

MARIA ANDRÉIA DELBIN

REATIVIDADE VASCULAR DE ARTÉRIAS MESENTÉRICA E
PULMONAR DE RATOS APÓS ISQUEMIA/REPERFUSÃO PULMONAR:
EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do
Campus de Rio Claro, Universidade Estadual
Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor em
Ciência da Motricidade (Biodinâmica da Motricidade
Humana).

Orientador: Prof^a Dr^a Angelina ZanESCO

Rio Claro
2009

MARIA ANDRÉIA DELBIN

REATIVIDADE VASCULAR DE ARTÉRIAS MESENTÉRICA E
PULMONAR DE RATOS APÓS ISQUEMIA/REPERFUSÃO PULMONAR:
EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do
Campus de Rio Claro, Universidade Estadual
Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Doutor em
Ciência da Motricidade (Biodinâmica da Motricidade
Humana).

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Angelina ZanESCO

Profa. Dra. Fúlvia de Barros Manchado Gobatto

Profa. Dra. Camila de Moraes

Profa. Dra. Fernanda Bruschi Marinho Priviero

Profa. Dra. Ivani Aparecida de Souza

Rio Claro, 13 de Março de 2009

Dedico este trabalho à minha família e à
amiga Angelina.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por toda luz enviada em minha vida.

A minha orientadora, Professora Dra. Angelina ZanESCO, agradeço por todos os momentos de dedicação, atenção e carinho. Sou grata pelos ensinamentos e pela maneira brilhante e especial com a qual você me orientou neste trabalho. Agradeço pela imensa amizade e por toda ajuda dada durante esta caminhada.

Agradeço a toda minha família, em especial ao meu pai João, minha mãe Carolina e meu irmão Daniel que sempre estiveram ao meu lado, me apoiaram, acreditaram e aceitaram viver comigo este sonho. Essa conquista pertence também a vocês. Ao querido Cláudio Henrique, agradeço pelo amor, reconhecimento, admiração e compreensão durante esta jornada.

Ao Professor Dr. Edson Antunes, Professor Dr. Gilberto de Nucci, Prof Dr. Cláudio Gobatto e a Professora Dra. Luciana Rossoni agradeço por confiarem em mim, e pela enriquecedora oportunidade de aprender e realizar as técnicas essenciais para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho em seus laboratórios. Agradeço ao Dr. Ricardo Mussi pela importante ajuda técnica/cirúrgica prestada neste trabalho.

Agradeço a todos os amigos que estiveram ao meu lado, todos vocês completam esta conquista e tornam os momentos mais alegres, sou muito grata pela amizade e carinho. Laboratórios em Campinas FCM/UNICAMP: Enilton, Fabíola, Mário, Haroldo, Júlio, Ju Baracat, Tati Ferreira, Gláucia, Nádia, Letícia e Cléber. Laboratório em São Paulo ICB-I/USP: Ana Paula, Gisele, Camila, Helane e Hilde. Laboratórios em Rio Claro IB/UNESP: Tiago, Carlos e Gustavo Araújo. Em especial gostaria de agradecer a Camila de Moraes, Fernanda Priviero e Fernando Bau, grandes amigos tornam a vida mais completa.

Agradeço as agências FAPESP e CNPq pelo auxílio financeiro, sem o qual este trabalho não seria desenvolvido.

“A mente que se abre a uma nova
idéia jamais voltará ao seu tamanho
original”

Albert Einstein

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar o efeito do treinamento físico na reatividade vascular de artérias mesentérica e pulmonar de ratos submetidos à isquemia/reperfusão (IR) pulmonar. Ratos wistar foram utilizados nesse estudo, e divididos em cinco grupos: controle sedentário (C/SD); controle treinado (C/TR); falso operado sedentário (SHAM/SD); isquemia/reperfusão sedentário (IR/SD) e isquemia/reperfusão treinado (IR/TR). O treinamento físico consistiu em corrida em esteira, sessões de 60 min/dia, 5 vezes por semana durante 8 semanas (velocidade 1,2 km/h e 0% de inclinação). O processo de IR pulmonar foi realizado através de oclusão total da artéria pulmonar, veia pulmonar e brônquio esquerdo por 90 minutos e reperfusão de 120 minutos. Em seguida, as artérias mesentérica e pulmonar foram isoladas e curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh), histamina (HIST), nitroprussiato de sódio (SNP) foram obtidas na presença e na ausência de endotélio. Curvas concentração-resposta à fenilefrina (PHE) e ao análogo do tromboxano A_2 (U46619) também foram obtidas na presença de endotélio. Análise do extravasamento de proteínas plasmáticas, atividade da mieloperoxidase pulmonar (MPO), nitrato e nitrito (NO_x^-), atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), interleucina-6 (IL-6) plasmáticas e expressão de proteína arterial da eNOS, nNOS, Cu/Zn SOD-1, $p47^{phox}$ e TNF- α foram avaliados. Verificou-se aumento nos valores de NO_x^- , SOD, IL-6 plasmático, atividade da MPO e extravasamento de proteínas nos grupos IR/SD e IR/TR quando comparados aos demais grupos. O treinamento físico não alterou nenhum destes parâmetros. Em artéria mesentérica, houve diminuição na potência à ACh e a PHE no grupo IR/SD quando comparado aos grupos C/TR e IR/TR, sem alterações nos valores de resposta máxima. Não foram verificadas alterações na resposta ao U46619. Nenhuma alteração na expressão das proteínas nNOS, Cu/Zn SOD-1 e $p47^{phox}$ foi encontrada. Em artéria pulmonar, a potência a PHE foi significativamente diminuída nos grupos IR/SD e IR/TR, sem alterações na resposta máxima. Não foram verificadas alterações na resposta ao U46619. A expressão das proteínas eNOS, nNOS, Cu/Zn SOD-1 e $p47^{phox}$ não foram alteradas para todos os grupos experimentais. No entanto, foi verificado aumento significativo na expressão de TNF- α nos grupos experimentais IR/SD e IR/TR quando comparados aos demais grupos. O presente trabalho mostra que o treinamento físico previne as alterações de sensibilidade aos agonistas ACh e PHE em artéria mesentérica induzida pelo processo de isquemia/reperfusão pulmonar, promovendo efeitos benéficos sistêmicos. Por outro lado, o treinamento físico não foi eficaz em atenuar as modificações observadas para a PHE em artéria pulmonar e estas alterações foram positivamente associadas com elevação na concentração de TNF- α , mostrando que o treinamento físico não foi capaz de prevenir as alterações locais induzidas pelo processo de IR pulmonar.

Palavras Chave: Reatividade vascular, Isquemia/reperfusão pulmonar, Exercício físico.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the effect of physical training in the responsiveness of rat mesenteric and pulmonary rings submitted to lung ischemia/reperfusion (IR). Rats were divided into five groups named: control sedentary (C/SD); control trained (C/TR); sham operated sedentary (SHAM/SD); ischemia/reperfusion sedentary (IR/SD) and ischemia/reperfusion trained (IR/TR). Run training was performed for 5 days/week, each session of 60 minutes, during 8 weeks (speed of 1.2 km/h and 0% grade). Left pulmonary IR was performed by occluding the pulmonary artery, bronchus and pulmonary vein for 90 minutes and reperfusion for 120 minutes. Concentration-response curves to acetylcholine (ACh), histamine (HIST), sodium nitroprusside (SNP) with intact and denuded endothelium were obtained. Contractile response curves were performed for phenylephrine (PHE) and tromboxane A₂ analogue (U46619). The pulmonary plasma protein extravasation, lung myeloperoxidase activity (MPO), plasma levels of nitrite/nitrate (NO_x⁻), superoxide dismutase activity (SOD), interleukin-6 (IL-6) and the protein expression for eNOS, nNOS, Cu/Zn SOD-1, p47^{phox} and TNF-α were evaluated. The levels of NO_x⁻, SOD, IL-6, MPO activity and pulmonary plasma protein extravasation were markedly increased in IR/SD and IR/TR compared to others groups which were not modified by exercise training. In mesenteric rings a decreased of potency to ACh and PHE in IR/SD compared to C/TR and IR/TR without changes in the maximal response were observed. No changes to U46619 were seen in all groups. The nNOS, Cu/Zn SOD-1 and p47^{phox} protein expression were not modified. In pulmonary rings the potency to PHE was decreased in IR/SD and IR/TR without changes in the maximal response. No changes to U46619 were seen in all groups. Neither pulmonary IR nor exercise training changed the protein expression for eNOS, nNOS, Cu/Zn SOD-1 and p47^{phox}. Pulmonary IR increased the TNF-α protein expression which was not modified by exercise training. In conclusion the exercise training prevented the alterations of sensitivity to ACh and PHE induced by pulmonary IR in mesenteric artery, promoting systemic beneficial effects in remote tissue. On the other hand exercise training did not prevent the PHE vascular modifications associated with marked increased in TNF-α protein expression in pulmonary artery, suggesting that the local alterations are not affected by exercise training in pulmonary IR.

Keywords: Vascular responsiveness, Pulmonary ischemia/reperfusion, Exercise training.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Unidades funcionais dos pulmões	15
Figura 2. Mecanismo de ação do óxido nítrico e relaxamento do músculo liso vascular.....	23
Figura 3. Mecanismo de contração do músculo liso vascular.....	25
Figura 4. Valores plasmáticos de nitrato e nitrito (NO_x^-)	41
Figura 5. Valores plasmáticos da atividade da superóxido dismutase (SOD)	42
Figura 6. Valores plasmáticos de interleucina 6 (IL-6).....	43
Figura 7. Valores de extravasamento de proteínas plasmáticas	45
Figura 8. Valores da atividade da mieloperoxidase pulmonar	47
Figura 9. Curvas concentração-resposta à acetilcolina, histamina e ao nitroprussiato de sódio em anéis de artéria mesentérica na presença e na ausência de endotélio	50
Figura 10. Curvas concentração-resposta à fenilefrina e ao análogo do tromboxano A_2 (U46619) em anéis de artéria mesentérica na presença de endotélio.....	51
Figura 11. Curvas concentração-resposta à acetilcolina, histamina e ao nitroprussiato de sódio em anéis de artéria pulmonar na presença e na ausência de endotélio	54

Figura 12. Curvas concentração-resposta à fenilefrina e ao análogo do tromboxano A ₂ (U46619) em anéis de artéria pulmonar na presença de endotélio.....	55
Figura 13. Expressão da nNOS, Cu/Zn SOD-1 e p47 ^{phox} em artéria mesentérica.....	57
Figura 14. Expressão da eNOS, nNOS, Cu/Zn SOD-1 e p47 ^{phox} e TNF-α em artéria pulmonar	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de extravasamento de proteína plasmática 44

Tabela 2. Valores da atividade da mieloperoxidase pulmonar 46

Tabela 3. Valores de potência (pEC_{50}) à acetilcolina, histamina, nitroprussiato sódio, fenilefrina e ao análogo do tromboxano A_2 (U46619) em anéis de artéria mesentérica na presença e na ausência de endotélio 49

Tabela 4. Valores de potência (pEC_{50}) à acetilcolina, histamina, nitroprussiato sódio, fenilefrina e ao análogo do tromboxano A_2 (U46619) em anéis de artéria pulmonar na presença e na ausência de endotélio 53

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh: acetilcolina

ATP: adenosina trifosfato

BH₄ : (6R)-5,6,7,8-tetraidrobiopterina

cNOS: sintase do óxido nítrico constitutiva

COX-1: cicloxigenase 1

COX-2: cicloxigenase 2

DG: diacilglicerol

EC₅₀: concentração do agonista necessária para se obter 50% da resposta máxima

EDHF: fator hiperpolarizante derivado do endotélio

E_{max}: resposta máxima

eNOS: sintase do óxido nítrico endotelial

EROs: espécies reativas de oxigênio

GCs: guanilato ciclase solúvel

GMPc: guanosina monofosfato cíclico

HIST: histamina

IL-10: interleucina 10

IL1-β: interleucina 1β

IL-6: interleucina 6

IL-8: interleucina 8

iNOS: sintase do óxido nítrico induzível

IP₃: inositol-1,4,5- trifosfato

IR: isquemia/reperfusão

LPS: lipopolissacarídeos bacterianos

MPO: mieloperoxidase

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo-P

nNOS: sintase do óxido nítrico neuronal

NO: óxido nítrico

NOS: sintase do óxido nítrico

NO_x⁻: nitrato e nitrito

O₂⁻: ânion superóxido

OONO⁻: peroxinitrito

PGH₂: prostaglandina H₂

PGI₂: prostaciclina

PHE: fenilefrina

SNP: nitroprusssiato de sódio

SOD: superóxido dismutase

TNF-α: fator de necrose tumoral alfa

TXA₂: tromboxano A₂

U46619: análogo do tromboxano A₂

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1 Sistema respiratório	15
2.2 Epidemiologia da cirurgia pulmonar e síndrome da angústia respiratória aguda (SARA)	17
2.3 Isquemia/reperfusão.....	18
2.4 Citocinas e isquemia/reperfusão	20
2.5 Endotélio vascular e óxido nítrico.....	21
2.6 Contração do músculo liso vascular	24
2.7 Espécies reativas de oxigênio	25
2.7 Exercício físico	26
3. JUSTIFICATIVA	29
4. OBJETIVO.....	30
5. MATERIAIS E MÉTODOS	
5.1 Animais.....	31
5.2 Programa de treinamento físico	31
5.3 Isquemia/reperfusão pulmonar	32
5.4 Peso corporal, medida de pressão arterial e medida de glicose sanguínea.....	33
5.5 Obtenção das amostras de plasma e dos tecidos de artéria mesentérica e pulmonar	33
5.6 Curvas concentração-resposta em anéis de artéria mesentérica e pulmonar	33
5.7 Medida de edema pulmonar.....	35
5.8 Determinação do infiltrado de neutrófilos nos pulmões.....	35
5.9 Nitrato e nitrito (NO_x^-), atividade da superóxido dismutase (SOD) e interleucina 6 (IL-6)	36
5.10 Detecção da eNOS, nNOS, iNOS, Cu/Zn SOD-1, p47 ^{phox} , TNF- α e IL- 6 pelo métodos de western-blotting.....	36
5.11 Análise estatística	39

