do complexo enzimático pró-oxidante NAD(P)H oxidase;
- a atividade total da enzima antioxidante superóxido dismutase.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostra e manipulação dos animais

Foram estudados 28 ratos machos (Wistar) 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 (nº2006/34) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo.

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

4.2 Esquema experimental

Todos os ratos foram adaptados à esteira rolante durante um período de uma semana (10 min./dia, 5 m/min) e distribuídos aleatoriamente em dois grupos: grupo controle (CTR, n=14) e grupo exercício (EX, n=14). O QUADRO 1 apresenta a seqüência de protocolos experimentais utilizados, os quais estão descritos a seguir.

QUADRO 1 - Seqüência Experimental

Adaptação à esteira	Teste Esforço Máximo	Intervalo	Exercício/ Repouso	Sacrifício	Reatividade vascular
1 semana	1 dia	48 h	60 min	imediate	

4.3 Protocolo de esforço máximo

Após a semana de adaptação à esteira, os ratos foram submetidos a um teste progressivo de esforço máximo, com incremento de carga de 5m/min a cada 5 min, até a exaustão, para a obtenção da velocidade máxima individual, conforme protocolo descrito por (BROOKS & WHITE, 1978).

4.4 Protocolo de exercício físico

Quarenta e oito horas após o teste de esforço máximo, os ratos do grupo EX realizaram uma sessão de exercício físico aeróbio, em esteira rolante, durante 60 min., em uma intensidade correspondente a aproximadamente 60% da velocidade máxima individual, enquanto os ratos do grupo CTR permaneceram em repouso.

4.5 Remoção e preparação da aorta

Imediatamente após o exercício, ou repouso, os ratos de ambos os grupos foram sacrificados em uma câmara conectada a um cilindro de gás contendo alta concentração de dióxido de carbono.

A aorta torácica foi imediatamente retirada e dissecada em uma placa de petri contendo tampão Krebs-Henseleit (em mM: NaCl=115; KCl=4,7; MgSO₄=1,2; KH₂PO₄=1,5; NaHCO₃=25; CaCl₂ =2,5; glicose=11,1 e pH=7,4) para a remoção dos tecidos conectivo e adiposo, e cortada em 6 segmentos de 4 mm de comprimento. Os mesmos foram distribuídos da seguinte maneira: 2 anéis para análise da reatividade vascular, sendo que em um dos anéis foi retirado o endotélio pelo método de raspagem (8 animais de cada grupo) e o outro anel permaneceu com o endotélio íntegro, 1 anel para quantificação de nitrato, nitrito e da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e os demais anéis para quantificação de espécies reativas de oxigênio (incluindo atividade da NAD(P)H oxidase e SOD).

A preparação da aorta está esquematizada na FIGURA 3.

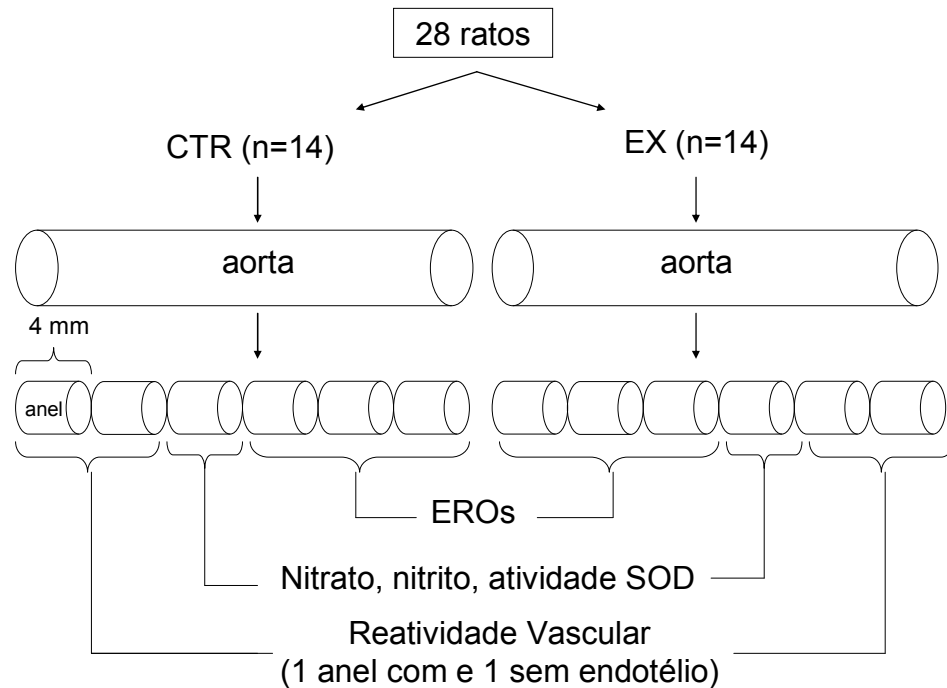


FIGURA 3 - Esquema da remoção e preparação da aorta torácica.

4.6 Estudo da reatividade vascular

Com a finalidade de se medir *in vitro* as respostas de tensão isométrica desenvolvida pelos anéis aórticos frente aos agonistas utilizados no protocolo, estes foram suspensos, através de um par de ganchos de aço inoxidável, em uma cuba de vidro para órgão isolado contendo 14 mL de solução Krebs-Henseleit (descrito anteriormente), mantidos a 37°C e aerados com uma mistura gasosa de 95% O₂ e 5% CO₂ (carbogênio).

Um gancho foi fixado na parte inferior da cuba enquanto o outro gancho foi conectado a um transdutor de sinal isométrico (BIOPAC, EUA), acoplado a um computador para o registro da tensão isométrica desenvolvida pelo vaso.

Os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de 2 gramas, e mantidos nesta tensão durante 60 minutos para que ocorresse a estabilização decorrente do manuseio. Durante o período de estabilização foi feita a

troca da solução Krebs a cada 20 minutos, com a finalidade de remover eventuais metabólitos liberados no meio.

Este processo inicial foi realizado em todos os vasos, porém dois protocolos de reatividade vascular foram utilizados neste estudo: um para avaliar a participação do endotélio nas respostas vasomotoras (PROTOCOLO 1, n=8); e outro para avaliar a participação do óxido nítrico nestas (PROTOCOLO 2, n=6). Vale ressaltar que em ambos os protocolos foram realizados em paralelo os mesmos procedimentos nos vasos íntegros (n=14).

A seguir, serão descritos em detalhes os protocolos realizados.

4.6.1 PROTOCOLO 1

Este protocolo foi realizado com a finalidade de avaliar as repostas vasoconstritoras na presença e ausência do endotélio vascular.

4.6.1.1 Teste de integridade endotelial

Após o período de estabilização foi realizado um protocolo clássico para avaliar a integridade endotelial, onde se adicionou acetilcolina (ACh, 10^{-5} M), um vasodilatador dependente do endotélio, nos anéis pré-contraídos com noradrenalina (NE, 10^{-7} M). Este processo foi realizado para verificar se a remoção do endotélio dos anéis foi realmente efetiva.

4.6.1.2 Resposta vasoconstritora à noradrenalina

Após este teste de integridade, foi realizada novamente a troca da solução Krebs e depois de 20 minutos foram realizadas as curvas concentração-efeito cumulativas ao agente vasoconstritor noradrenalina (NE; 10^{-10} a 10^{-4} M) tanto nos anéis íntegros quanto nos anéis com o endotélio vascular removido.

4.6.1.3 Resposta vasoconstritora ao cloreto de potássio

No final do Protocolo 1, foi realizada a curva concentração-efeito com doses cumulativas de cloreto de potássio (KCl, 10mM a 120 mM), que gera contração muscular lisa por alterar o potencial eletroquímico da membrana, sendo um mecanismo independente de receptores adrenérgicos.

A FIGURA 4 apresenta um esquema do PROTOCOLO 1 da reatividade vascular.

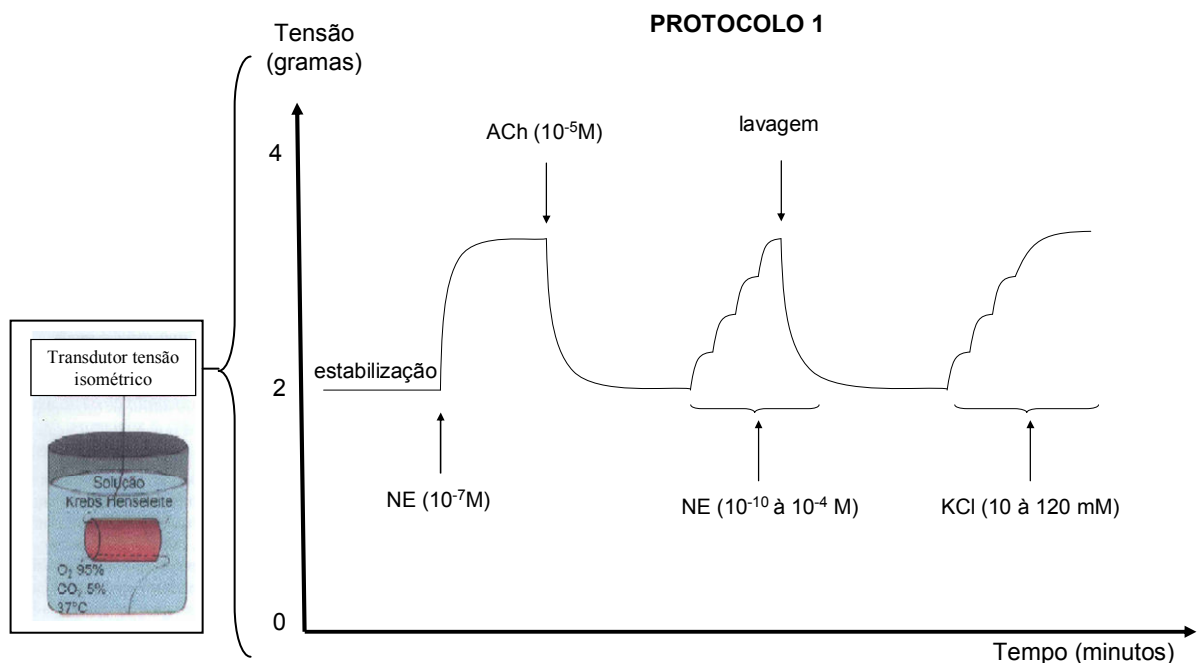


FIGURA 4 - Esquema do PROTOCOLO 1 de reatividade vascular. Um anel de cada rato com o endotélio íntegro e o outro com o endotélio removido.

4.6.2 PROTOCOLO 2

Este protocolo foi realizado com a finalidade de avaliar a participação do óxido nítrico na resposta vasoconstritora dependente e independente de receptores adrenérgicos.

Neste protocolo não houve a necessidade de realizar o teste de integridade endotelial, já que o endotélio não foi removido.

4.6.2.1 Resposta vasoconstritora à noradrenalina na presença de L-NAME

Para avaliar a participação do óxido nítrico em modular a resposta vasoconstritora à NE, após a estabilização, os anéis aórticos foram pré-incubados por 30 minutos com N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10^{-4} M), um análogo ao substrato da eNOS, a L-arginina, e após este tempo foi realizada a curva concentração-efeito à NE (10^{-10} a 10^{-4} M) na presença deste inibidor da síntese de NO.

4.6.2.2 Resposta vasoconstritora ao cloreto de potássio na presença de L-NAME

Após troca da solução de Krebs, novamente foi adicionado L-NAME nas cubas e foi realizada a curva concentração-efeito com doses cumulativas de cloreto de potássio (KCl, 10mM a 120 mM), com a finalidade de avaliar a participação do óxido nítrico na resposta independente de receptor.

A FIGURA 5 apresenta um esquema do PROTOCOLO 2 da reatividade vascular.

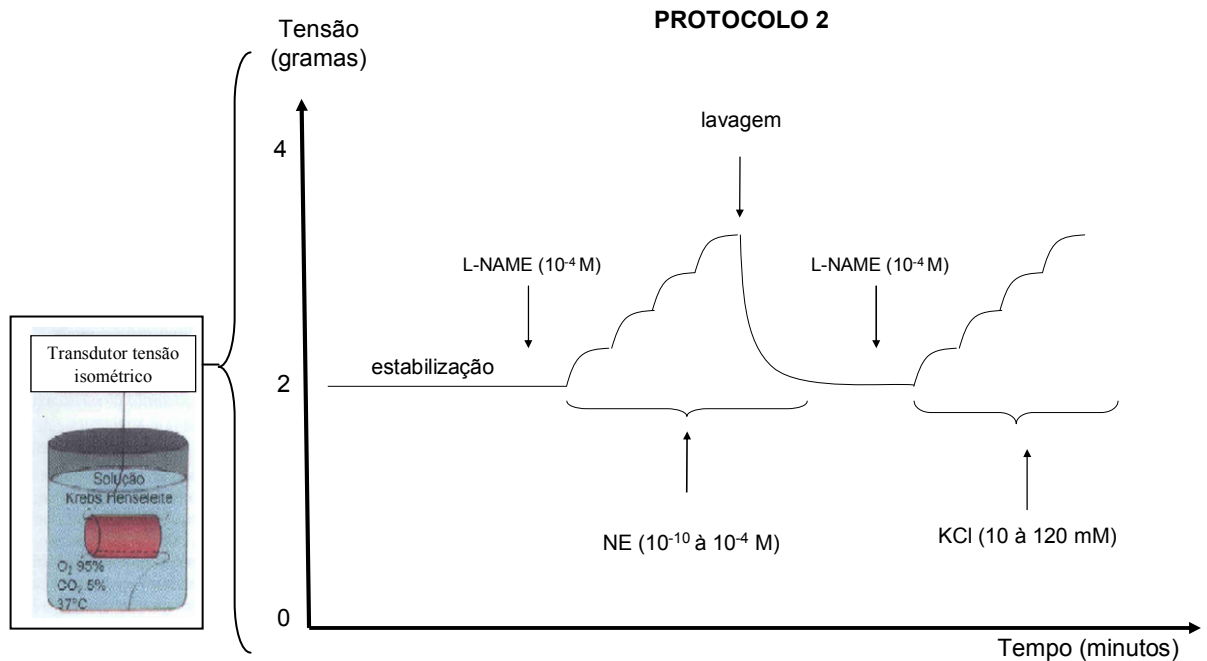


FIGURA 5 - Esquema do PROTOCOLO 2 de reatividade vascular. Um anel de cada rato pré-incubado com L-NAME e o outro sem incubação.

4.6.3 Variáveis avaliadas na reatividade vascular

Para cada curva concentração-efeito foi avaliado, através da análise de regressão não-linear para curvas sigmóides (GraphPad Prism Software, San Diego, CA), o efeito máximo (Emax) frente aos agonistas constritores (responsividade), bem como a concentração molar dos agonistas que gera um efeito igual a 50% da resposta máxima (EC₅₀) do agonista (sensibilidade).

4.7 Concentração de proteína

Os anéis aórticos congelados para análises bioquímicas foram inicialmente incubados em tampão contendo Tris-HCl 50 mM, mercaptoetanol 0,1% 1mM, DTPA 0,01 mM; temperatura 4° C; pH 7,4, e então homogeneizado com pestilo sob nitrogênio líquido. O homogeneizado foi centrifugado a 5.000 rpm em

temperatura de 4°C, durante 5 minutos. O sobrenadante foi separado para a análise da concentração de proteína pela técnica descrita por BRADFORD (1976), utilizando-se a albumina bovina como padrão.

4.8 Quantificação de nitrato e nitrito vascular

Para verificar a biodisponibilidade vascular de óxido nítrico, foram determinadas, por quimioluminescência no analisador de NO[•] (Sievers, modelo NOA 280, EUA), as concentrações de nitrato e nitrito, produtos do metabolismo do NO, nos homogenatos das artérias dos grupos CTR e EX conforme descrito em LEITE, DANILOVIC, MORIEL, DANTAS, MARKLUND, DANTAS e LAURINDO (2003). Este método requer a redução de nitrato e nitrito para óxido nítrico por meio da reação do cloreto de vanádio (VnCl₄) em ácido clorídrico a 95° C. O óxido nítrico gerado é carregado por N₂, 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 padrão externo (nitrato de sódio-Aldrich), utilizando-se um programa específico (Sievers versão 2.2, EUA). Amostras de homogenatos totais de artérias (10ul) foram analisadas. Os valores medidos de nitrato e nitrito foram corrigidos pela quantidade total de proteínas dos homogenatos (método Bradford).

4.9 Medidas de espécies reativas de oxigênio

Devido às dificuldades de se caracterizar precisamente a produção ou biodisponibilidade de EROs (TARPEY e FRIDOVICH, 2001) , dois métodos distintos foram realizados para verificar a diferença entre os grupos CTR e EX. Um método quantitativo, utilizando a Lucigenina como marcador, e o outro qualitativo, utilizando o Hidroetídio (DHE) como marcador.

4.9.1 Método quantitativo - lucigenina

Dois anéis de 4 mm de comprimento foram incubados por 30 minutos para estabilização em tampão Krebs-HEPES (pH 7,4), 37°C com 95%O₂/5%CO₂. Um anel foi separado para pré-incubação com o ácido dietilcarbâmico (DETC, 1mM), com o intuito de inibir a enzima SOD e o outro mantido como controle. Os mesmos foram transferidos para tubos de cintilação contendo 1ml do tampão e lucigenina 5µM, conforme descrito por JANISZEWSKI, SOUZA, LIU, PEDRO, ZWEIER e LAURINDO (2002). Após a contagem basal, foi adicionado difeniliodonio (DPI, 20 mM), um inibidor da NADP(H) oxidase e a contagem luminescente foi medida em luminômetro (Berthold 9505, EG&G Instruments GmbH, Munich, Germany) a 37°C. O sinal basal do segmento controle foi subtraído do sinal gerado pelo anel incubado com DETC e a luminescência gerada pela adição do DPI subtraída da medida basal. Os resultados foram normalizados pelo peso seco dos segmentos aórticos e expresso como cpm/min/mg.

4.9.2 Método qualitativo - hidroetídio (DHE)

Primeiramente, um anel aórtico de cada animal foi emblocado em gel de congelamento (OCT), para posterior corte de 30µm em criostato.

As lâminas com os cortes foram incubadas com o DHE (5 µM) por 20 minutos a 37 °C em ambiente úmido e protegido de luminosidade. Após o período de incubação, as lâminas foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 e a análise feita em microscópio de fluorescência, conforme método adaptado de Miller et al. (1998).

Os derivados de oxidação da DHE geram uma coloração avermelhada, sendo proporcional à produção de espécies reativas de oxigênio.

Como controle negativo bem como especificação 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 Atividade máxima da enzima superóxido dismutase

A atividade máxima enzima antioxidante SOD (todas as isoformas) foi determinada nos anéis aórticos conforme descrito por INOUE, RAMASAMY, FUKAI, NEREM e HARRISON (1996). No espectrofotômetro (modelo U-2001; HITACHI, Japão) foi monitorada a taxa de redução do citocromo-c induzida pelo superóxido gerado pela xantina oxidase (pH 7,4; temperatura ambiente; leitura 550 nm).

Uma unidade de atividade da SOD é definida como 50% de inibição da absorbância em 550nm, correspondente ao citocromo c reduzido. Os resultados foram normalizados para as concentrações de proteínas dos homogenatos (método Bradford).

4.11 Análise estatística

Os dados foram estatisticamente avaliados utilizando-se o programa GraphPad Prism (v. 4.00, San Diego, CA). As curvas concentração-efeito foram individualmente submetidas à análise de regressão não-linear, e as diferenças entre os grupos na reatividade vascular foram avaliadas pela análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. As variáveis dependentes: massa corporal, Vel.Máx., respostas vasomotoras (Emax e EC₅₀) e dados bioquímicos aórticos (atividades enzimáticas, concentrações de nitrato, nitrito e de EROs) foram submetidas a teste t-Student para dados não pareados (CTR x EX). O nível crítico de significância estatística foi de 5% (P<0,05). Os dados foram apresentados como média ± erro padrão da média.

5 RESULTADOS

Neste tópico, apresentaremos os resultados obtidos neste estudo utilizando, conforme descrito anteriormente, 28 ratos machos, distribuídos aleatoriamente em dois grupos: grupo controle (CTR, n=14) e grupo exercício (EX, n=14), onde os animais de ambos os grupos foram submetidos aos seus respectivos protocolos descritos no tópico MATERIAL E MÉTODOS.

5.1 Caracterização dos grupos

A massa corporal e a capacidade física máxima dos ratos foram avaliadas com a finalidade de verificar possíveis diferenças entre os grupos no início dos protocolos.

Conforme demonstrado na FIGURA 6, não observamos diferença estatística entre os grupos na variável massa corporal total. O Grupo controle apresentou massa corporal de $348,0 \pm 10,1$ gramas no início dos experimentos, enquanto o grupo exercício apresentou $350,5 \pm 11,6$ gramas no mesmo período.