6. RESULTADOS

6.1 Peso corporal, pressão arterial sistólica e glicose sanguínea	40
6.2 Nitrato e nitrito (NO_x^-)	41
6.3 Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	42
6.4 Interleucina 6 (IL-6)	43
6.5 Edema pulmonar e infiltrado de neutrófilos nos pulmões	44
6.6 Curva concentração-resposta em anéis de artéria mesentérica	48
6.7 Curva concentração-resposta em anéis de artéria pulmonar	52
6.8 Expressões da eNOS, nNOS, iNOS, Cu/Zn SOD-1, p47 ^{phox} , TNF- α e IL-6 em artéria mesentérica.....	56
6.9 Expressões da eNOS, nNOS, iNOS, Cu/Zn SOD-1, p47 ^{phox} , TNF- α e IL-6 em artéria pulmonar	58
7. SUMÁRIO DOS RESULTADOS.....	61
8. DISCUSSÃO	62
9. CONCLUSÃO.....	69
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
11. ANEXO	
11.1 Anexo A - Parecer da Comissão de Ética na Experimentação Animal.....	85

1. INTRODUÇÃO

O processo de isquemia/reperfusão pulmonar tem sido associado à infiltração de neutrófilos nos pulmões, lesão endotelial de microvasos e edema pulmonar (BISHOP et al., 1987; HOOG, 1987; OVERAND et al., 1989; CHAN et al., 2003). A isquemia/reperfusão provoca resposta inflamatória sistêmica podendo resultar em excessiva produção de espécies reativas de oxigênio e redução na produção ou disponibilidade de óxido nítrico causando efeitos deletérios nos tecidos (FOULDS et al., 1998; CARDEN e GRANGER, 2000). Estudo demonstrou que o processo de isquemia/reperfusão em diversos órgãos, tais como coração, cérebro e rins, pode causar disfunção vascular resultando em diminuição do relaxamento dependente de endotélio (BANDA; LEFER; GRANGER, 1997), outros estudos relataram alterações no tônus vascular após o processo de isquemia/reperfusão tanto em artérias locais quanto sistêmicas (PRUNEAU e BELICHARD, 1993; KOKSOY et al., 2000; RODRIGUEZ-SINOVAS et al., 2003). Porém não existem estudos conclusivos relacionados ao processo de isquemia/reperfusão pulmonar e a reatividade vascular.

O exercício físico regular, preferencialmente o aeróbio, tem sido recomendado na terapêutica não farmacológica da prevenção e/ou tratamento das doenças cardiovasculares, entre outras. Esses benefícios podem estar relacionados ao aumento na produção de substâncias vasoativas como o óxido nítrico e/ou ao aumento de sua disponibilidade nas células endoteliais (SESSA et al., 1994; SHEN et al., 1994; KINGWELL, 2000; CLAUDINO et al., 2004; GRAHAN e RUSH, 2004; HIGASHI e YOSHIKUMI, 2004; WOODMAN et al., 2005). Particularmente os efeitos do exercício físico regular na função pulmonar foram estudados em quadros de asma e em alguns casos na doença pulmonar obstrutiva crônica (POWERS; COOMBES; DEMIREL, 1997; COOPER, 2001; RAM et al., 2005; BARAKAT et al., 2008).

No entanto, até o momento, não existem estudos que esclareçam o efeito do treinamento físico aeróbio na reatividade vascular após o processo de isquemia/reperfusão pulmonar. Sendo assim o objetivo deste estudo foi o de avaliar o efeito do treinamento físico aeróbio na reatividade vascular de artérias mesentérica e pulmonar de ratos submetidos ao processo de isquemia/reperfusão pulmonar.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sistema respiratório

O sistema respiratório é constituído pela traquéia, brônquios, bronquíolos e alvéolos que são as unidades funcionais dos pulmões (Figura 1).

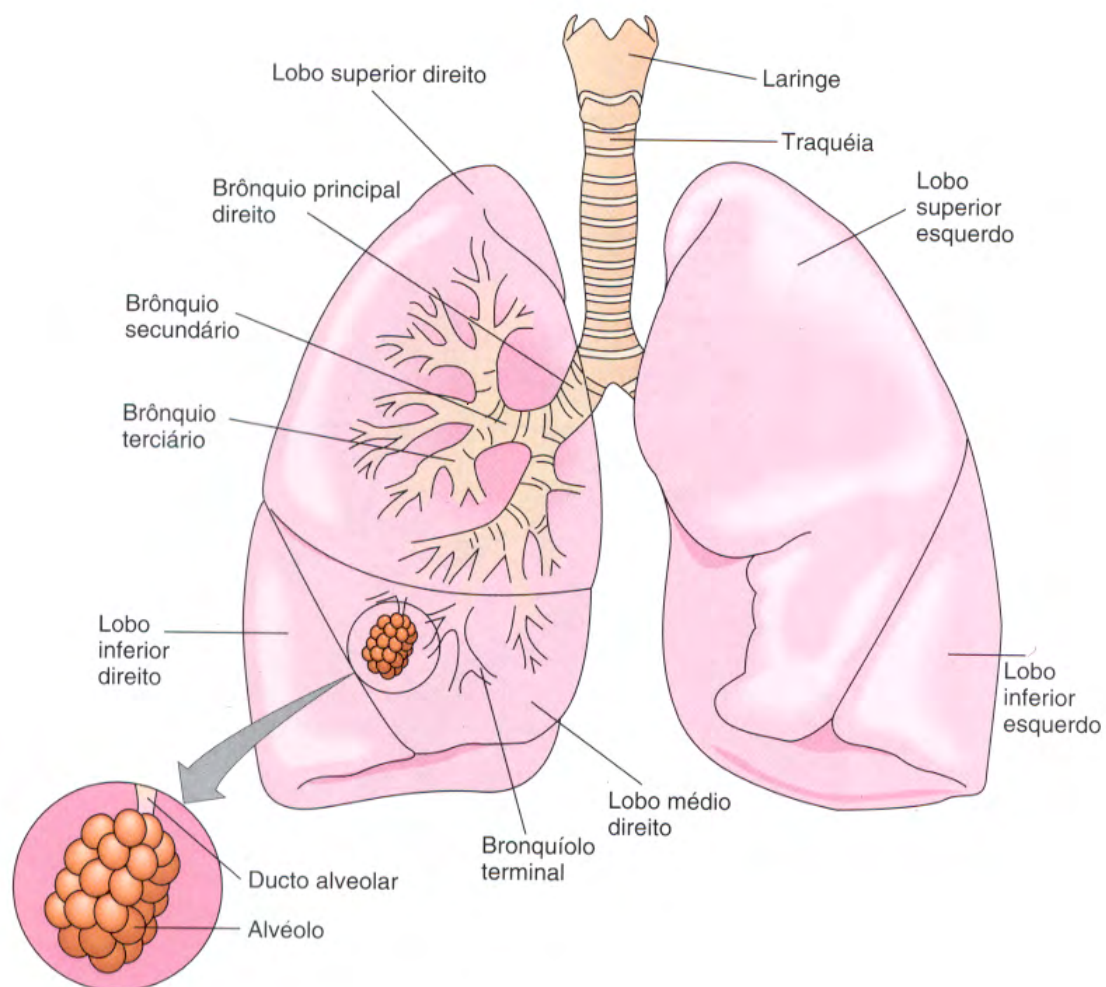


Figura 1 – Unidades funcionais dos pulmões (POWERS e HOWLEY, 2000).

Os dois brônquios principais, cada um suprindo um pulmão, derivam da traquéia. Cada brônquio principal divide-se em brônquios secundários, estes por sua vez, dividem-se em brônquios terciários ou segmentares. Os brônquios segmentares

continuam a se dividir sucessivamente em ramos menores, os bronquíolos. Cada bronquíolo divide-se em vários bronquíolos terminais, estes se dividem em bronquíolos respiratórios que se abrem em ductos alveolares originando os alvéolos (JACOB et al., 1984; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999; GUYTON e HALL, 2006).

Os pulmões são órgãos em forma de cone, esponjosos e divididos por fissuras. A fissura oblíqua e horizontal divide o pulmão direito em lobos superior, médio e inferior. Do lado esquerdo há somente uma fissura oblíqua, dividindo o pulmão esquerdo em lobos superior e inferior. Os brônquios principais e as artérias pulmonares entram de cada lado do pulmão por uma fenda chamada hilo (JACOB et al., 1984; POWERS e HOWLEY, 2000).

A circulação do sistema respiratório é composta pela artéria pulmonar que é do tipo elástica e contém sangue venoso a ser oxigenado pelos alvéolos pulmonares. Dentro do pulmão esta artéria se ramifica, acompanhando a árvore brônquica e na altura do ducto alveolar forma uma rede capilar cujos ramos entram em íntimo contato com o epitélio alveolar, sendo que desta rede capilar originam-se as vênulas que correm pelos septos interlobulares. Após saírem dos lóbulos, as veias contendo sangue oxigenado acompanham a árvore brônquica, dirigindo-se para o hilo. Os vasos nutridores compreendem as artérias e as veias brônquicas, que são menores do que as artérias e veias pulmonares. Os ramos da artéria brônquica também acompanham a árvore brônquica, mas vão apenas até os bronquíolos respiratórios (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999). As pressões na circulação pulmonar são consideravelmente baixas, de acordo com estas baixas pressões, as paredes da artéria pulmonar e seus ramos são extraordinariamente finos e contêm relativamente pouco músculo liso. Isto contrasta com a circulação sistêmica, onde as artérias geralmente têm paredes espessas e as arteríolas, em particular abundante musculatura lisa (WEST, 1986; GUYTON e HALL, 2006).

O sistema respiratório possui duas principais funções: troca gasosa e função endócrina-metabólica. A função de troca gasosa é primordial para a manutenção da respiração celular e conseqüentemente da vida celular. Ele fornece ao indivíduo um meio de repor o oxigênio (O_2) e remover o dióxido de carbono (CO_2) do sangue. A troca de O_2 e de CO_2 entre os pulmões e o sangue ocorre em conseqüência da ventilação e

da difusão (POWERS e HOWLEY, 2000). O pulmão também é caracterizado pela sua função endócrino-metabólica. O pulmão possui mais de 50 % da microcirculação do organismo, onde o endotélio pulmonar ocupa uma superfície total de aproximadamente 70 m². O endotélio pulmonar participa da conversão da angiotensina I em angiotensina II pela enzima conversora de angiotensina (ECA). Ao mesmo tempo produz um fator vasoconstritor (angiotensina II), a ECA endotelial pulmonar inativa um potente peptídeo vasodilatador, a bradicinina. Aproximadamente 80 % desse peptídeo são degradados em uma única passagem pelo pulmão, não alcançando o leito arterial sistêmico. O endotélio pulmonar também é capaz de remover e metabolizar certas aminas endógenas, como serotonina e noradrenalina (ZANESCO e ANTUNES, 2005).

2.2 Epidemiologia da cirurgia pulmonar e síndrome da angústia respiratória aguda (SARA)

O transplante de pulmão é o procedimento mais indicado para o tratamento de doenças pulmonares em estágios terminais, como no caso da hipertensão pulmonar, do enfisema, da fibrose pulmonar entre outras. O primeiro transplante pulmonar realizado com sucesso ocorreu em 1983, e desde então o número de cirurgias aumentou durante os últimos anos (SUNDARESAN e PATTERSON, 1996). A Sociedade Internacional de Transplantes de Coração e Pulmão mostrou que os dois fatores de riscos mais significativos para o desenvolvimento de complicações pós-operatórias ou de mortes para indivíduos transplantados são: a idade do doador e o tempo de isquemia do órgão (HOSENPUUD et al., 2000). Além disso, a lesão aguda de reperfusão é outro fator importante de morbidade na cirurgia cardiopulmonar, com impactos significantes nas despesas e cuidados com a saúde. Embora existam consideráveis avanços na área da imunologia dos transplantes, a lesão aguda de reperfusão ou a resposta de re-implante permanecem como fonte de considerável morbidade (EPPINGER et al., 1997; CALVIN et al., 2002).

Apesar da alta prevalência das complicações pós-operatórias de cirurgias cardiopulmonares, o reconhecimento, o diagnóstico e a gerência destas variam muito, o prognóstico e uma terapêutica efetiva no curso dos eventos de disfunção pulmonar associado com a cirurgia ainda necessita de avanços (WYNNE e BOTTI, 2004). Assim,

um dos quadros que acarretam maiores complicações após as cirurgias cardiopulmonares é o processo de isquemia/reperfusão, que induz a resposta inflamatória que por sua vez promovem a disfunção pulmonar. A disfunção respiratória mais grave é denominada síndrome da angústia respiratória aguda (CALVIN et al., 2002; ANDREJAITIENE et al., 2004).

A síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) é descrita como um quadro de lesão pulmonar aguda, associada a um edema pulmonar agudo, não hidrostático ou não cardiogênico, acompanhado de uma hipoxemia severa, responsável por altas taxas de mortalidade, entre 10 e 90 %, dependendo do fator etiológico. Apesar da SARA ter sido descrita há mais de 30 anos, várias dúvidas ainda persistem quanto à sua definição, a fisiologia, patologia e o tratamento (ZAPOL e SNIDER, 1977; CREMONA, DINH; HIGENBOTTAM, 1991; ANTONIAZZI, 1998). A SARA caracteriza-se por dano do endotélio e epitélio pulmonar e, conseqüentemente, com lesão da membrana alvéolo-capilar. Existem muitos mediadores que são imputados como causadores e perpetuadores da síndrome, mas, em geral, sua patogênese consiste de duas vias: os efeitos diretos da lesão nas células pulmonares e uma resposta inflamatória sistêmica aguda, que pode incluir componentes celulares e humorais.

2.3 Isquemia/reperfusão

A isquemia, condição de interrupção no suprimento de oxigênio e nutrientes para uma determinada área, induz invariavelmente à disfunção tecidual, e dependendo do grau de isquemia pode gerar a morte de tecidos. Os danos teciduais dependem das características do tecido envolvido, capacidade de recrutamento capilar na micro-circulação, demanda metabólica, estoques de oxigênio disponíveis, e a capacidade de produção de energia por metabolismo anaeróbico (GUTIERREZ, 1996; SCANNELL, 1996). A lesão por isquemia/reperfusão pode ser definida como o dano que ocorre em determinado tecido com a restauração do fluxo sanguíneo, após o período de isquemia (REILY; SCHILLER; BULKLEY, 1991). Evidências mostram que a lesão dos tecidos não está limitada somente à isquemia, mas que durante ou após a reperfusão o comprometimento tecidual é também de grande relevância clínica. A reperfusão pode lesar isoladamente o órgão isquemiado, como ocorre na reperfusão pulmonar e nos

transplantes de órgãos ou podem estender-se para outros órgãos, em função de uma resposta inflamatória sistêmica, na qual mediadores inflamatórios são produzidos e liberados na circulação, alcançando diferentes órgãos (BECKER e AMBROSIO, 1987; HORIGUCHI e HARADA, 1993). A lesão de isquemia/reperfusão pulmonar constitui importante evento fisiológico e patológico comum a diversas situações na prática clínica. Seus efeitos locais e sistêmicos podem ser estudados em condições que envolvem o transplante pulmonar, cirurgia cardiotorácica, oclusão da artéria pulmonar, tromboembolismo pulmonar, pneumotórax total e derrame pleural volumoso (ESME ET al., 2006).

A isquemia pulmonar ocorrida como resultado da oclusão da artéria pulmonar seguida de reperfusão está associado à infiltração de neutrófilos nos pulmões, lesão endotelial dos microvasos (BISHOP; CHI; CHENEY, 1987; OVERAND et al., 1989) e edema pulmonar (OVERAND et al., 1989). A resposta celular envolve neutrófilos, macrófagos/monócitos e linfócitos, os quais têm um papel importante no processo que inclui a adesão, a quimiotaxia e ativação destes leucócitos (FROSTELL et al., 1993; ANTONIAZZI, 1998; WAN e YIM, 1999). Essa interação intercelular é feita por moléculas de adesão (adesinas, integrinas e selectinas), presentes nas células endoteliais e inflamatórias (ALBELDA e BUCK, 1990). As espécies reativas de oxigênio derivadas dos neutrófilos também podem levar ao dano tecidual e vascular através da aderência de neutrófilos polimorfonucleares nas células endoteliais (HOGG, 1987; HORGAN; WRIGHT; MALKI, 1990).

Os eventos envolvidos na resposta inflamatória sistêmica incluem alterações plasmáticas, como ativação do sistema complemento, coagulação/fibrinólise e cininas, aumento dos mediadores pró-inflamatórios (citocinas como fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), mediadores lipídicos oxidantes, proteases, óxido nítrico e neuropeptídeo) e indução de síntese protéica. Esses fatores são considerados responsáveis pela injúria celular e alterações no surfactante (importante substância que atua na redução da tensão superficial dos líquidos que revestem o interior dos alvéolos e demais vias respiratórias), com distúrbio da relação ventilação/perfusão, resultando em hipoxemia (MOORE et al., 1987).

Comumente, a isquemia/reperfusão corresponde à anóxia-reoxigenação nos órgãos transplantados. Contudo, os pulmões são considerados diferentes, pois contém oxigênio nos alvéolos durante a preservação da isquemia. Por isso, nos pulmões, o estresse oxidativo resultante da isquemia deve ser distinguido daquele resultante de outros órgãos (FISHER et al., 1991; ECKENHOFF et al., 1992; DATE et al., 1993; de PERROT et al., 2003).

2.4 Citocinas e isquemia/reperfusão

As citocinas compreendem um grande número de glicoproteínas de baixo peso molecular, que atuam na intercomunicação celular. Podem ser produzidas por qualquer célula do corpo com exceção dos eritrócitos, e estão relacionadas à estimulação e supressão dos eventos da resposta imune, desencadeando e coordenando a resposta inflamatória (HAMBLIN, 1993).

A resposta inflamatória que pode levar à disfunção e falência de um determinado órgão é um dos maiores problemas após a ocorrência de lesões em diferentes condições como na sepse, queimaduras graves, pancreatite aguda, choque hemorrágico, trauma e transplantes (BHATHIA e MOOCHHALA, 2004). Sabe-se que as citocinas pró-inflamatórias desempenham um papel importante na lesão de isquemia/reperfusão do coração, rim, intestino delgado, pele e fígado, mas pouco se sabe sobre o papel delas na lesão de isquemia/reperfusão dos pulmões (KRISHNADASAN et al., 2003).

Deve ser ressaltado que, uma importante citocina liberada durante o processo de isquemia/reperfusão é o TNF- α (KHINMENKO et al., 1998). Essa citocina possui um efeito citotóxico direto, no endotélio estimula a produção de outras citocinas como as interleucinas. Essas substâncias interagem com as células endoteliais, aumentando a atividade pró-coagulante e a produção do inibidor do plasminogênio, facilitando a coagulação e promovendo a ativação de neutrófilos, monócitos e linfócitos que, por sua vez, liberam ânions superóxido e outras espécies reativas de oxigênio que participam no processo de lesão do tecido endotelial (ERTEL et al., 1991). Estudos evidenciam que o TNF- α altera a seletividade da barreira endotelial, aumenta a resistência vascular

e produz edema pulmonar em modelos experimentais (HOCKING et al., 1990; KOGA et al., 1995).

Outra interleucina importante na resposta inflamatória ligada a isquemia/reperfusão é a IL-1 β , caracterizada também como pró-inflamatória, está ligada a ativação de neutrófilos e induz a ligação das moléculas de adesão aos leucócitos e ao endotélio. A IL-1 β induz a cicloxigenase (COX-2) e a expressão da sintase do óxido nítrico induzível (iNOS). Ela também eleva a expressão de outras citocinas tais como TNF- α , IL-6 e as moléculas de adesão (OKUSAWA; GELFAND; IKEJIMA, 1988; PUTENSEN e WRIGGE, 2000). A cicloxigenase é uma importante enzima presente nas membranas celulares que produz os prostanoídes a partir do ácido araquidônico, pode ser dividida em dois subtipos COX-1 e COX-2, mais especificamente, a COX-2 está associada à resposta inflamatória e produção de importantes mediadores como as citocinas (VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998). A IL-6 possui importante papel na resposta inflamatória aguda e é produzida por diferentes tipos de células como os monócitos, fibroblastos e células endoteliais sendo os principais estímulos para a produção de IL-6, os lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), IL-1 e o TNF- α . Inicialmente acreditava-se que a IL-6 possuía apenas papel pró-inflamatório, mas recentes estudos sugerem também papel anti-inflamatório, sendo muito importante para o retorno da homeostasia após o processo inflamatório.

Concentrações plasmáticas elevadas de IL-6 têm sido constatadas em diversas condições nas quais a homeostasia do sistema está comprometida ou ameaçada tais como sepse ou múltiplos traumas (HACK; AARDEN; THIJS, 1997; GIANNOUDIS et al., 1998). O papel da IL-6 no transplante pulmonar ainda não está muito bem estabelecido e existem resultados conflitantes. No entanto, níveis elevados de IL-6 foram constatados na lesão das vias respiratórias e tecido pulmonar após estímulos inflamatórios, mas a relevância funcional desses achados ainda não está clara (RIZZO et al., 2000; TENG et al., 2004).

2.5 Endotélio vascular e óxido nítrico

Atualmente sabe-se que as células endoteliais são responsáveis pela síntese, pelo metabolismo e pela liberação de grande variedade de mediadores que regulam o

tônus vascular, a permeabilidade vascular, o metabolismo de substâncias endógenas e exógenas, e a atividade plaquetária e leucocitária (ZANESCO e ANTUNES, 2005). As substâncias produzidas pelo endotélio podem ser divididas entre agentes vasodilatadores como: prostaciclina (PGI_2), óxido nítrico (NO) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e agentes vasoconstritores como: endotelinas, prostaglandina H_2 (PGH_2), tromboxano A_2 (TXA_2) e as espécies reativas de oxigênio (EROs).

Dentre esta variedade de substâncias, o NO merece atenção especial devido ao seu papel no mecanismo de vasodilatação. Enzimas conhecidas como sintases do NO (NOS), as quais são divididas em dois grandes grupos isoformas constitutivas (cNOS: eNOS-endotelial e nNOS-neuronal) e isoforma indizível (iNOS), são capazes de catalisar a oxidação do nitrogênio terminal do grupamento guanidino da L-arginina formando NO e L-citrulina. Uma vez liberado, o NO difunde-se rapidamente da célula geradora para a célula alvo, onde interage com o grupamento heme da guanilato ciclase solúvel (GCs) estimulando sua atividade catalítica, levando à formação de guanosina monofosfato cíclico (GMPc), que por sua vez, diminui os níveis intracelular de cálcio Ca^{2+} (Figura 2). Os mecanismos pelos quais a via NO/GMPc induz a vasodilatação incluem inibição da geração do inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3), aumento do seqüestro de Ca^{2+} citosólico, desfosforilação da cadeia leve de miosina, inibição do influxo de Ca^{2+} , ativação de proteína quinase, estimulação da Ca^{2+} ATPase de membrana e abertura de canais de K^+ (IGNARRO, 1987).

Ambas, eNOS e nNOS, são estimuladas por uma cascata bioquímica que envolve a participação de íons Ca^{2+} e a calmodulina, e liberam o NO por curtos períodos de tempo. A iNOS é ativada por determinados estímulos patológicos, tais como LPS e citocinas, incluindo a IL-1 e TNF- α . Esta isoforma pode ser expressa em uma grande variedade de tipos celulares incluindo macrófagos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, células de Kupffer, células endoteliais, hepatócitos e células epiteliais. É ativada independentemente do complexo Ca^{2+} calmodulina, e libera grandes quantidades de NO por períodos de tempo relativamente longos (MONCADA et al., 1991).