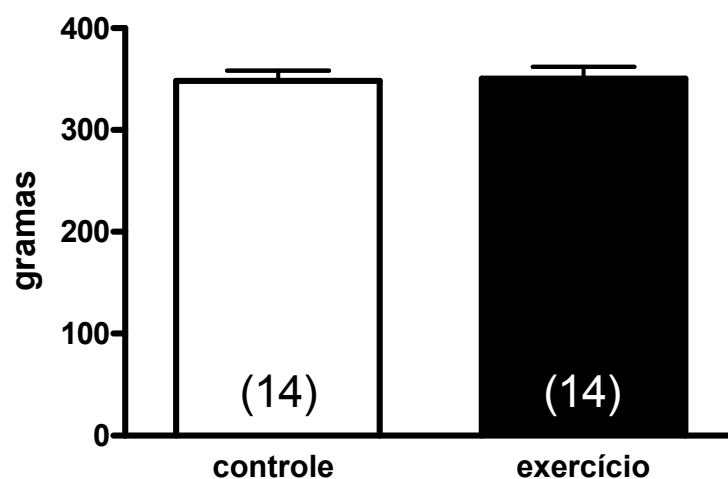


FIGURA 6 – Massa corporal total dos grupos controle e exercício no início dos experimentos. O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses.

A FIGURA 7 apresenta a média das velocidades máximas individuais atingidas pelos animais do grupo controle e exercício. Não foram observadas diferenças entre os grupos controle ($26,8 \pm 1,0$ m/min) e exercício ($27,1 \pm 1,1$ m/min).

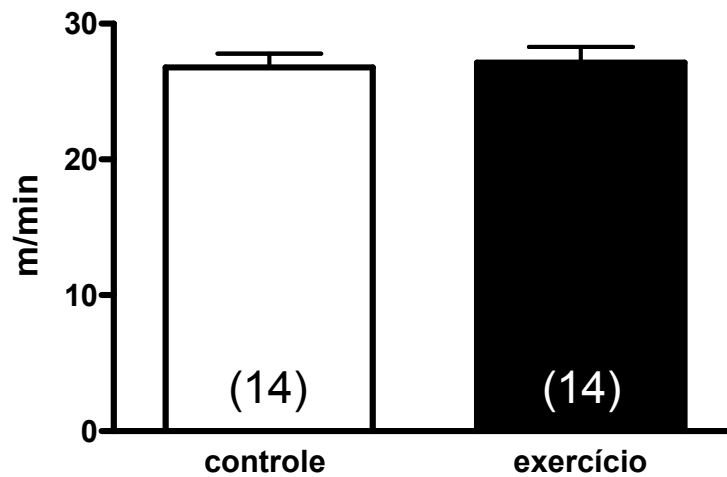


FIGURA 7 – Média das velocidades máximas individuais atingidas pelos animais dos grupos controle e exercício no início dos experimentos. O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses.

5.2 Reatividade vascular

Os protocolos de reatividade vascular foram realizados conforme descrito no tópico MATERIAL E MÉTODOS.

A FIGURA 8 apresenta a curva concentração-efeito ao agonista vasoconstritor noradrenalina realizada em anéis aórticos de ambos os grupos. Verificamos que o grupo exercício apresentou atenuação da resposta vasoconstritora a este agonista nas concentrações de $10^{-6,5}$ a 10^{-4} M quando comparado ao grupo controle.

Conforme demonstrado na TABELA 1, o efeito constritor máximo (E_{max}) foi significativamente menor no grupo exercício comparado ao grupo controle. No entanto, a sensibilidade ao agonista (EC_{50}) permaneceu semelhante.

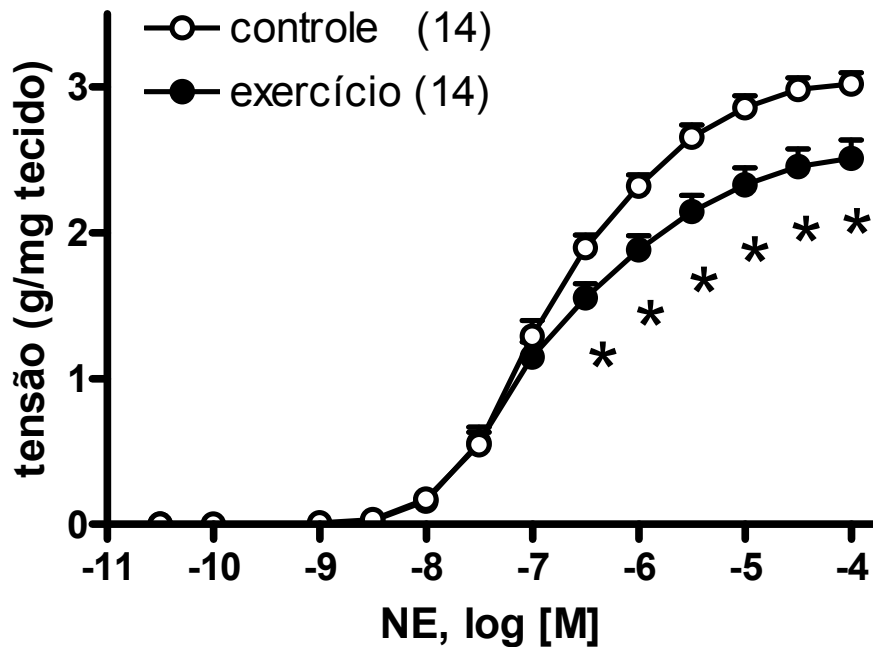


FIGURA 8 - Curva concentração-efeito à noradrenalina nos anéis aórticos dos grupos controle e exercício. O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses. * p<0,05 vs. controle

TABELA 1 – Efeito máximo (Emax) e sensibilidade (EC₅₀) do agonista constritor noradrenalina nos anéis aórticos dos grupos controle e exercício.

	CONTROLE	EXERCÍCIO
Emax (g/mg tecido)	3,02±0,07	2,51±0,12 *
EC₅₀ (log [M])	-6,79±0,04	-6,82±0,63

* p<0,05 vs. controle

Em relação à resposta vasoconstritora ao cloreto de potássio, independente de receptores adrenérgicos, podemos observar na FIGURA 9 que o grupo exercício também apresentou atenuação no desenvolvimento de tensão nas concentrações de 40 a 100 mM quando comparado ao grupo controle.

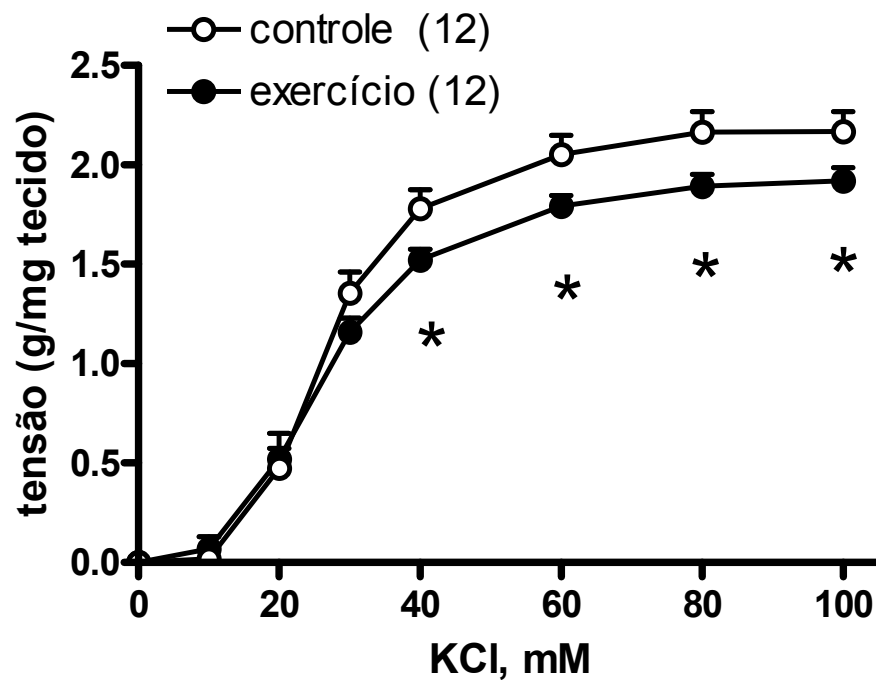


FIGURA 9 - Curva concentração-efeito ao cloreto de potássio nos anéis aórticos dos grupos controle e exercício. O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses. * $p < 0,05$ vs. controle.

Os valores de E_{max} também foram menores no grupo exercício quando comparado ao grupo controle, porém a EC_{50} não foi diferente entre os grupos (TABELA 2).

TABELA 2 – Efeito máximo (Emax) e sensibilidade (EC₅₀) ao cloreto de potássio nos anéis aórticos dos grupos controle e exercício.

	CONTROLE	EXERCÍCIO
Emax (g/mg tecido)	2,17±0,10	1,92±0,07 *
EC₅₀ (mM)	26,70±1,16	26,11±1,40

* p<0,05 vs. controle

Para avaliar a participação do endotélio vascular nesta atenuação de resposta, foi realizado o mesmo protocolo anterior, porém em anéis aórticos com a camada endotelial removida.

A FIGURA 10 apresenta a curva concentração-efeito ao agonista vasoconstritor noradrenalina em vasos sem endotélio de ambos os grupos estudados. Podemos observar que na ausência do endotélio vascular, a diferença na resposta vasoconstritora entre os grupos deixou de ser observada, demonstrando a importância desta camada na atenuação anteriormente demonstrada.

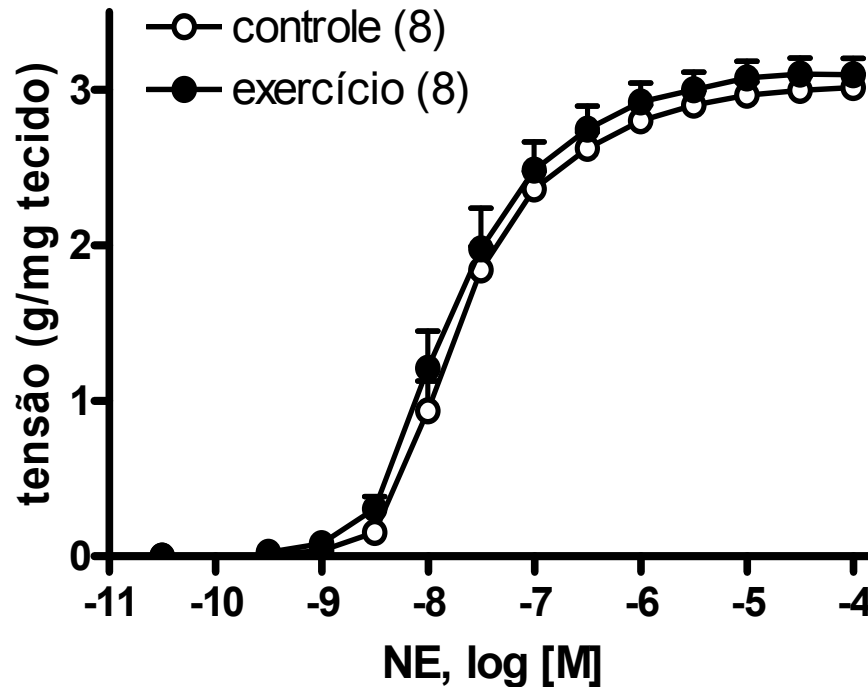


FIGURA 10 - Curva concentração-efeito à noradrenalina nos anéis aórticos sem endotélio vascular dos grupos controle e exercício. O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses.

Tanto os valores de E_{max} quanto os de EC_{50} foram semelhantes entre os grupos nos anéis aórticos com o endotélio vascular removido (TABELA 3).

TABELA 3 - Efeito máximo (E_{max}) e sensibilidade (EC_{50}) do agonista constritor noradrenalina nos anéis aórticos sem endotélio dos grupos controle e exercício.

	CONTROLE	EXERCÍCIO
E_{max} (g/mg tecido)	3,06±0,09	3,09±0,11
EC_{50} (log [M])	-7,67±0,05	-7,72±0,06

A remoção do endotélio vascular também foi capaz de abolir a diferença na resposta vasoconstritora ao KCl entre os grupos, a qual foi observada nos vasos íntegros, demonstrando a importância desta camada na atenuação da resposta vasoconstritora independente de receptores (FIGURA 11).

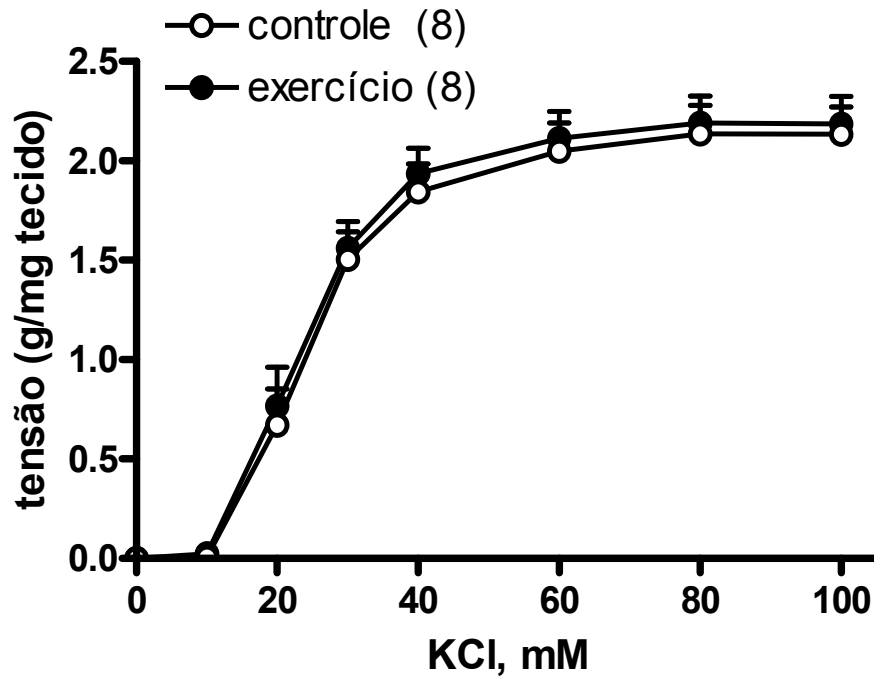


FIGURA 11 - Curva concentração-efeito ao cloreto de potássio nos anéis aórticos sem endotélio vascular dos grupos controle e exercício. O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses.

Como podemos observar na TABELA 4, nem os valores de E_{max} e nem os de EC_{50} foram diferentes entre os grupos quando os anéis aórticos sem endotélio foram submetidos à contração com cloreto de potássio.

TABELA 4 – Efeito máximo (Emax) e sensibilidade (EC₅₀) ao cloreto de potássio nos anéis aórticos sem endotélio dos grupos controle e exercício.

	CONTROLE	EXERCÍCIO
Emax (g/mg tecido)	2,14±0,14	2,19±0,14
EC₅₀ (mM)	24,08±1,68	23,40±1,66

Com o intuito de avaliar se esta participação do endotélio vascular em atenuar a resposta constritora após uma sessão de exercício estava relacionada à sua capacidade de sintetizar óxido nítrico, as curvas concentração-efeito à NE e ao KCl foram novamente realizadas nos anéis com endotélio íntegro, porém desta vez pré-incubados com L-NAME (10^{-4} M), um inibidor da síntese de NO.

Como observado na FIGURA 12, após a incubação com L-NAME, o grupo exercício não apresentou a menor resposta vasoconstritora à noradrenalina que havia sido observada nos vasos sem incubação quando comparado ao grupo controle, demonstrando haver importante participação do NO nesta resposta atenuada após uma sessão de exercício físico aeróbio.

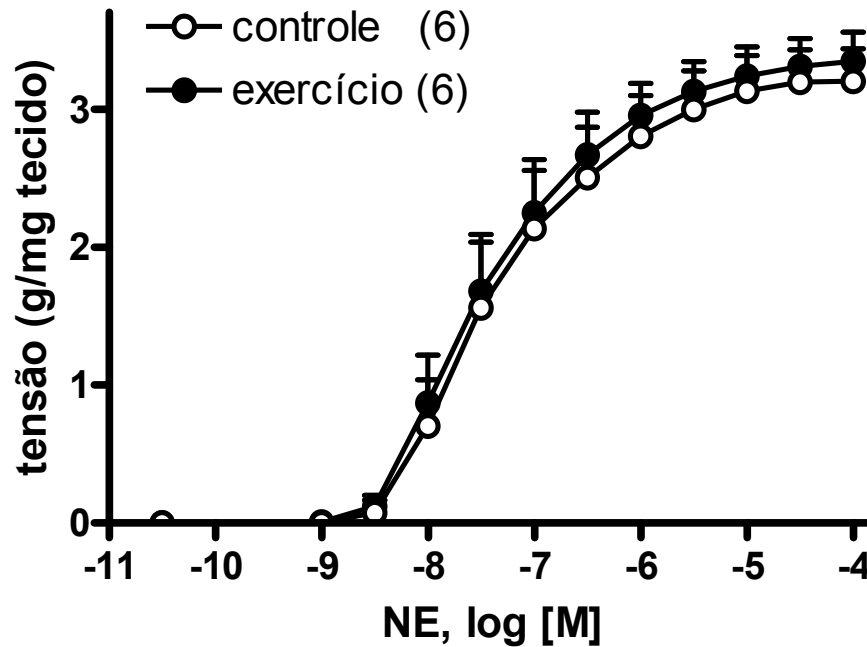


FIGURA 12 – Curva concentração-efeito à noradrenalina nos anéis aórticos dos grupos controle e exercício pré-incubados com L-NAME (10^{-4} M). O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses.

Como podemos observar na TABELA 5, tanto os valores de E_{max} quanto os de EC_{50} foram semelhantes entre os grupos nos anéis aórticos pré-incubados com L-NAME.

TABELA 5 – Efeito máximo (E_{max}) e sensibilidade (EC_{50}) à noradrenalina nos anéis aórticos dos grupos controle e exercício pré-incubados com L-NAME.

	CONTROLE	EXERCÍCIO
E_{max} (g/mg tecido)	3,21±0,24	3,34±0,21
EC_{50} (log [M])	-7,47±0,12	-7,42±0,14

Em relação à resposta vasoconstritora independente de receptores adrenérgicos na presença de L-NAME, também não observamos aquela atenuação da tensão desenvolvida pelo grupo exercício comparada ao grupo controle nos vasos íntegros submetidos a concentrações crescentes de KCl (FIGURA 13), sendo os valores de Emax e EC₅₀ semelhantes entre os grupos (TABELA 6).

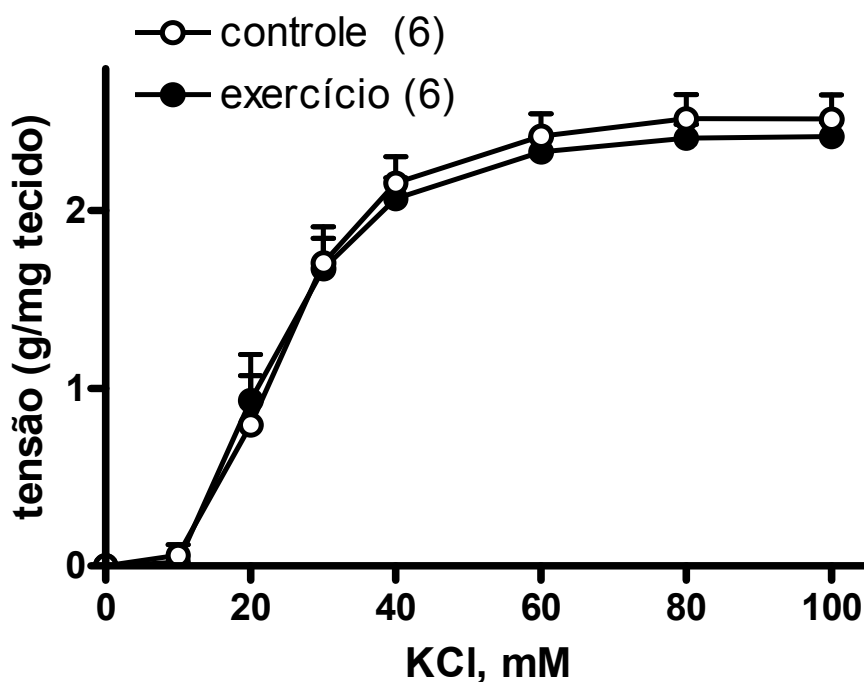


FIGURA 13 – Curva concentração-efeito ao cloreto de potássio nos anéis aórticos dos grupos controle e exercício pré-incubados com L-NAME (10⁻⁴ M). O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses.

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.

	CONTROLE	EXERCÍCIO
Emax (g/mg tecido)	2,51±0,13	2,41±0,08
EC₅₀ (mM)	24,41±1,89	22,84±1,80

5.3 Concentração de nitrato e nitrito vascular

Já que encontramos uma importante participação do óxido nítrico em atenuar a resposta vasoconstritora aórtica após uma sessão de exercício, fomos observar como estava a biodisponibilidade basal deste agente vasodilatador nos grupos controle e exercício.

A FIGURA 14 demonstra que tanto a concentração de nitrato (16,8±4,4 vs. 6,5±1,2 nmol/mg proteína) quanto de nitrito (0,17±0,04 vs. 0,06±0,02 nmol/mg proteína) em homogenatos dos vasos previamente congelados apresentam valores maiores no grupo exercício em relação ao controle.

Como nitrato e nitrito são produtos do metabolismo do NO, temos que após uma sessão de exercício físico há uma maior biodisponibilidade basal deste vasodilatador, o que pode contribuir para esta menor resposta contrátil observada nos ratos exercitados.