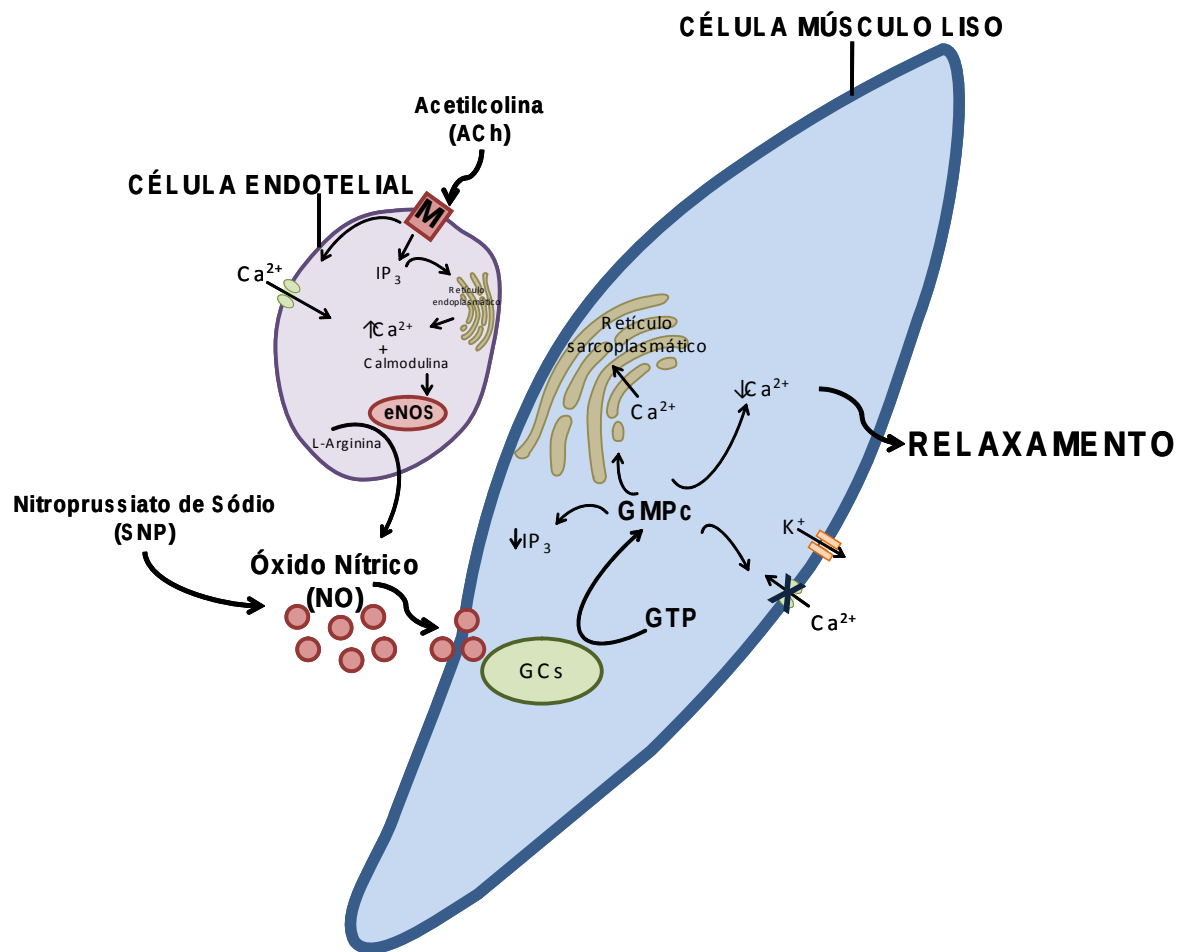


Figura 2 – Mecanismo de ação do óxido nítrico e relaxamento do músculo liso vascular (adaptado VANHOUTE, 2003).

As células endoteliais são altamente sensíveis a estímulos químicos advindos de agonistas como a acetilcolina, bradicinina e histamina, e por estímulos físicos.

As forças físicas resultante da variação do fluxo sanguíneo (força de cisalhamento) que é um dos mais importantes estímulos para a célula endotelial produzir NO e EDHF que levam à vasodilatação. O aumento na força de cisalhamento estimula mecanossensores presentes nas células endoteliais que podem ser as proteínas G, os canais iônicos, as junções intercelulares, as integrinas ou os lipídeos de membrana que captam as alterações de tensão sobre a parede celular e convertem os estímulos mecânicos em estímulos químicos para a ativação da eNOS independente de Ca^{2+} . A capacidade das células endoteliais de perceber e responder às mudanças no

fluxo sanguíneo é fator essencial na regulação do tono vascular, e envolve a ativação de fatores de crescimento celular, promovendo o remodelamento da parede arterial e a manutenção da integridade do endotélio (FISHER et al., 2001; HIGASHI E YOSHIZUMI, 2004; KOJDA E HAMBRECHT, 2005).

2.6 Contração do músculo liso vascular

Analogamente ao que acontece em outros tipos de células musculares, nas células musculares lisas o processo de contração é resultado do deslizamento dos filamentos de actina sobre os filamentos de miosina. Nas células musculares em geral, um evento muito importante para o estabelecimento da contração é o aumento da concentração do cálcio citoplasmático. O Ca^{2+} utilizado para ativação do aparelho contrátil entra no compartimento citoplasmático durante períodos de despolarização de membrana, estímulo mecânico ou estímulo químico por agonista. A fonte desse íon pode ser tanto o meio extracelular quanto de compartimentos intracelulares, em especial o retículo sarcoplasmático (VASCONCELOS e CARVALHO, 2005). O Ca^{2+} presente no citosol liga-se à proteína calmodulina, formando o complexo Ca^{2+} -calmodulina que irá ativar a enzima miosina quinase, responsável por fosforilar o sítio ativo da cadeia leve de miosina, fazendo com que esta proteína ligue-se aos filamentos de actina promovendo a contração muscular (GUYTON E HALL, 1996). Os agonistas contráteis ligam-se aos receptores acoplados a proteína G estimulando a fosfolipase C que cataliza a formação de segundos mensageiros como o inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) e o diacilglicerol (DG). O IP_3 liga-se aos seus receptores localizados no retículo sarcoplasmático liberando Ca^{2+} para o citosol. A molécula de DG ativa a proteína quinase C que por sua vez fosforila proteínas ligadas ao canal para cálcio do tipo L na membrana celular, favorecendo o influxo de Ca^{2+} para o citosol (Figura 3). A contração é inativada pela enzima miosina fosfatase que inibe a ligação entre a miosina e a actina (WEBB, 2003). Após um evento excitatório, o relaxamento e a homeostase do Ca^{2+} são obtidos por sua recaptação pelos compartimentos estoques intracelulares e por sua extrusão para meio o extracelular (VASCONCELOS e CARVALHO, 2005).

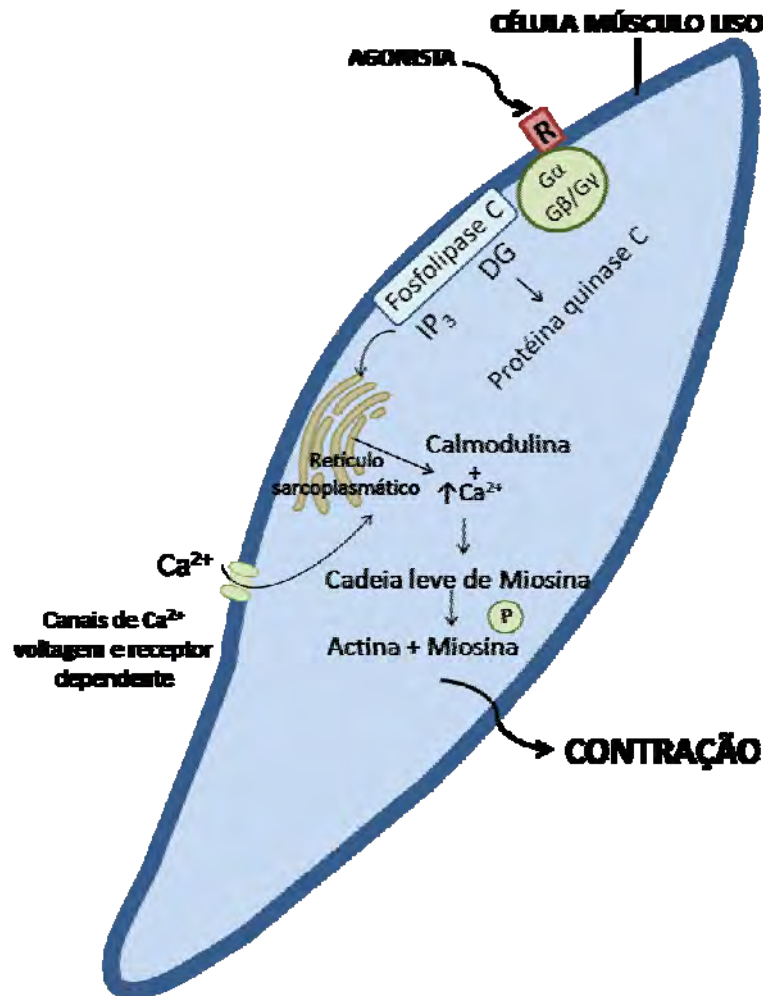


Figura 3 – Mecanismo de contração do músculo liso vascular (adaptado WEBB, 2003).

2.7 Espécies reativas de oxigênio

Diversos autores têm demonstrado direta associação entre o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e diversas patologias humanas, entre elas o diabetes mellitus, câncer, acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio, aterosclerose, síndrome da isquemia/reperfusão, artrite reumatóide e no próprio envelhecimento (HALIWELL; GUTTERIDGE; CROSS, 1992; ASHARAF e ZHAI, 1995; FREDERIKS; KOOJI; BOSCH, 1995; GARCIA-VALDECASAS et al., 1995; OREDSSON; PLATE; QVARFORDT, 1995). Além disso, as EROs têm importante papel na síndrome da angústia respiratória adulta e na lesão pulmonar e vascular após o processo de isquemia/reperfusão pulmonar (JURMANN et al., 1990). Particularmente,

os neutrófilos aderidos ao endotélio vascular pulmonar durante isquemia/reperfusão pulmonar participam do dano tecidual através da produção de espécies reativas de oxigênio (DOWNEY, 1990; RUSSELL e JACKSON, 1994; NOVICK et al., 1996; LENNON et al., 2004).

O estresse oxidativo envolve a produção de espécies reativas de oxigênio por diferentes células do organismo, como as células endoteliais, a célula muscular lisa, as células da camada adventícia, células do sistema imunológico, entre outras (GRIENDLING et al., 2000). As EROs são formadas por atividade enzimática intra e extracelular, sendo a xantina oxidase, o citocromo P450, a via da cicloxigenase, a eNOS desacopladora e a NADPH oxidase, as principais enzimas envolvidas neste processo. A NADPH oxidase é a principal enzima formadora de ânion superóxido (O_2^-) que possui grande citotoxicidade e está envolvida na gênese de processos patológicos como hipertensão arterial, diabetes mellitus e aterosclerose (FORTUNO et al., 2005). A NADPH oxidase é uma enzima envolvendo diversas subunidades como a $p22^{phox}$ e $gp91^{phox}$, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$ e uma pequena guanosina-trifosfato (GTP)-ligada proteína Rac (BAYRAKTUTAN; BLAYNEY; SHAN, 2000).

A enzima eNOS desacoplada também pode ser uma importante fonte de O_2^- e esta produção ocorre quando a biodisponibilidade de L-arginina ou de (6R)-5,6,7,8-tetraidrobiopterina (BH_4), substratos para a formação de NO, apresentam-se em concentrações reduzidas (SHINOZAKI et al., 1999). A reação do O_2^- com o NO produzido pela célula endotelial reduz a biodisponibilidade deste agente dando origem a uma molécula altamente instável, o peroxinitrito ($OONO^-$), capaz de oxidar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos provocando danos celulares através da ativação do fator nuclear kappa B, fatores de crescimento, e de citocinas, que por sua vez desencadeiam alterações estruturais e funcionais como o remodelamento vascular, aumento da deposição de proteínas da matriz extracelular, aumento do processo inflamatório e da permeabilidade endotelial nos tecidos envolvidos (BECKMAN e KOPPENOL, 1996).

2.8 Exercício físico

O exercício físico é uma atividade realizada com repetições sistemáticas de movimentos orientados, com conseqüente aumento no consumo de oxigênio devido à

solicitação muscular. O exercício físico provoca uma série de respostas fisiológicas nos sistemas corporais e, em especial no sistema cardiovascular com o objetivo de manter o equilíbrio celular em face ao aumento das demandas metabólicas e do consumo de energia (MCARDLE; KATCH; KATCH, 1998). Sabe-se que o exercício físico aeróbio de moderada intensidade, realizado continuamente, promove efeitos benéficos tanto na prevenção quanto no tratamento das doenças cardiovasculares, e sua prática regular têm sido recomendada por diferentes associações de saúde do mundo (MORRIS et al., 1980; SISCOVICK et al., 1984; HULL et al., 1994). Seus benefícios também têm sido demonstrados na prevenção e tratamento da hipertensão arterial, diabetes, dislipidemia, obesidade e osteoporose. Sendo assim, a inatividade física e o baixo nível de condicionamento são considerados fatores de risco para o desenvolvimento dessas doenças (BROWN et al., 2003; CIOLAC e GUIMARÃES, 2004).