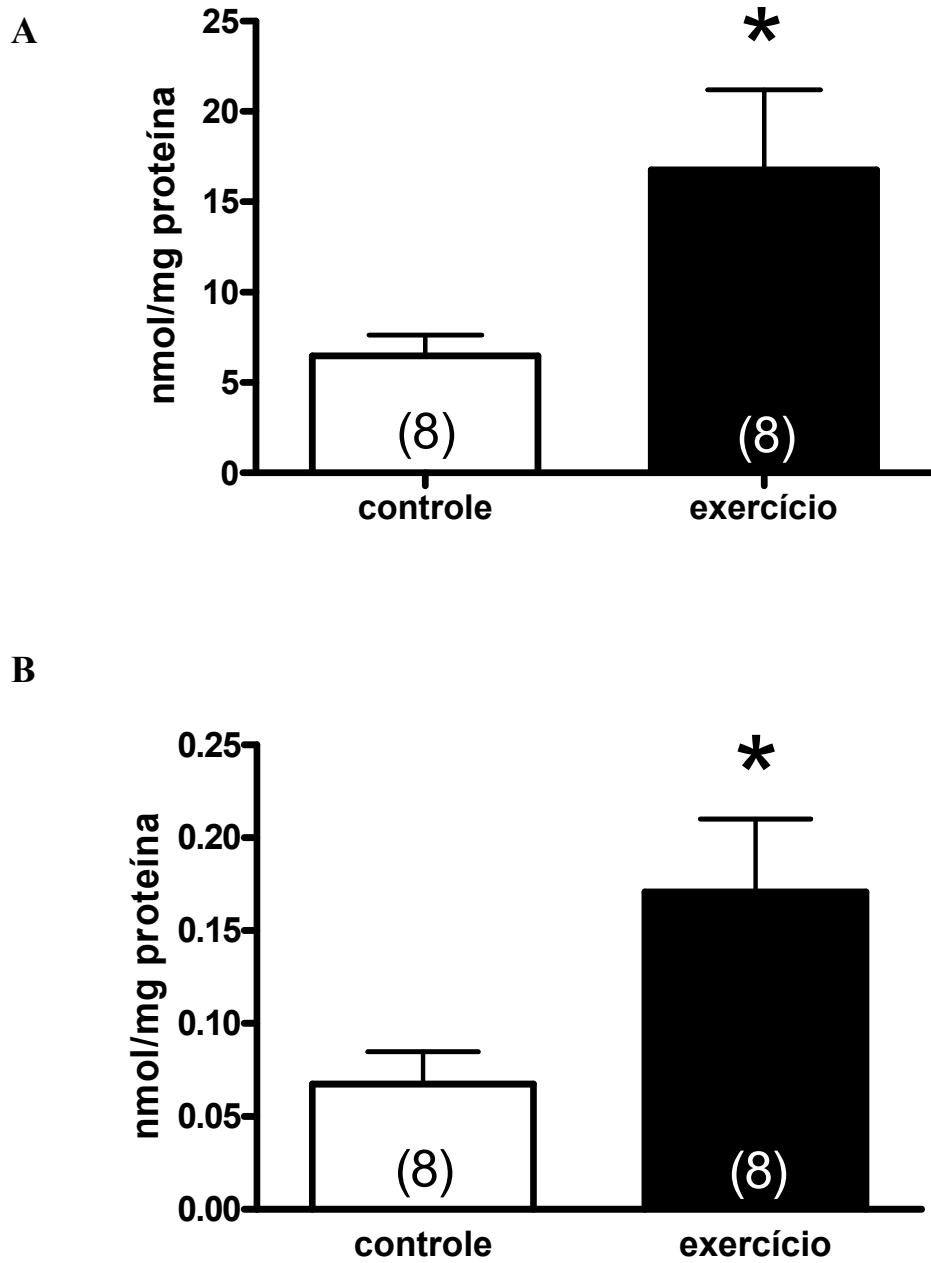


FIGURA 14 – Concentração de nitrato (A) e nitrito (B) nos homogenatos de anéis aórticos dos grupos controle e exercício. O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses. * $p < 0,05$ vs. controle.

5.4 Espécies reativas de oxigênio

Como observamos uma maior biodisponibilidade de óxido nítrico após uma sessão de exercício físico aeróbio, e sabendo que as espécies reativas de oxigênio estão envolvidas na eliminação do NO, avaliamos qualitativamente o nível de EROs em ambos os grupos estudados.

A FIGURA 15 apresenta as fotos dos cortes transversais marcando (em vermelho) os níveis de EROs de anéis aórticos de dois ratos, um do grupo controle e outro do grupo exercício. No total, foram avaliadas três lâminas de cada anel, sendo analisados 14 ratos de cada grupo.

Observamos que após uma sessão de exercício físico (grupo exercício) há maior nível de espécies reativas de oxigênio comparado ao grupo controle. A incubação da lâmina com peg-SOD (controle negativo) diminui significativamente a intensidade de coloração vermelha, o que demonstra a especificidade desta marcação para ânions superóxido.

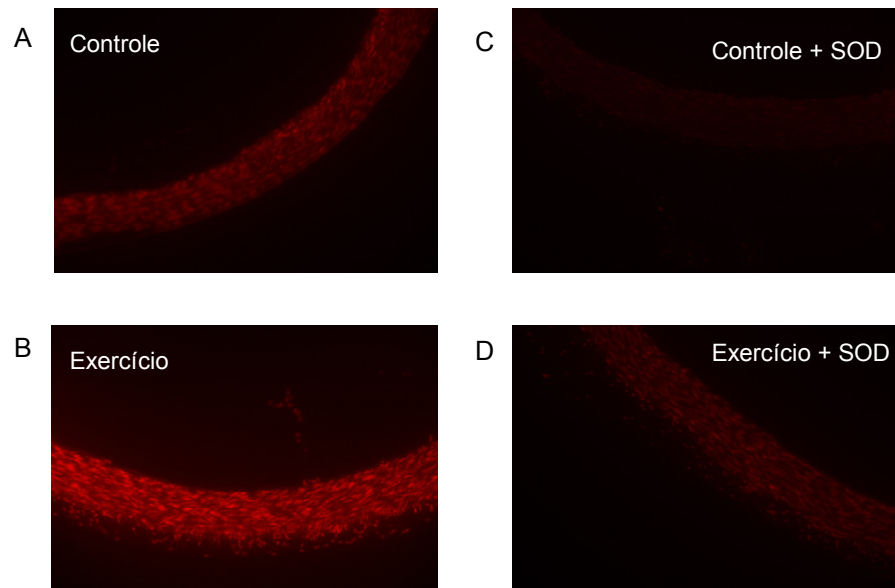


FIGURA 15 – Foto ilustrativa da marcação por EROs nos cortes de anéis aórticos de um animal do grupo controle (A) e um do exercício (B), e dos mesmos na presença de peg-SOD, respectivamente (C) e (D).

Este aumento nos níveis de superóxido após a sessão de exercício físico foi confirmado pelo método quantitativo utilizando lucigenina, apresentado na FIGURA 16. Também podemos observar aumento da atividade do complexo enzimático pró-oxidante NAD(P)H oxidase no grupo exercício comparada ao grupo controle, onde a sua inibição com DPI diminui a luminescência em uma magnitude maior que os animais que permaneceram em repouso (27% vs. 13%, respectivamente).

A atividade da enzima superóxido dismutase também foi aumentada no grupo exercício comparado ao controle, já que sua inibição com DETC aumentou a contagem de luminescência em uma magnitude maior que o grupo controle (54% vs. 31%, respectivamente).

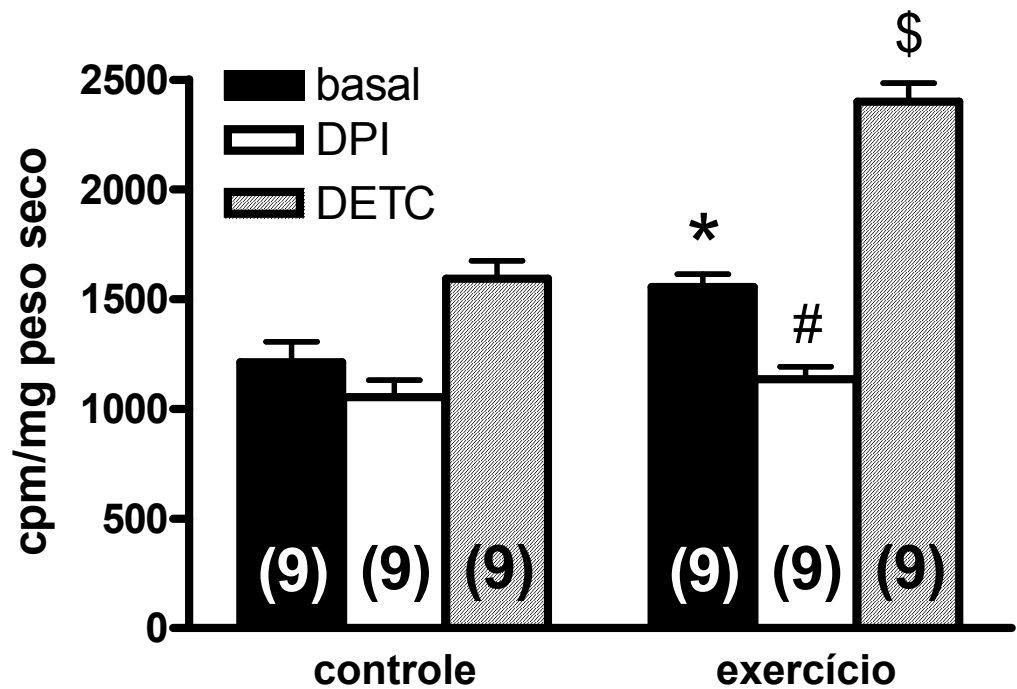


FIGURA 16 - Níveis de superóxido em homogenatos aórticos dos grupos controle e exercício no estado basal, na inibição da NAD(P)H oxidase (DPI) e na inibição da SOD (DETC). O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses.

* p<0,05 vs. controle.

p<0,05 Delta (basal-DPI) do exercício vs. controle.

\$ p<0,05 Delta (DETC-basal) do exercício vs. controle.

5.5 Atividade máxima da enzima superóxido dismutase

Um dos fatores que podem influenciar a biodisponibilidade vascular de NO é a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase. A FIGURA 17 apresenta a atividade total desta enzima em ambos os grupos estudados.

Como podemos observar, apesar de observarmos um aumento na atividade da SOD utilizando a inibição com DETC (FIGURA 16), uma única sessão

de exercício físico não foi capaz de alterar significativamente a atividade desta enzima antioxidante no grupo exercício comparado ao grupo controle pelo método de redução do citocromo-c, apesar de apresentar um considerável aumento.