Sabe-se que o exercício físico aumenta o fluxo sanguíneo pulsátil e a pressão que o sangue exerce sobre a parede vascular e a força de cisalhamento sob as células endoteliais são estímulos poderosos para a geração de NO no sistema vascular. Assim, um dos efeitos benéficos do exercício físico regular está estreitamente relacionado à sua capacidade de estimular a síntese de NO pelas células endoteliais (DELP et al., 1993; WANG et al., 1993; SESSA et al., 1994; SHEN et al., 1994; WOODMAN et al., 1997, KINGWELL, 2000). Outra modificação vascular provocada pelo exercício físico está relacionada à expressão e à atividade de enzimas pró e anti-oxidantes. Dentre as enzimas antioxidantes presentes no tecido vascular, temos a catalase, a glutathione peroxidase e mais três tipos de superóxido dismutase (SOD), sendo a SOD-1 dependente de Cu/Zn, presente no núcleo e no citosol, a SOD-2 dependente de Mn, presente na mitocôndria e a SOD-3 dependente de Cu/Zn, presente na matriz extracelular. Destas enzimas, a SOD-1 Cu/Zn é a mais sensível à força de cisalhamento provocado pelo exercício físico (RUSH et al., 2003).

No entanto, o papel do exercício como protetor das doenças inflamatórias, e mais especificamente das doenças pulmonares é ainda controverso. A resposta das citocinas ao exercício agudo difere daquela vista nas infecções graves. Nota-se que as clássicas citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-1 β , em geral não se elevam com o exercício, indicando que a cascata de citocinas induzidas pelo exercício difere da

cascata induzida pelas infecções (PEDERSEN e HOFFMAN-GOETZ, 2000; PEDERSEN; STEENBERG; SCHJERLING, 2001; FEBBRAIO e PEDERSEN, 2002; SUZUKI et al., 2002). Sabe-se que o exercício físico promove a formação de IL-6 pela musculatura esquelética, e que o treinamento físico regular induz *up-regulation* do RNAm para IL-6. Esta elevação da produção de IL-6 no músculo esquelético, pelo exercício físico, está diretamente relacionada à inibição da formação de TNF- α e parece exercer papel protetor contra as infecções. Outra citocina anti-inflamatória que têm seus níveis elevados pela prática de exercício físico é a interleucina 10 (IL-10), a qual inibe a produção de TNF- α , IL-1 α e IL-1 β . Esses dados mostram que o exercício regular desempenha importante papel anti-inflamatório (MOORE et al., 1993; PRETOLANI, 1999; PETERSEN e PEDERSEN, 2005).

Muitos estudos demonstraram fortes evidências que o exercício físico possui efeitos benéficos tanto na prevenção quanto na reabilitação de inúmeras doenças, no entanto os efeitos crônicos do treinamento físico nas complicações pulmonares após o processo de isquemia/reperfusão não são conhecidos.

3. JUSTIFICATIVA

O sistema respiratório desempenha papel fundamental na homeostasia do organismo, tanto em repouso, quanto em condições de exercício (FRANKLIN; SEYMOR; TIMMIS, 1991). É responsável pelas trocas gasosas, fornecendo assim O₂ aos tecidos e removendo o CO₂ (POWERS e HOWLEY, 2000). Além disso, as células endoteliais presentes nos vasos dos pulmões, têm importante papel na síntese e degradação de diversas substâncias presentes no sangue, como a angiotensina e a bradicinina respectivamente (ZANESCO e ANTUNES, 2005).

Embora o avanço tecnológico associado aos novos conhecimentos científicos tem proporcionado melhora na prevenção e/ou tratamento das complicações cardiorespiratórias advindas de cirurgias cardiotorácicas e procedimentos envolvendo IR, os riscos destes procedimentos ainda permanecem altos e medidas profiláticas na tentativa de reduzir o aparecimento das complicações pós-cirúrgicas devem ser investigadas. Sabe-se que o processo de IR induz a resposta inflamatória local e sistêmica, podendo levar a disfunção pulmonar sendo a síndrome da angústia respiratória aguda considerada a disfunção mais grave.

O exercício físico regular, preferencialmente o aeróbio, tem sido recomendado na terapêutica não farmacológica da prevenção e/ou tratamento das doenças cardiovasculares, entre outras. No entanto, ainda não está claro, se os efeitos crônicos do treinamento físico realizado previamente podem atenuar as complicações locais e sistêmicas relacionadas ao processo de isquemia/reperfusão pulmonar. Portanto estudos são necessários para esclarecer quais são os fatores que estariam envolvidos na gênese da lesão pulmonar, e os mecanismos envolvidos na reatividade vascular associada a esse processo.

4. OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho foi:

Avaliar o efeito do treinamento físico por 8 semanas na reatividade vascular de artérias mesentérica e pulmonar de ratos Wistar submetidos ao processo de isquemia/reperfusão pulmonar.

Os objetivos específicos foram:

1. Avaliação da resposta relaxante e contrátil de anéis de artéria mesentérica e pulmonar de ratos submetidos ao processo de isquemia/reperfusão pulmonar e previamente treinados por 8 semanas de exercício aeróbio em esteira, através de:
 - ✓ Curvas concentração-resposta ao agonista acetilcolina na presença e na ausência de endotélio;
 - ✓ Curvas concentração-resposta ao agonista histamina na presença e na ausência de endotélio;
 - ✓ Curvas concentração-resposta ao doador de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio, na presença e na ausência de endotélio;
 - ✓ Curvas concentração-resposta ao agonista α -adrenérgico, fenilefrina, na presença de endotélio;
 - ✓ Curvas concentração-resposta ao análogo do tromboxano A₂, U46649, na presença de endotélio;
2. Avaliação dos níveis de nitrato e nitrito, atividade da superóxido dismutase e interleucina 6 no plasma;
3. Avaliação do extravasamento de proteínas plasmáticas e do infiltrado de neutrófilos nos pulmões;
4. Avaliação da expressão de proteínas utilizando a técnica de Western-blotting:
 - ✓ Expressão da isoforma da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS);
 - ✓ Expressão da Cu/Zn superóxido dismutase (SOD-1);
 - ✓ Expressão da sub-unidade citosólica da NADPH oxidase (p47^{phox});
 - ✓ Expressão da interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Ratos Wistar machos (200 – 220 g) foram fornecidos pela Universidade Estadual Paulista (Campus de Botucatu) e foram mantidos no Biotério de Manutenção do Departamento de Educação Física. Os animais foram mantidos em caixas coletivas com cinco animais em cada.

Os animais foram divididos em cinco grupos:

- ✓ Controle sedentário (C/SD): ratos sedentários.
- ✓ Controle treinado (C/TR): ratos submetidos ao programa de treinamento físico.
- ✓ Falso operado sedentário (SHAM/SD): ratos sedentários e submetidos apenas ao procedimento cirúrgico.
- ✓ Isquemia/reperfusão sedentário (IR/SD): ratos sedentários e submetidos ao procedimento de isquemia/reperfusão pulmonar.
- ✓ Isquemia/reperfusão treinado (IR/TR): ratos submetidos ao programa de treinamento físico e ao procedimento de isquemia/reperfusão pulmonar.

Todos os animais tiveram livre acesso à água e ração comercial (Purina, Campinas, Brasil) e foram mantidos em ciclos de claro/escuro normal (12/12 h).

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia - CEAA-IB-UNICAMP.

5.2 Programa de treinamento físico

O treinamento realizado foi o de corrida em esteira ergométrica, com baias individuais, com as seguintes dimensões: 0,70 m de largura, 0,45 m de altura e 1,35 m de comprimento. Sendo que na primeira semana de estudo, os animais foram submetidos a um período de adaptação à esteira que consistia em manter os animais na esteira variando a velocidade em 0,3 no primeiro dia até 0,6 km/h no quinto dia da semana. Progressões de tempo na duração das sessões também foram realizadas até

que os animais conseguissem permanecer correndo por 60 minutos. Somente os animais adaptados ao exercício em esteira foram usados para o estudo.

O treinamento físico foi iniciado com uma velocidade de 0,6 Km/h na primeira sessão, aumentando progressivamente até atingir a velocidade final de 1,2 Km/h correspondente à máxima fase estável de lactato (PRIVIERO et al., 2004; MANCHADO et al., 2005). O programa teve duração de 8 semanas de treinamento em esteira, 5 dias por semana, com duração de 60 minutos por sessão durante o período da manhã.

Ao término do período total de treinamento, os animais foram mantidos em repouso por um período de 48 horas, e jejum de 12 horas, quando então foram submetidos ao protocolo de isquemia/reperfusão e sacrifício.

5.3 Isquemia/ reperfusão pulmonar

Os ratos foram anestesiados com 1,2 g/kg de uretana intraperitonal e em seguida, os animais foram traqueostomizados com catéter 21G e artificialmente ventilados (Inter3 Ventilador Intermed, São Paulo, SP, Brasil) com oxigênio a 60%, frequência de 80 movimentos respiratórios/minuto, pressão final de expiração positiva de 2 cm H₂O, e o pico máximo de pressão foi mantido a menos de 10 cm H₂O (FARIVAR et al., 2004). A veia femoral foi canulada e o controle de hidratação dos ratos foi mantido através de infusão de solução salina 0,9 %, no volume de 3 ml/hora. Atropina (0,4 mg) foi dissolvida em solução salina e administra intramuscular nos animais. Após toracotomia anterolateral esquerda no 5º espaço intercostal todos os animais receberam heparina (50 UI) dissolvida em solução de salina (volume total de 500 µL) via endovenosa femoral (EPPINGER et al., 1997). Apenas os ratos utilizados na análise de extravasamento de proteína receberam injeção de albumina bovina marcada com I¹²⁵ (IPEN CNEN/USP, São Paulo, SP, Brasil) por via endovenosa peniana (BRAIN e WILLIAMS, 1985). O pulmão esquerdo foi imobilizado evitando-se traumas. A artéria pulmonar esquerda, o brônquio e a veia pulmonar foram ocluídos com um clamp microvascular durante 90 minutos. Após esse tempo, o clamp foi removido e o pulmão reperfundido por 120 minutos (EPPINGER et al., 1997; MUSSI et al., 2008). Os animais foram mantidos sobre uma manta térmica e o controle da

temperatura retal e dorsal (entre o dorso do animal e a manta térmica) foi verificado periodicamente e mantido a 37 °C.

5.4 Peso corporal, medida de pressão arterial sistólica e medida de glicose sanguínea

O peso corporal foi mensurado antes do início do protocolo experimental e semanalmente até o final do programa de treinamento. A pressão arterial sistólica dos animais foi medida ao final do protocolo experimental usando o método indireto de tail-cuff modificado (ZATZ, 1990). A glicose sanguínea de jejum dos animais foi medida ao final do protocolo experimental utilizando uma gota de sangue caudal e os valores foram mensurados por fitas reativas de teste (Advantage Roche, São Paulo, SP, Brasil) e monitor digital de glicemia (Advantage Roche, São Paulo, SP, Brasil) seguindo as instruções do fabricante.

5.5 Obtenção das amostras de plasma e dos tecidos de artéria mesentérica e pulmonar

Após o período de isquemia/reperfusão uma incisão longitudinal foi feita no abdômen do animal para coleta de amostra de sangue arterial (7 ml), obtida do ramo descendente da artéria aorta. As amostras de sangue foram centrifugadas por 15 minutos a 3000 rotações/minuto para obtenção do plasma e congelados em freezer -70 °C para posteriores análises. Em seguida, os animais foram sacrificados, o tórax e o abdome foram abertos e as artérias, mesentérica superior e pulmonar principal e direita, foram removidas cuidadosamente e banhadas em solução preparada de Krebs contendo (mM): NaCl- 118; NaHCO₃- 25; glicose- 5,6; KCl- 4,7; KH₂PO₄- 1,2; MgSO₄.7H₂O- 1,17 e CaCl₂.2H₂O- 2,5.

5.6 Curva concentração-resposta em anéis de artéria mesentérica e pulmonar

Da artéria mesentérica superior e da artéria pulmonar principal e direita foram retirados os tecidos aderentes e foram cortadas em 2 a 4 anéis de aproximadamente 2 mm de comprimento. Os anéis foram suspensos entre dois ganchos de metal e mantidos em 10 ml da solução de Krebs, aquecida a 37 °C, pH 7,4 e areada com 95 %

de O₂ e 5 % de CO₂. As artérias foram suspensas a uma tensão de 10 mN (1 g = 10 mN), e periodicamente ajustadas até que ocorresse a estabilização de tensão da mesma. Para o protocolo experimental de artéria mesentérica e pulmonar sem endotélio, o mesmo foi removido mecanicamente através de esfregaço com fio cirúrgico antes de serem suspensos. As alterações de tensão do tecido foram medidas usando-se transdutores isométricos (UgoBasile, Varese, Itália), e registradas em sistema PowerLab 400TM de aquisição de dados (Software versão 4,2, AD Instruments, MA, EUA).

Após o período de 1 hora de estabilização, as artérias mesentérica e pulmonar foram contraídas com KCl (80 mM). Os anéis foram também submetidas ao teste de verificação de endotélio, sendo pré-contraídas com fenilefrina (PHE; 1 e 10 µM, respectivamente) e estimuladas com acetilcolina (ACh; 1 µM), os anéis que apresentaram relaxamento foram utilizados no protocolo com endotélio. Apenas os anéis que não apresentaram resposta relaxante ao teste foram utilizadas no protocolo experimental sem endotélio.

Curvas cumulativas concentração-resposta aos agonistas vasodilatadores acetilcolina (ACh; 10 nM – 100 µM) e histamina (HIST; 10nM – 100µM em anel de artéria mesentérica, e 100 nM – 1 mM em anel de artéria pulmonar) foram obtidas na presença e na ausência de endotélio. O relaxamento foi plotado como porcentagem da contração induzida por PHE (1 µM) para artéria mesentérica e PHE (10 µM) para artéria pulmonar.

Foram também realizadas curvas concentração-resposta ao vasodilatador que atua diretamente no músculo liso vascular, nitroprussiato de sódio (SNP; 100 pM – 1 µM em artéria mesentérica e 100 pM – 3 µM em artéria pulmonar), na presença e ausência de endotélio. Os anéis foram pré-contraídos com PHE.

Os efeitos contráteis do agonista α-adrenérgico, PHE (1 nM – 10 µM) e do análogo do tromboxano A₂, U46619 (1 nM – 1 µM) foram também avaliados, em ambas as preparações apenas na presença de endotélio. A contração foi plotada como porcentagem da contração induzida pelo KCl 80 mM.

As curvas concentração-resposta foram obtidas através do aumento cumulativo das concentrações do agonista em meia unidade logarítmica entre doses sucessivas

(VAN ROSSUM, 1963). Os dados obtidos das curvas concentração-resposta foram avaliados através da equação descrita abaixo:

$$E = E_{\max} / \{ [1 + (10^c/10^x)^n] + \Phi \}$$

Onde E representa o efeito do agonista na resposta tecidual; E_{max} representa a resposta máxima que o agonista produziu; c representa o logaritmo da EC₅₀, definida como a concentração do agonista que produz metade da resposta máxima; x representa o logaritmo das concentrações do agonista, o termo exponencial n é o coeficiente angular ou inclinação, parâmetro que define o tipo de curva concentração-resposta obtida; por fim o símbolo Φ representa a resposta observada na ausência do agonista. A análise de regressão não linear para determinar os parâmetros: E_{max}, log EC₅₀ e n foram determinados utilizando o programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) com o valor basal Φ = zero.

5.7 Medida de edema pulmonar

O extravasamento de proteínas plasmáticas pulmonar foi utilizado para avaliar o edema pulmonar em função do acúmulo local de albumina bovina marcada com I¹²⁵ (HSA-I¹²⁵; 2,5 µgCi/kg), sendo previamente administrada. Após o período de isquemia/reperfusão, uma amostra de plasma foi coletada desses animais e o pulmão esquerdo e direito foram, removidos e a radioatividade presente nas amostras de plasma e tecido quantificadas em contador gama. O edema formado foi expresso como volume de plasma extravasado em função da contagem obtida em 1 ml de plasma.

5.8 Determinação do infiltrado de neutrófilos nos pulmões

A atividade de mieloperoxidase (MPO) foi utilizada para determinação do infiltrado de neutrófilos no tecido pulmonar. Amostras do pulmão esquerdo e direito dos animais foram coletadas, pesadas e mantidas em tubos teste na presença de tampão fosfato (50 mM, pH 6,0 contendo 0,5 % de HTAB). Cada amostra foi homogeneizada durante 15 segundos, e alíquotas de 1 ml do homogenato foram centrifugadas durante 2 minutos à 14000 rotações/minuto. Os sobrenadantes obtidos foram submetidos à análise da atividade da MPO. Em placa de 96 poços, 10 µl de sobrenadante foram adicionados a 200 µl de solução de dicloreto de o-dianisidina (0,167 mg/dl, preparada

em tampão fosfato de potássio 50 mM contendo 0,005 % de H_2O_2). As alterações nos valores de absorbância a 460 nm foram registrados em intervalos de 30 segundos durante 10 minutos. Os resultados foram expressos como unidade de MPO (UMPO) por mg de tecido. Uma UMPO foi considerada como a quantidade de enzima que degrada 1 μM de peróxido/minuto (BRADLEY et al., 1982).

5.9 Nitrato e nitrito (NO_x^-), atividade da superóxido dismutase (SOD) e interleucina 6 (IL-6)

Amostras de plasma foram utilizadas para determinação da produção endógena de NO por meio da quantificação dos ânions nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-), produtos terminais da oxidação do NO pelo método ELISA (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). As amostras foram ultra filtradas por meio de microfiltros (Microcon Centrifugal Filter Units, 10 kDa; Millipore, Bedford, MA, USA). Após o processo de filtragem as concentrações de NO_x^- foram determinadas e os resultados expressos em μM .

Foram também utilizadas amostras de plasma para a determinação da atividade da SOD pelo método de ELISA (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA). Este ensaio mede a atividade dos três tipos de SOD (Cu/Zn, Mn e Fe-SOD) e os resultados obtidos são expressos em U/ml, onde uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para a dismutação de 50 % dos radicais superóxido formados pela adição da xantina oxidase à amostra.

A verificação da concentração de IL-6 plasmática foi feita pelo método de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), através de placa preparada com anticorpo específico para IL-6. Os resultados são apresentados em pg/ml.

Todos os métodos foram realizados utilizando-se kit comercial seguindo as instruções do fabricante.

5.10 Detecção da eNOS, nNOS, iNOS, Cu/Zn SOD-1, p47^{phox} , $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6 pelo método de Western-blotting

As artérias mesentérica superior e pulmonar principal e direita foram congeladas a -70°C , e posteriormente homogeneizadas (homogeneizador de vidro) em tampão de Ripa (Upstate, Temecula, CA, EUA). O homogenato foi centrifugado e o sobrenadante

recolhido. Alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para a determinação da concentração de proteína (Pierce BCA Protein Assay kit, Rockford, IL, EUA), e então a quantidade necessária para aplicar 50 ou 35 µg de proteína no gel de acrilamida foi calculada para cada amostra. Em seguida, foi preparado o gel em um sistema Mini-Protean (BioRad, Hercules, CA, EUA) com concentração de acrilamida de 7,5 % para detecção das expressões de eNOS, nNOS, iNOS e p47^{phox} (com 50 µg de proteína). Outro gel com concentração de 12 % foi preparado para detecção da Cu/Zn SOD-1, TNF-α e IL-6 (com 35 µg de proteína).

As alíquotas do homogenato foram diluídas em solução de Laemmli (BioRad, Hercules, CA, EUA) contendo β-mercaptoetanol, e mantidas a 99 °C durante 5 minutos. Em seguida, estas amostras foram aplicadas no gel com SDS (Lauril Sulfato Sódico)-poliacrilamida (SDS-PAGE) e submetidas a eletroforese em gel em um sistema Mini-Protean II (Eletrophoresis Cell, BioRad, Hercules, CA, EUA) contendo a solução de corrida (Tris- 24 mM; Glicina- 192 mM; SDS- 0,10 %) durante aproximadamente 3 horas, a uma corrente constante de 90 Volts (Power Pac 200, BioRad, Hercules, CA, EUA). Junto com as amostras foi aplicado no gel, um padrão de proteínas marcadoras de peso molecular (BioRad, Hercules, CA, EUA). Estes marcadores foram utilizados para comprovar a transferência das proteínas do gel para a membrana, e além disso, estes marcadores auxiliaram na localização das proteínas de interesse na membrana. No mesmo gel também foram aplicadas amostras de células endoteliais, cérebro de rato ou fígado-LPS de rato como controle positivo para eNOS, nNOS/ SOD-1 e p47^{phox}/TNF-α/iNOS, respectivamente.

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de polivinil difluorida (PVDF Hybond, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA), previamente ativada, durante 20 segundos, com metanol. Para a transferência, o gel, a membrana e o papel Whatman foram colocados em um sistema de *sandwich* e imersos em uma cuba (Mini-Protean II, Modulo de Transferência, BioRad, Hercules, CA, EUA) contendo a solução de transferência (Tris- 25 mM; Glicina- 190 mM; SDS- 0,05 % e Metanol- 20 %). O sistema foi submetido a uma corrente de 230 mA (Power Pac 200, BioRad, Hercules, CA, EUA), durante 18 horas.

A transferência foi confirmada através da coloração do gel com Azul de Croomassie, onde se observou a ausência de bandas no gel. As proteínas das membranas foram fixadas e coradas com ácido acético 1 %, por 5 minutos, e coradas com Ponceau- 0,1 %; ácido acético 1% durante 20 minutos. A descoloração das membranas foi feita com uma sequência de lavagens iniciada com ácido acético 1%, seguida por água e finalizando com o TBS-T (TrisHCl- 20 mM, NaCl- 0,5 mM e Tween 20- 0,1 %). Todo este processo confirma a boa transferência das proteínas para o gel, além proporcionar a fixação destas proteínas na membrana. As membranas foram então incubadas durante 60 minutos à temperatura ambiente e sob agitação com uma solução bloqueante para eNOS, nNOS, iNOS, Cu/Zn SOD-1, TNF- α e IL-6 (leite desnatado- 5 %, TrisHCl- 10 mM, NaCl- 100 mM e Tween 20- 0,1 %) para o bloqueio da membrana para expressão da p47^{phox} foi utilizado a solução (albumina- 5 %, TrisHCl- 10 mM, NaCl- 100 mM e Tween 20- 0,1 %).

Para a detecção das proteínas de interesse, as membranas foram incubadas durante 15 horas com anticorpo primário monoclonal para eNOS, nNOS e iNOS (BD Biosciense, San Jose, CA EUA), Cu/Zn SOD-1 (Sigma-Aldrich CO, Saint Louis, MO, EUA), p47^{phox} (Upstate, New York, NY, EUA), TNF- α (Biolegend, San Diego, CA EUA) e IL-6 (Abcam, Cambridge, MA, EUA) à temperatura de 4 °C e sob agitação. Utilizando as seguintes diluições eNOS, nNOS, iNOS e Cu/Zn SOD-1 (1:1000), p47^{phox} (1:2000), TNF- α (1 μ g/ml) e IL-6 (1:1500) em solução de bloqueio para eNOS, nNOS, iNOS, Cu/Zn SOD-1, TNF- α e IL-6 (leite desnatado- 5 %, TrisHCl- 10 mM, NaCl- 100 mM e Tween 20- 0,1 %) para o bloqueio da membrana para expressão da p47^{phox} foi utilizado a solução (albumina- 5 %, TrisHCl- 10 mM, NaCl- 100 mM e Tween 20- 0,1 %). Em seguida, as membranas foram lavadas 6 vezes de 15 minutos com solução de lavagem (TrisHCl- 10 mM, NaCl- 100 mM e Tween 20- 0,1 %), sob agitação. Posteriormente, estas membranas foram incubadas com anticorpos secundários: Imunoglobulina IgG Anti-camundongo unida à peroxidase de rábano (BioRad, Hercules, CA, EUA) em uma diluição de 1:1500 para detecção da eNOS, nNOS, iNOS e Cu/Zn SOD-1, Imunoglobulina IgG Anti-coelho unida à peroxidase de rábano (KPL, Maryland, DC, EUA) em diluição 1:4000 para detecção da p47^{phox} e IL-6 e Imunoglobulina IgG Anti-hamister unida à peroxidase de rábano (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA,

EUA) em diluição 1:6000 para detecção do TNF- α . Os anticorpos secundários foram diluídos em solução bloqueante respectivamente e incubados por 90 minutos, à temperatura ambiente e sob agitação. Ao final, o excesso dos anticorpos secundários foram lavados em 4 lavagens sucessivas de 15 minutos cada. As proteínas de interesse foram detectadas por uma reação de quimioluminescência utilizando um sistema de detecção (ECL Plus, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA). A seguir, as membranas foram colocadas em contato com um filme fotográfico (Hyperfilm, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA), e as bandas impregnadas foram posteriormente reveladas.