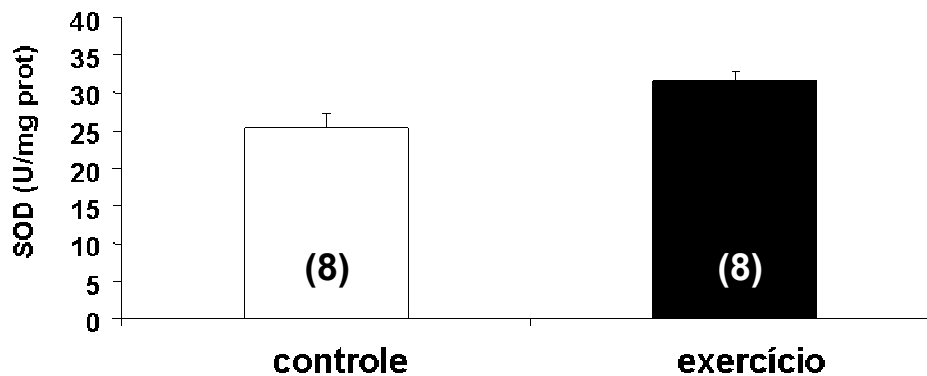


FIGURA 17 - Atividade máxima da enzima superóxido dismutase em homogenatos de anéis aórticos dos grupos controle e exercício. O número de animais por grupo está apresentado entre parênteses.

6 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que avaliou paralelamente as respostas vasoconstritoras dependente e independente de receptores adrenérgicos sob efeito de uma única sessão de exercício físico aeróbio dando enfoque a participação do potente vasodilatador dependente do endotélio, o óxido nítrico, nas respostas observadas, além de avaliar também os níveis vasculares de espécies reativas de oxigênio, que estão diretamente relacionados com a modulação da biodisponibilidade de NO.

Acreditamos que os resultados encontrados neste estudo contribuirão bastante para esclarecer, pelo menos em parte, algumas controvérsias encontradas na literatura, assim como ampliar o conhecimento dos mecanismos que podem estar envolvidos na alteração da resposta vasomotora aórtica após uma sessão de exercício físico.

Caracterização dos grupos

Como pudemos observar nos resultados, os ratos do grupo exercício e do grupo controle apresentaram valores de massa corporal total e velocidade máxima atingida no teste de esforço semelhantes no início dos protocolos experimentais, mostrando que os dois grupos estavam na mesma faixa etária bem como apresentando a mesma capacidade física máxima.

Este é um dado muito importante para fortalecer as respostas vasomotoras observadas neste estudo, já que foi demonstrado que tanto o envelhecimento (SCHRAGE, EISENACH, & JOYNER, 2007), quanto o nível de condicionamento físico (CHEN et al., 1994; KASIKCIOGLU, OFLAZ, KASIKCLIOGLU, KAYSERILIOGLU, UMMAN & MERIC, 2005), apresentam uma forte relação com alterações na vasomotricidade arterial.

Uma vez que os dois grupos apresentaram características semelhantes no início do protocolo, e além disso foram submetidos a todos os procedimentos de forma similar, com exceção da sessão de exercício físico ou repouso, podemos afirmar que os resultados encontrados neste estudo realmente ocorrem em resposta ao protocolo de exercício físico a qual os ratos foram submetidos.

Reatividade vascular

Todos os protocolos de reatividade vascular utilizados neste estudo foram elaborados para gerar vasoconstrição de maneira concentração-dependente, com a resposta atingindo o platô nas últimas concentrações adicionadas, conforme recomendado para curvas concentração-efeito.

Apesar de inúmeros estudos experimentais já demonstrarem que após uma sessão de exercício físico aeróbio ocorre melhora da resposta vasodilatadora dependente do endotélio em artérias isoladas (CHENG et al., 1999; JEN et al., 2002; TANAKA et al., 2005), controvérsias ainda são encontradas em relação ao efeito agudo do exercício físico na resposta vasoconstritora à noradrenalina.

Nossos resultados demonstram que uma única sessão de exercício físico aeróbio é capaz de atenuar a resposta vasoconstritora aórtica de ratos ao agonista vasoconstritor noradrenalina.

Esse efeito agudo do exercício físico em reduzir a vasoconstrição adrenérgica confirma alguns achados da literatura (IZAWA et al., 1996; RUBLE et al., 2002), porém confronta com outros estudos que não observaram diferenças nessa variável (DeLOREY et al., 2007; SPIER et al., 1999). Essa discrepância observada pode ocorrer devido a diferentes tipos e intensidades de exercício físico utilizado, bem como diferentes leitos vasculares e espécies animais estudadas.

Apesar desta divergência de achados em relação ao efeito agudo do exercício na vasoconstrição à noradrenalina, parece já haver um consenso em meio à ciência que um dos efeitos crônicos do exercício físico aeróbio é a atenuação da resposta vasoconstritora adrenérgica (CHEN et al., 1994; CHIES et al., 2004; McALLISTER et al., 2005; OLTMAN et al., 1992; SPIER et al., 1999). Como esta resposta adaptativa parece ser gerada pela soma dos efeitos agudos do exercício físico, acreditamos ser bem relevante a compreensão dos mecanismos envolvidos nestas respostas agudas, uma vez que podemos a partir de então, buscar ferramentas mais direcionadas para potencializar este efeito crônico benéfico.

Um possível mecanismo que poderia estar envolvido nesta menor resposta constritora à noradrenalina encontrada neste estudo é a redução da sensibilidade e/ou expressão dos receptores adrenérgicos presentes no músculo liso vascular, principalmente do subtipo α_1 , o qual é predominante na aorta torácica. De fato, alguns estudos já demonstraram uma atenuação da resposta vasoconstritora dependente de receptores α_1 -adrenérgicos, via agonista seletivo fenilefrina, após exercício físico quando comparado a animais que permaneceram em repouso (HOWARD, DICARLO & STALLONE, 1992; PATIL et al., 1993).

No entanto, nossos dados demonstram que essa atenuação contrátil após uma sessão de exercício físico deixou de ser observada em vasos que permaneceram com a camada de músculo liso íntegra, contendo ainda receptores α_1 -adrenérgicos, porém com a camada endotelial removida. Isto sugere que esta camada íntima está diretamente envolvida nesta atenuação da resposta vasoconstritora arterial após exercício.

Mesmo atribuindo este fenômeno à camada íntima, ainda não poderíamos dizer que o exercício diminuía a vasoconstrição aórtica por um mecanismo independente de receptores adrenérgicos, já que as células endoteliais apresentam em suas membranas uma importante densidade de receptores α_2 -adrenérgicos, os quais assumem a função de modular de forma negativa a contração do músculo liso vascular. De fato, CHENG et al. (1999) já demonstraram uma melhora na resposta vasodilatadora arterial após uma sessão de exercício físico aeróbio modulada por uma maior sensibilidade de receptores α_2 -adrenérgicos endoteliais.

No entanto, a resposta vasoconstritora independente de receptores adrenérgicos observada no presente estudo, estimulada por concentrações crescentes de cloreto de potássio, também foi atenuada no grupo exercício em relação aos ratos que permaneceram em repouso. Este resultado nos impossibilita afirmar que o exercício físico é capaz de diminuir a vasoconstrição à noradrenalina devido a uma menor sensibilidade de receptores α_1 -adrenérgicos e/ou maior sensibilidade de receptores α_2 -adrenérgicos.

Segundo CONVERTINO (2003), adaptações associadas com alterações na função de receptores adrenérgicos são muito dependentes do estímulo específico da intensidade, duração e frequência de exercício, sugerindo que o protocolo de exercício utilizado no presente estudo foi insuficiente para gerar estes estímulos necessários.

Vale ressaltar ainda que o endotélio vascular parece ter fundamental participação não somente na atenuação da vasoconstrição à NE como também na atenuação da vasoconstrição ao KCl, já que a diferença na resposta constritora que existia entre os grupos nos anéis íntegros deixou de existir nos anéis com o endotélio removido, quando submetidos à contração com KCl.

Este é o primeiro estudo que demonstra que a resposta vasoconstritora ao cloreto de potássio é diminuída após uma sessão de exercício físico. HOWARD et al. (1992), apesar de encontrarem atenuação da vasoconstrição aórtica induzida por fenilefrina em coelhos exercitados, encontraram apenas uma tendência de atenuação com o KCl, similar a encontrada por SPIER et al. (1999). Talvez a intensidade do exercício físico utilizada nestes dois estudos (até a exaustão) seja o principal responsável por esta discrepância.

De uma forma geral, o protocolo de exercício físico utilizada no presente estudo (~ 60% da velocidade máxima individual durante 60 minutos) foi capaz de atenuar a resposta vasoconstritora dependente e independente de receptores adrenérgicos, contando com mecanismos relacionados ao endotélio vascular.

Como sabemos que a enzima óxido nítrico sintase endotelial é sensível ao estresse de cisalhamento (HARRISON et al., 2006), o qual é mais intenso durante o exercício dinâmico acompanhado pelo aumento no débito cardíaco (CHENG et al., 2003), e que a vasoconstrição induzida por noradrenalina e por cloreto de potássio é capaz de aumentar a síntese de óxido nítrico por esta enzima (AMERINI, MANTELLI & LEDA, 1995), sugerimos que uma maior biodisponibilidade de NO poderia ser o principal responsável por estes resultados observados.

Biodisponibilidade vascular de óxido nítrico

Um resultado muito interessante encontrado neste estudo foi que a atenuação da resposta vasoconstritora após exercício, tanto à NE quanto ao KCl, deixou de ser observada nas curvas concentração-efeito desses dois vasoconstritores quando os anéis foram pré-incubados com L-NAME, um inibidor da síntese de NO, sugerindo que este potente vasodilatador está diretamente envolvido neste efeito agudo do exercício físico no controle do tônus vascular.

Outros estudos também já têm reportado o importante papel do óxido nítrico em promover alterações benéficas no controle do tônus vasomotor após uma sessão de exercício físico (ENDO et al., 1994; GILLIGAN et al., 1994), ao passo que esta resposta pode ser atribuída a uma maior biodisponibilidade vascular de NO, conforme demonstrado por ALLEN et al. (2006), e confirmado neste estudo pelo

aumento na concentração de nitrato e nitrito em homogenatos de aorta, ambos produtos do metabolismo deste vasodilatador.

Um dos principais motivos que poderiam estar relacionados a este aumento na biodisponibilidade vascular de óxido nítrico seria uma aumentada atividade da eNOS após a sessão de exercício físico aeróbio, já que este é caracterizado por aumentar tanto o estresse de cisalhamento na parede do vaso quanto os níveis de catecolaminas circulantes. Isto porque já foi observado em cultura de células endoteliais e em aorta de ratos que tanto a exposição aguda destes a um aumento do estresse de cisalhamento (CORSON, JAMES, LATTA, NEREM, BERK & HARRISON, 1996; HARRISON et al., 2006) quanto a altas concentrações de agonistas adrenérgicos (GURDAL, CAN & UGUR, 2005) é capaz de aumentar a atividade e a expressão desta enzima.

Embora não tenhamos medido diretamente a atividade da eNOS neste nosso modelo estudado, podemos deduzir que ela está aumentada após a sessão de exercício realizada, já que a sua inibição com L-NAME refletiu em aumento mais expressivo da tensão desenvolvida pelo grupo exercício comparado ao controle nas curvas concentração-efeito com NE (33% vs. 6%, respectivamente) e KCl (26% vs. 15%, respectivamente).

Com a atividade da eNOS aumentada no grupo exercício, é normal esperar que a resposta vasoconstritora esteja atenuada neste grupo, mesmo em um banho de órgãos isolados que não apresente nenhuma diferença entre os grupos no estresse de cisalhamento e nem na concentração final de vasoconstritores adicionados ao meio. Isto porque esta enzima é ativada por alterações na concentração intracelular de Ca^{+2} . Assim, quando adicionamos NE ou KCl nas cubas, estimulamos o aumento na concentração de Ca^{+2} no citosol da célula muscular lisa para gerar vasoconstrição, conseqüentemente aumentando a concentração intracelular deste cátion na célula endotelial via difusão através de gap junctions existentes entre estes dois tipos celulares (DORA et al., 1997; DORA et al., 2003; YASHIRO & DULING, 2000), o que vai repercutir em uma resposta mais acentuada ao Ca^{+2} nas células que tiverem esta enzima mais ativa.

Outros fatores que também poderiam estar relacionado a este aumento na biodisponibilidade vascular de óxido nítrico seriam mecanismos relacionados às

vias de sinalização redox, já que o ânion superóxido é um dos principais inativadores do NO, devido à grande afinidade existente entre as duas espécies reativas (DICKHOUT, HOSSAIN, POZZA, ZHOU, LHOTAK & AUSTIN, 2005)

Espécies reativas de oxigênio

Já é sabido que um dos efeitos agudos do exercício físico aeróbio é o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio em diferentes tecidos, como o coração (BEJMA, RAMIRES & JI, 2000) e os músculos esqueléticos (VASILAKI, MANSOURI, REMMEN, VAN DER MEULEN, LARKIN, RICHARDSON, MCARDLE, FAULKNER & JACKSON, 2006). No entanto, ainda não foi demonstrado na literatura o aumento de EROs em vasos arteriais após uma sessão de exercício físico.

Neste presente estudo, observamos que o grupo que foi exercitado apresentou um maior nível de espécies reativas de oxigênio, em especial o ânion superóxido, quando comparado ao grupo controle, em ambos os métodos de investigação utilizados.

Apesar de sabermos que o ânion superóxido é um dos principais moduladores da biodisponibilidade vascular de óxido nítrico, parece que o nível de produção deste radical não foi alto o suficiente para inativar a elevada produção de NO após exercício físico, já que encontramos uma maior biodisponibilidade deste vasodilatador nos vasos do grupo exercício em relação ao grupo controle, que culminou em uma menor resposta vasoconstritora à NE e ao KCl.

Além disso, apesar da associação feita ao aumento dos níveis de EROs com um efeito prejudicial, já é sabido que em níveis controlados as espécies reativas de oxigênio agem como importantes moléculas sinalizadoras celulares, ao passo que a redução dos níveis fisiológicos destas moléculas podem acarretar em efeitos deletérios (POLYTARCHOU & PAPADIMITRIOU, 2005).

O aumento que encontramos nos níveis vasculares de superóxido parece estar relacionado a uma maior atividade do complexo enzimático NAD(P)H oxidase, a qual representa a maior fonte geradora de EROs no sistema vascular (GRIENGLING, SORESCU & USHIO-FUKAI, 2000), já que sua inibição com DPI

diminuiu significativamente os níveis vasculares de superóxido do grupo exercício, chegando a valores semelhantes ao grupo controle.

Esse aumento da atividade pró-oxidante ocorreu, possivelmente, em função do aumento do estresse de cisalhamento na parede do vaso durante a execução do exercício físico, já que foi demonstrado ser este um importante ativador deste complexo enzimático em sistema isolado de células endoteliais, aumentando agudamente a produção de ânions superóxido (DUERRSCHMIDT et al., 2006; LAURINDO et al., 1994).

Além de observarmos maior atividade da NAD(P)H oxidase no grupo exercício comparado ao controle, encontramos também um aumento da atividade da SOD após a sessão de exercício físico, que foi estatisticamente significante apenas em vasos frescos pré-incubados com DETC, porém consideravelmente elevados (29%) nos homogenatos congelados.

Essa atividade da SOD aumentada com exercício físico, associada à melhora da resposta vasomotora, já têm sido demonstrada na literatura, porém apenas como uma resposta adaptativa crônica (FUKAI et al., 2000; RUSH et al., 2003; YOUNG et al., 2005).

Como a enzima superóxido dismutase é a principal removedora de ânions superóxido, este aumento de sua atividade com uma sessão de exercício físico contribui para que ocorra apenas um ligeiro e controlado aumento nos níveis de superóxido durante o exercício moderado. Associado ao fato de que o exercício físico aumenta, também, a produção de óxido nítrico, o imediato aumento da atividade da SOD pode ser fundamental para evitar uma excessiva degradação do NO pelo superóxido, e deste modo permitir que ocorra o aumento na biodisponibilidade de NO comparado ao grupo controle.

Finalmente, acreditamos que ainda precisa ser mais bem investigado qual o papel fisiológico do ligeiro aumento da produção de superóxido vascular nas adaptações vasculares benéficas ao exercício físico, uma vez que estudos demonstram que níveis elevados de superóxido estão envolvidos na disfunção vascular dependente do endotélio em diversas patologias (LANDMESSER, MERTEN, SPIEKERMANN, BUTTNER, DREXLER & HORNIG, 2000; SPIEKERMANN et al., 2003).

7 CONCLUSÃO

Os 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, sendo este aumento atribuído a uma maior síntese de NO pelo endotélio vascular associado a uma maior atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase. Além disso, o protocolo de exercício físico utilizado neste estudo também foi capaz de aumentar os níveis vasculares de ânions superóxido com importante participação do complexo enzimático NAD(P)H oxidase, porém em uma magnitude de aumento de superóxido insuficiente para diminuir a disponibilidade de óxido nítrico e tamponar seu efeito de atenuação da resposta vasoconstritora arterial.

REFERÊNCIAS

ADAMS, V.; LINKE, A.; KRANKEL, N.; ERBS, S.; GIELEN, S.; MOBIUS-WINKLER, S.; GUMMERT, J.F.; MOHR, F.W.; 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.

ALLEN, J.D.; COBB, F.R.; KRAUS, W.E.; GOW, A.J. Total nitrogen oxide following exercise testing reflects endothelial function and discriminates health status. Free Radical Biology & Medicine, v.41, n.5, p.740-47, 2006.

AMERINI, S.; MANTELLI, L.; LEDA, F. Enhancement of the vasoconstrictor response to KCl by nitric oxide synthesis inhibition: a comparison with noradrenaline. Pharmacological Research, v.31, n.3-4, p.175-81, 1995.

BECHARA, L.R.G.; TANAKA, L.Y.; ZANCHI, N.E.; BARTHOLOMEU, T.; SILVA, C.E.G.; BRANDIZZI, L.; LAURINDO, F.R.M.; RAMIRES, P.R. Exercício físico prolongado melhora a resposta vasodilatadora e aumenta a concentração de nitrato em aorta torácica de ratos [Resumo]. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 20., 2005, Águas de Lindóia. XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, Águas de Lindóia: FeSBE, 2005. p.201.

BEJMA, J.; RAMIRES, P. R.; 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.

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

BOO, Y.C.; HWANG, J.; SYKES, M.; MICHELL, B.J.; KEMP, B.E.; LUM, H.; JO, H. Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser(635) by a protein kinase A-dependent mechanism. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology, v.283, n.5, p.H1819-28, 2002.

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.

BORGES, J.P.; BECHARA, L.R.G.; TANAKA, L.Y.; JORDÃO, C.P.; SANTOS, A.M.; BARTHOLOMEU, T.; RAMIRES, P.R. Exercício aeróbio agudo aumenta biodisponibilidade de óxido nítrico e atenua vasoconstrição em aorta de ratos [Resumo]. Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, v.17, n.2, Suplemento Especial, p.196, 2007.

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.

BRAUNWALD, E. Tratado de medicina cardiovascular. 3ed. v.2, São Paulo: Editora Roca, 1991.

BROOKS, G.A.; WHITE, T.P. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. Journal of Applied Physiology, v.45, n.6, p.1009-15, 1978.

CAI, H.; GRIENDLING, K.K.; HARRISON, D.G. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. Trends in Pharmacological Sciences, v.24, p.471-78, 2003.

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

CANNON, R.O., III. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. Clinical Chemistry, v.44, p.1809-19, 1998.

CARVALHO, M.H.C.; FORTES, Z.B.; PASSAGLIA, R.C.A.T.; NIGRO, D. Funções normais do endotélio: uma visão geral. In: Endotélio e doenças cardiovasculares. da LUZ, P.L; LAURINDO, F.R.M.; CHAGAS, A.C.P. São Paulo: Atheneu, 2003.

CHEN, H.I.; LI, H.T.; CHEN, C.C. Physical conditioning decreases norepinephrine-induced vasoconstriction in rabbits. Possible roles of norepinephrine-evoked endothelium-derived relaxing factor. Circulation, v.90, n.2, p.970-5, 1994.

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.

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.

CHIES, A.B.; DE OLIVEIRA, A.M.; PEREIRA, F.C.; DE ANDRADE, C.R.; CORREA, F.M. Phenylephrine-induced vasoconstriction of the rat superior mesenteric artery is decreased after repeated swimming. Journal of Smooth Muscle Research, v.40, n.6, p.249-58, 2004.

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 the American College of Cardiology, v.33, p.1379-85, 1999.

CONVERTINO, V.A. Evidence for altered alpha-adrenoreceptor responsiveness after a single bout of maximal exercise. Journal of Applied Physiology, v.95, n.1, p.192-8, 2003.

CORSON, M.A.; JAMES, N.L.; LATTA, S.E.; NEREM, R.M.; BERK, B.C.; HARRISON, D.G. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. Circulation Research, v.79, p.984-91, 1996.

DEANFIELD, J.E.; HALCOX, J.P.; RABELINK, T.J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. Circulation, v.115, p.1285-95, 2007.

DeLOREY, D.S.; HAMANN, J.J.; VALIC, Z.; KLUSS, H.A.; CLIFFORD, P.S.; BUCKWALTER, J.B. Alpha-Adrenergic receptor responsiveness is preserved during prolonged exercise. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology. v.292, n.1, p.H392-8, 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.