Após detecção da expressão das diferentes proteínas de interesse, as membranas foram incubadas com solução para limpeza (TrisHCl- 62,5 mM, SDS-2 %, β -Mercaptoetanol- 100 mM) por 40 minutos a 50 °C e lavadas por duas vezes com TBS-T por 30 minutos. Posteriormente, a membrana foi incubada com a solução bloqueante (leite desnatado- 5 %, TrisHCl- 10 mM, NaCl- 100 mM e Tween 20- 0,1 %) e todo o protocolo de incubação foi repetido com anticorpo primário para detecção α -actina (Sigma-Aldrich CO, Saint Louis, MO, EUA) em diluição 1:10000 e anticorpo secundário IgG Anti-camundongo unida à peroxidase de rábano (BioRad, Hercules, CA, EUA) em diluição 1:10000. A expressão da α -actina foi medida para normalização da expressão das proteínas quantificadas.

As bandas das proteínas separadas pela técnica de Western-blotting foram quantificadas mediante análise densitométrica. Para tal, os filmes com as bandas protéicas impregnadas foram gravados por um *scanner* e para análise e quantificação das bandas foi utilizada o programa de análise de imagens Scion Image for Windows (Scion Corporate, Frederick, MD, EUA).

5.11 Análise estatística

Os valores experimentais foram expressos como média $\pm$ S.E.M. de *n* experimentos indicados em cada caso. Análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Bonferroni foi empregado para avaliar diferenças entre os grupos experimentais. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

6. RESULTADOS

6.1 Peso corporal, pressão arterial sistólica e glicose sanguínea

O peso corporal inicial foi similar em todos os grupos estudados (218 ± 3 g). Após 8 semanas de treinamento em esteira, o ganho de peso corporal foi significativamente menor nos grupos treinados (C/TR: 367 ± 7 e IR/TR: 357 ± 6 g) quando comparados com os animais dos grupos sedentários (C/SD: 414 ± 5 , SHAM/SD: 412 ± 5 e IR/SD: 410 ± 8 g), aproximadamente 12 % de redução.

Nenhuma alteração foi constatada nos valores de pressão arterial sistólica final dos grupos sedentários (C/SD: $102,2 \pm 4,2$; SHAM/SD: $101,6 \pm 5,9$ e IR/SD: $103,3 \pm 5,6$ mmHg) e treinados (C/TR: $96,2 \pm 3,7$ e IR/TR: $93,3 \pm 12,0$ mmHg). De maneira similar nenhuma alteração foi constatada para a glicose sanguínea de jejum entre os grupos ao final do estudo (C/SD: $92,6 \pm 2,5$; SHAM/SD: $89,7 \pm 3,1$ e IR/SD: $95,5 \pm 2,9$ mg/dl) e treinados (C/TR: $90 \pm 4,4$ e IR/TR = TR: $90,3 \pm 0,7$ mg/dl).

6.2 Nitrato e nitrito (NO_x^-)

Os valores de nitrato e nitrito (NO_x^-) plasmático foram consideravelmente aumentados nos grupos que sofreram isquemia/reperfusão pulmonar (IR/SD: $71,9 \pm 8$ e IR/TR: $64,1 \pm 8 \mu\text{M}$) quando comparados com os demais grupos (C/SD: $30,8 \pm 2,2$, SHAM/SD: $37,3 \pm 3,4$ e C/TR: $30,3 \pm 2,5 \mu\text{M}$), aproximadamente 110 % de aumento. O treinamento físico per se, não alterou a (NO_x^-). Os dados estão ilustrados na Figura 4.

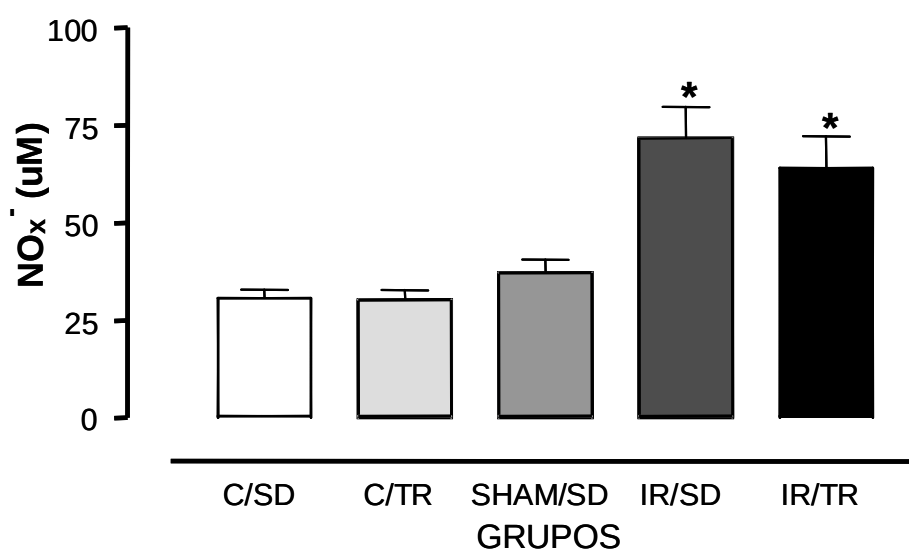


Figura 4 - Valores plasmáticos de nitrato e nitrito ($\text{NO}_x^- \mu\text{M}$) de animais dos grupos controle sedentário (C/SD), controle treinado (C/TR), falso operado sedentário (SHAM/SD), isquemia/reperfusão sedentário (IR/SD) e isquemia/reperfusão treinados (IR/TR).

Os dados são expressos como média $\pm$ SEM, $n = 5 - 8$ animais por grupo.

*, $p < 0,05$ comparados ao grupo C/SD, C/TR e SHAM/SD.

6.3 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

Os valores da atividade plasmática da SOD não foram modificados pelo treinamento físico (C/SD: $6,5 \pm 0,7$, C/TR: $5,6 \pm 0,2$ e SHAM/SD: $7,7 \pm 0,6$ U/ml). No entanto, apresentaram-se consideravelmente aumentados nos grupos submetidos à isquemia/reperfusão pulmonar (IR/SD: $9,0 \pm 0,6$ e IR/TR: $9,5 \pm 0,5$ U/ml) quando comparados aos seus respectivos grupos controle, aproximadamente 40% (IR/SD x C/SD) e 70 % (IR/TR x C/TR). Os dados estão ilustrados na Figura 5.

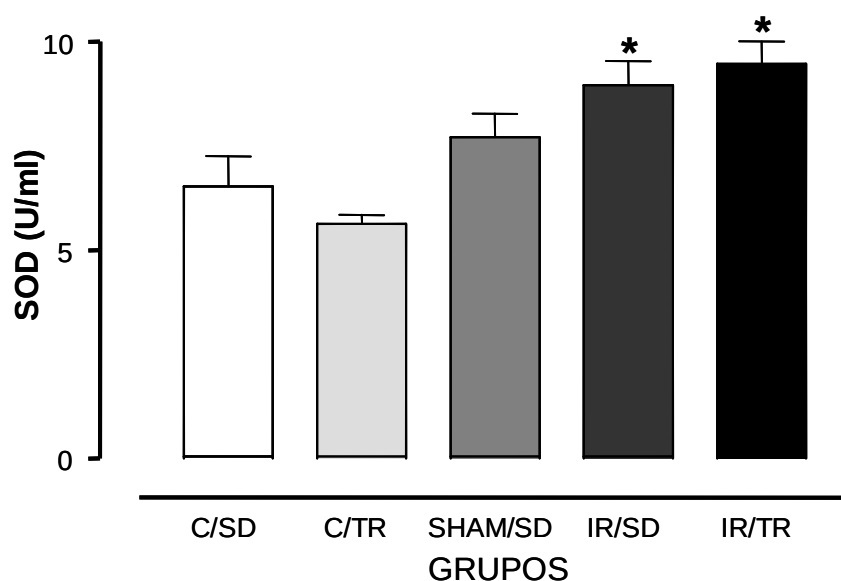


Figura 5 - Valores da atividade plasmática da superóxido dismutase (SOD U/ml) de animais dos grupos controle sedentário (C/SD), controle treinado (C/TR), falso operado sedentário (SHAM/SD), isquemia/reperfusão sedentário (IR/SD) e isquemia/reperfusão treinados (IR/TR).

Os dados são expressos como média $\pm$ SEM, $n = 6 - 9$ animais por grupo.

*, $p < 0,05$ comparados aos grupos C/SD e C/TR.

6.4 Interleucina 6 (IL-6)

A concentração plasmática de IL-6 não foi alterada pelo treinamento físico (C/SD: $172,1 \pm 47,7$ e C/TR: $239,6 \pm 23,7$ pg/ml). No entanto foi significativamente aumentada nos animais submetidos à falsa cirurgia (SHAM/SD: $877,0 \pm 115,2$) quando comparado aos grupos controles (C/SD e C/TR), cerca de 330 % de aumento. Os valores de IL-6 foram também consideravelmente aumentados nos animais que sofreram o processo de isquemia/reperfusão pulmonar (IR/SD: $1783,7 \pm 318,4$ e IR/TR: $1554,1 \pm 229,8$) quando comparados aos grupos C/SD, C/TR e SHAM/SD, aproximadamente 870 %, 570 % e 90 % respectivamente. Os dados estão ilustrados na Figura 6.

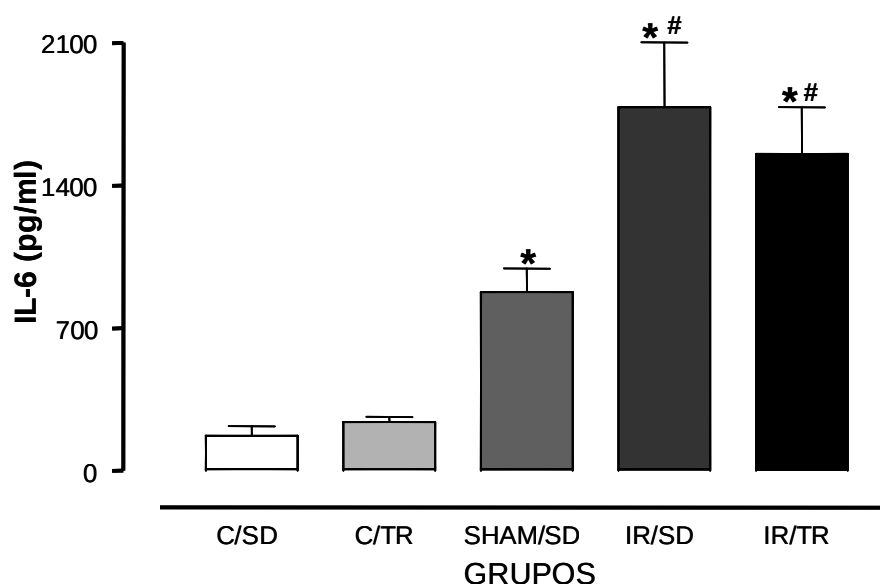


Figura 6 - Valores plasmáticos de interleucina 6 (IL-6 pg/ml) de animais dos grupos controle sedentário (C/SD), controle treinado (C/TR), falso operado sedentário (SHAM/SD), isquemia/reperfusão sedentário (IR/SD) e isquemia/reperfusão treinados (IR/TR).

Os dados são expressos como média $\pm$ SEM, n= 3 – 7 animais por grupo.

*, $p < 0,05$ comparados aos grupos C/SD e C/TR.

#, $p < 0,05$ comparados ao grupo SHAM/SD.

No grupo C/SD, de 9 amostras analisadas, 6 não foram detectadas pelo kit e no grupo C/TR, de 9 amostras analisadas, 5 não foram detectadas, tendo assim valores menores 62,5 pg/ml. Apenas as amostras detectadas foram utilizadas para o calculo da média $\pm$ SEM.

6.5 Edema pulmonar e infiltrado de neutrófilos nos pulmões

Os valores de extravasamento de proteína plasmática e a concentração de infiltrado de neutrófilos nos pulmões (UMPO) não foram alterados pelo programa de treinamento físico. No entanto, ambos parâmetros apresentaram marcante elevação em seus níveis nos animais submetidos à isquemia/reperfusão pulmonar. Estas alterações foram observadas tanto na análise individual do pulmão (edema pulmonar: tabela 1, figura 7- painel A e UMPO: tabela 2, figura 8- painel A) quando na análise conjunta dos pulmões (edema pulmonar: tabela 1, figura 7- painel B e UMPO: tabela 2, figura 8- painel B). O treinamento físico não foi capaz de reverter estas alterações advindas do processo de isquemia/reperfusão pulmonar.

Tabela 1 - Valores de extravasamento de proteína plasmática (μL) de animais dos grupos controle sedentário (C/SD), controle treinado (C/TR), falso operado sedentário (SHAM/SD), isquemia/reperfusão sedentário (IR/SD) e isquemia/reperfusão treinados (IR/TR).