DELP, M.D.; LAUGHLIN, M.H. Regulation of skeletal muscle perfusion during exercise. Acta Physiologica Scandinavica. v.162, p.411-19, 1998.

DELP, M.D.; O'LEARY, D.S. Integrative control of the skeletal muscle microcirculation in the maintenance of arterial pressure during exercise. Journal of Applied Physiology, v.97, p.1112-18, 2004.

DICKHOUT, J. G.; HOSSAIN, G. S.; POZZA, L. M.; ZHOU, J.; LHOTAK, S.; AUSTIN, R. C. Peroxynitrite causes endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human vascular endothelium: implications in atherogenesis. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, v.25, n.12, p.2623-2629, 2005.

DORA, K.A.; DOYLE, M.P.; DULING, B.R. Elevation of intracellular calcium in smooth muscle causes endothelial cell generation of NO in arterioles. Proceedings of the National Academy of Sciences, v.94, p.6529–34, 1997.

DORA, K.A.; XIA, J.; DULING, B.R. Endothelial cell signaling during conducted vasomotor responses. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology, v.285, p.H119–26, 2003.

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. The Journal of Physiology, v.576, p.557-67, 2006.

DUSSE, L.M.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. Rio de Janeiro: v.39, n.4, p.343-50, 2003.

ENDO, T.; IMAIZUMI, T.; TAGAWA, T.; SHIRAMOTO, M.; ANDO, S.; TAKESHITA A. Role of nitric oxide in exercise-induced vasodilation of the forearm. Circulation. v.90, n.6, p.2886-90, 1994.

FORSTERMANN, U.; CLOSS, E.I.; POLLOCK, J.S.; NAKANE, M.; SCHWARZ, P.; GATH, I.; KLEINERT, H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. Hypertension, v.23, n.6, p.1121-31, 1994.

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.; 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.

GILLIGAN, D.M.; PANZA, J.A.; KILCOYNE, C.M.; WACLAWIW, M.A.; CASINO, P.R.; QUYYUMI, A.A. Contribution of endothelium-derived nitric oxide to exercise-induced vasodilation. Circulation. v.90, n.6, p.2853-8, 1994.

GLAGOV, S. Morphologic and biochemical aspects of arteries and veins. In: ABRAMSON, D.I.; DOBRIN, P.B. Blood vessels and lymphatics in organ systems, London: Academic Press, 1984.

GREEN, D.J.; O'DRISCOLL, G.; BLANKSBY, B.A.; TAYLOR, R.R. Control of skeletal muscle blood flow during dynamic exercise: contribution of endothelium-derived nitric oxide. Sports Medicine, v.21, n.2, p.119-46, 1996.

GRIENDLING, K.K.; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. Circulation Research. v.86, p.494-501, 2000.

GUIMARAES, S.; MOURA, D. Vascular adrenoceptors: an update. Pharmacological Reviews. v.53, n.2, p.319-56, 2001.

GURDAL, H.; CAN, A.; UGUR, M. The role of nitric oxide synthase in reduced vasocontractile responsiveness induced by prolonged α_1 -adrenergic receptor stimulation in rat thoracic aorta. British Journal of Pharmacology, v.145, p.203–210, 2005.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Tratado de Fisiologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

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.

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

HARRISON, D.G.; WIDDER, J.; GRUMBACH, I.; CHEN, W.; WEBER, M.; SEARLES, C. Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. Journal of Internal Medicine. v.259, n.4, p.351-63, 2006.

HILGERS, R.H.; WEBB, R.C. Molecular aspects of arterial smooth muscle contraction: focus on Rho. Experimental Biology and Medicine, v.230, n.11, p.829-35, 2005.

HOWARD, M.G.; DICARLO, S.E.; STALLONE, J.N. Acute exercise attenuates phenylephrine-induced contraction of rabbit isolated aortic rings. Medicine & Science in Sports & Exercise, v.24, n.10, p.1102-07, 1992.

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.

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.; 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.; MERTEN, R.; SPIEKERMANN, S.; BUTTNER, K.; DREXLER, H.; HORNIG, B. Vascular extracellular superoxide dismutase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. Circulation, v.101, n.19, p.2264-2270, 2000.

LAUGHLIN, M.H. Endothelium-mediated control of coronary vascular tone after chronic exercise training. Medicine & Science in Sports and Exercise, v.27, n.8, p.1135-1144, 1995.

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.; PEDRO, M.D.E.; BARBEIRO, H.V.; PILEGGI, F.; CARVALHO, M.H.; AUGUSTO, O.; DA LUZ, P.L. Vascular free radical release. Ex vivo and in vivo evidence for a flow-dependent endothelial mechanism. Circulation Research, v.74, p.700-9, 1994.

LAURINDO, F.R.M. Desequilíbrio redox, resposta vascular à lesão e aterosclerose. In: Endotélio e doenças cardiovasculares. Da LUZ, P.L.; LAURINDO, F.R.M.; CHAGAS, A.C.P. São Paulo: Atheneu, 2003.

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.

LEWIS, T.V.; DART, A.M.; CHIN-DUSTING, J.P.; KINGWELL, B.A. Exercise training increases basal nitric oxide production from the forearm in hypercholesterolemic patients. Arteriosclerosis and Thrombosis in Vascular Biology, v.19, n.11, p.2782-87, 1999.

MALARKEY, K.; AIDULIS, D.; BELHAM, C.M.; GRAHAM, A.; McLEES, A.; PAUL, A.; PLEVIN, R. Cell signaling pathways involved in the regulation of vascular smooth muscle contraction and relaxation. In: GARLAND, C.J.; ANGUS, J.A. Pharmacology of vascular smooth muscle. London: Oxford University Press, v.1, 1996.

McALLISTER, R.M.; LAUGHLIN, M.H. Short-term exercise training alters responses of porcine femoral and brachial arteries. Journal of Applied Physiology, v.82, n.5, p.1438-44, 1997.

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.

McALLISTER, R.M. Endothelial-mediated control of coronary and skeletal muscle blood flow during exercise: introduction. Medicine & Science in Sports and Exercise, v.27, n.8, p.1122-24, 1995.

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

MEYER, A.A.; KUNDT, G.; LENSCHOW, U.; SCHUFF-WERNER, P.; KIENAST, W. Improvement of early vascular changes and cardiovascular risk factors in obese children after a six-month exercise program. Journal of the American College of Cardiology, v.48, n.9, p.1865-70, 2006.

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.

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.

NASEEM K.M. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. Molecular Aspects of Medicine, v.26, n.1-2, p.33-65, 2005.

NEGRÃO, C.E.; SANTOS, A.C.; ALVES, M.J.N. Exercício físico e endotélio. 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.

OLTMAN, C.L.; PARKER, J.L.; ADAMS, H.R.; LAUGHLIN, M.H. Effects of exercise training on vasomotor reactivity of porcine coronary arteries. American Journal of Physiology, v.263, n.2, p.H372-82, 1992.

PATIL, R.D.; DICARLO, S.E.; COLLINS, H.L. Acute exercise enhances nitric oxide modulation of vascular response to phenylephrine. American Journal of Physiology, v.265, n.4, p.H1184-8, 1993.

PAUL, R.J. Mechanochemistry of vascular smooth muscle. In: ABRAMSON, D.I.; DOBRIN, P.B. Blood vessels and lymphatics in organ systems, London: Academic Press, 1984.

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.

ROWELL, L.B. Human circulation regulation during physical stress, New York: Oxford University Press, 1986.

RUBLE, S.B; VALIC, Z.; BUCKWALTER, J.B.; TSCHAKOVSKY, M.E.; CLIFFORD, P.S Attenuated vascular responsiveness to noradrenaline release during dynamic exercise in dogs. The Journal of Physiology, v.541, p.637-44, 2002.

RUSH, J.W.E.; 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.

SHAW, A.M.; McGRATH, J.C. Initiation of smooth muscle response. In: GARLAND, C.J.; ANGUS, J.A. Pharmacology of vascular smooth muscle. London: Oxford University Press, v.1, 1996.

SHEN, W.; ZHANG, X.; ZHAO, G.; WOLIN, M.S.; SESSA, W.; HINTZE, T.H. Nitric oxide production and NO synthase gene expression contribute to vascular regulation during exercise. Medicine & Science in Sports & Exercise, v.27, n.8, p.1125-34, 1995.

SOMLYO, A.V.; SOMLYO, A.P. Intracellular signaling in vascular smooth muscle. Advances in Experimental Medicine and Biology, v.346, p.31-8, 1993.

SPIEKERMANN, S.; LANDMESSER, U.; DIKALOV, S.; BREDET, M.; GAMEZ, G.; TATGE, H.; REEPSCHLAGER, N.; HORNIG, B.; DREXLER, H.; HARRISON, D.G. Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. Circulation, v.107, n.10, p.1383-9, 2003.

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.

TANAKA, L.Y.; BECHARA, L.R.G.; BARTHOLOMEU, T.; DEBBAS, V.; SANTOS, C.; LAURINDO, F. R. M.; RAMIRES, P. R. Exercício físico prolongado melhora a resposta constritora e aumenta a atividade da superóxido desmutase em aorta de ratos [Resumo]. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 20., 2005, Águas de Lindóia. XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, Águas de Lindóia: FeSBE, 2005. p. 201.

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.

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.

VANDIER, C.; LE GUENNEC, J.Y.; BEDFER, G. What are the signaling pathways used by norepinephrine to contract the artery? A demonstration using guinea pig aortic ring segments. Advances in Physiology Education, v.26, p.195-203, 2002.

VASILAKI, A.; MANSOURI, A.; REMMEN, H.; VAN DER MEULEN J. H.; LARKIN, L.; RICHARDSON, A.; G.; MCARDLE, A.; FAULKNER, J. A.; JACKSON, M. J. Free radical generation by skeletal muscle of adult and old mice: effect of contractile activity. Aging Cell, vol.5, n.2, p.109-117, 2006.

WEBB, R.C. Smooth muscle contraction and relaxation. Advances in Physiology Education, v.27, n.1-4, p.201-6, 2003.

WOODMAN, C.R.; MULLER, J.M.; LAUGHLIN, M.H.; PRICE, E.M. Induction of nitric oxide synthase mRNA in coronary resistance arteries isolated from exercise-trained pigs. American Journal of Physiology, v.273, n.6, p.H2575-9, 1997.

XIA, J.; LITTLE, T.L.; DULING, B.R. Cellular pathways of the conducted electrical response in arterioles of hamster cheek pouch in vitro. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology, v.269, p.H2031-38, 1995.

YASHIRO, Y.; DULING, B.R. Integrated Ca²⁺ signaling between smooth muscle and endothelium of resistance vessels. Circulation Research, v.87, p.1048-54, 2000.

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.