Valores de extravasamento de proteínas plasmáticas			
μL			
	PULMÃO ESQUERDO	PULMÃO DIREITO	TOTAL
C/SD	74,0 $\pm$ 3,6	64,1 $\pm$ 1,4	69,1 $\pm$ 2,3
C/TR	60,7 $\pm$ 7,0	84,8 $\pm$ 5,1	72,7 $\pm$ 6,0
SHAM/SD	65,6 $\pm$ 4,8	77,3 $\pm$ 7,8	71,4 $\pm$ 4,7
IR/SD	178,0 $\pm$ 26,2*	128,4 $\pm$ 12,4*	151,0 $\pm$ 14,4*
IR/TR	144,4 $\pm$ 14,6*	117,8 $\pm$ 6,7*	129,8 $\pm$ 7,9*

Os dados são expressos como média $\pm$ SEM, n= 5 – 10 animais por grupo.

*, $p < 0,05$ comparados ao grupo C/SD, C/TR, SHAM/SD.

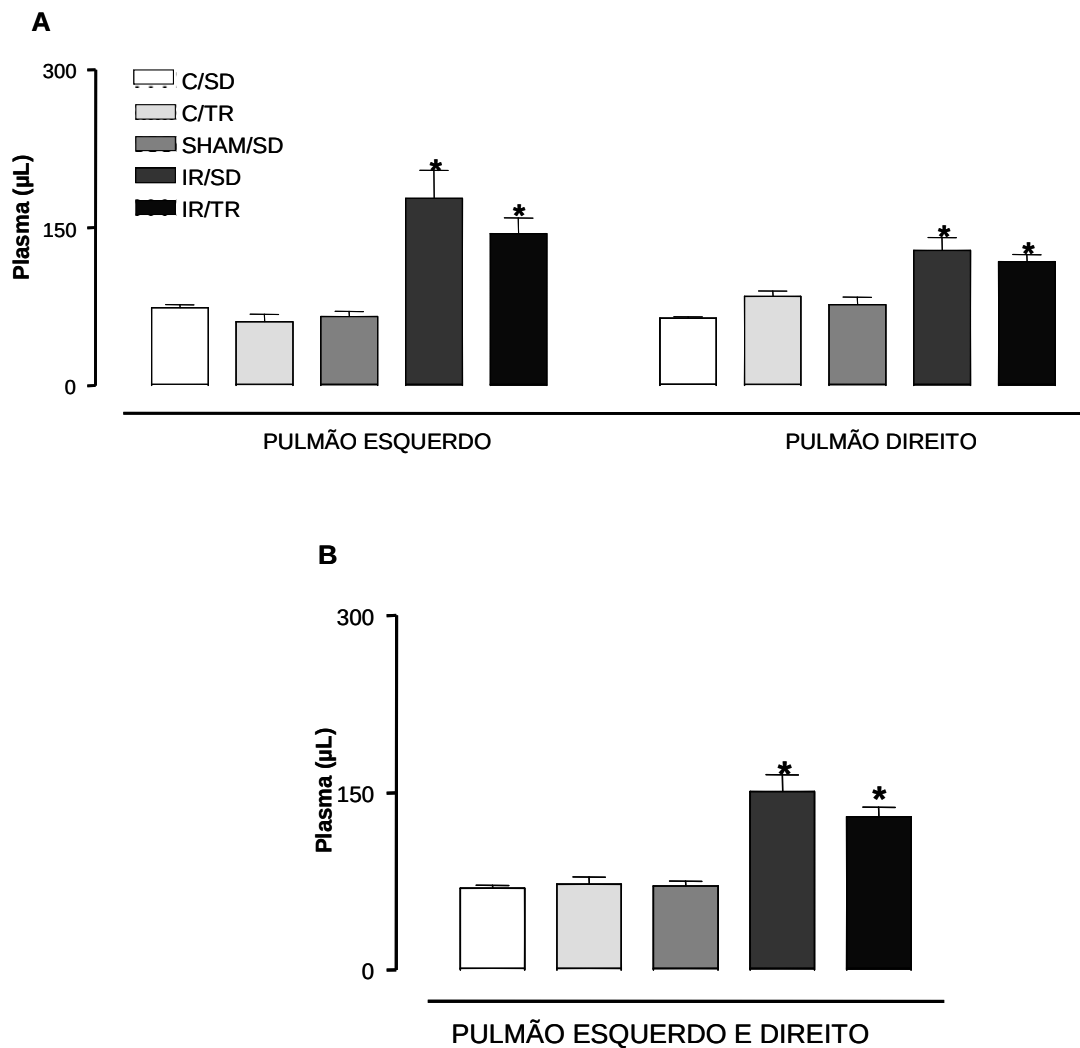


Figura 7 - Valores de extravasamento de proteína plasmática (µL) de animais dos grupos controle sedentário (C/SD), controle treinado (C/TR), falso operado sedentário (SHAM/SD), isquemia/reperfusão sedentário (IR/SD) e isquemia/reperfusão treinados (IR/TR).

Os dados são expressos como média $\pm$ SEM, $n = 5 - 10$ animais por grupo.

*, $p < 0,05$ comparados ao grupo C/SD, C/TR, SHAM/SD.

Tabela 2 - Valores da atividade de mieloperoxidase pulmonar (UMPO/mg tecido pulmonar) de animais dos grupos controle sedentário (C/SD), controle treinado (C/TR), falso operado sedentário (SHAM/SD), isquemia/reperfusão sedentário (IR/SD) e isquemia/reperfusão treinados (IR/TR).

Valores de infiltrado de neutrófilos nos pulmões			
UMPO			
	PULMÃO ESQUERDO	PULMÃO DIREITO	TOTAL
C/SD	18,0 ± 0,4	17,4 ± 1,3	17,1 ± 0,7
C/TR	14,1 ± 1,8	16,7 ± 1,8	15,4 ± 1,3
SHAM/SD	21,0 ± 3,1	20,8 ± 3,0	20,9 ± 2,1
IR/SD	36,9 ± 8,1*	54,5 ± 5,8*	46,5 ± 5,4*
IR/TR	34,1 ± 3,0*	59,0 ± 4,1*	47,7 ± 4,6*

Os dados são expressos como média ± SEM, n= 5 – 10 animais por grupo.

*, $p < 0,05$ comparados ao grupo C/SD, C/TR, SHAM/SD.

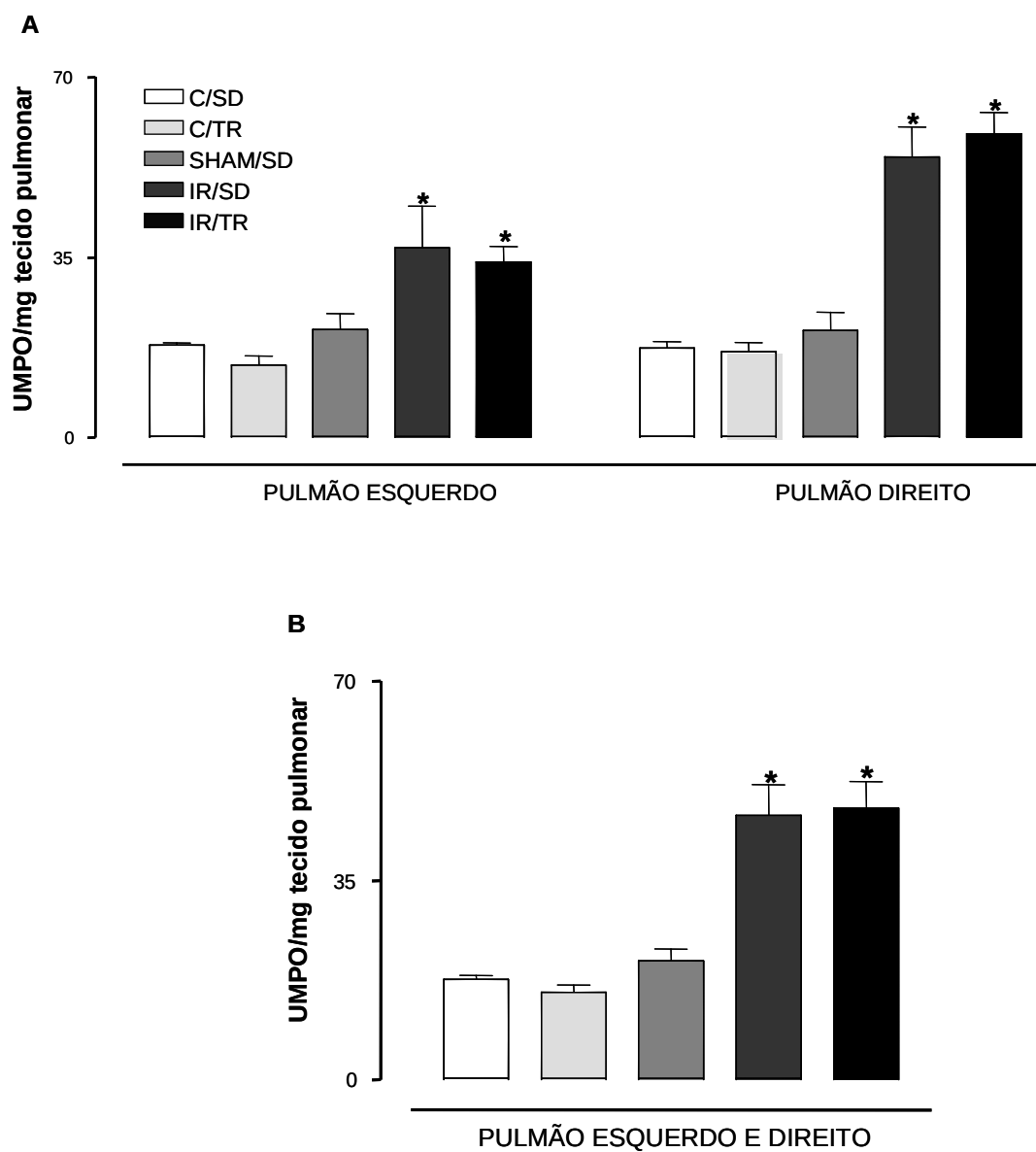


Figura 8 - Valores da atividade da mieloperoxidase pulmonar (UMPO/mg tecido pulmonar) de animais dos grupos controle sedentário (C/SD), controle treinado (C/TR), falso operado sedentário (SHAM/SD), isquemia/reperfusão sedentário (IR/SD) e isquemia/reperfusão treinados (IR/TR).

Os dados são expressos como média $\pm$ SEM, $n = 5 - 10$ animais por grupo.

*, $p < 0,05$ comparados ao grupo C/SD, C/TR, SHAM/SD.

6.6 Curvas concentração-resposta em anéis de artéria mesentérica

Os agonistas ACh (10 nM – 100 μ M) e HIST (10 nM – 100 μ M) produziram relaxamento concentração dependente em anéis de artéria mesentérica com endotélio. Redução significativa no valor de potência à ACh foi constatada no grupo submetido à isquemia/reperfusão sedentário (IR/SD), quando comparado ao grupo C/TR e IR/TR (aproximadamente 2,0 vezes, $P < 0,05$). Sendo o treinamento físico por 8 semanas capaz de prevenir essa diminuição. Não foram constatadas diferenças nos valores de resposta máxima à ACh (Tabela 3, Figura 9 painel A). Nenhuma diferença foi observada nos valores de potência e resposta máxima à HIST em todos os grupos estudados (Tabela 3, Figura 9 painel B). Os valores de potência e resposta máxima ao doador de óxido nítrico, SNP (100 pM – 1 μ M) não foram alterados em todos os grupos experimentais (Tabela 3, Figura 9 painel C).

A resposta de relaxamento induzida pelos agonistas ACh e HIST foram abolidas em anéis de artéria mesentérica com endotélio removido. Não foram observadas alterações nos valores de potência e resposta máxima para ambos os agonistas (Figura 9 painel D e E). Como esperado, a resposta relaxante induzida pelo SNP não foi afetada pela remoção do endotélio, produzindo assim relaxamento concentração dependente em anéis de artéria mesentérica. Nenhuma alteração nos valores de potência e resposta máxima ao SNP foi observada nos grupos estudados (Tabela 3, Figura 9 painel F).

PHE (1 nM – 10 μ M) e U46619 (1 nM – 1 μ M) produziram contração dependente da concentração em anéis de artéria mesentérica com endotélio intacto. Os valores de potência à PHE foram significativamente reduzidos em anéis de artéria mesentérica do grupo submetido à isquemia/reperfusão IR/SD quando comparados ao grupo C/SD (aproximadamente 2,2 vezes, $p < 0,05$). Por outro lado, o treinamento físico reverteu essa redução. Não foram observadas diferenças nos valores de resposta máxima ao agonista α -adrenérgico (Tabela 3, Figura 10 painel A). Nenhuma alteração foi observada nos valores de potência e respostas máximas ao U46619 para todos os grupos experimentais (Tabela 3, Figura 10 painel B).

Tabela 3 – Valores de potência (pEC_{50}) obtidas a partir de curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh), à histamina (HIST), ao nitroprussiato de sódio (SNP), à fenilefrina (PHE) e ao análogo do tromboxano A_2 (U46619) em anéis de artéria mesentérica na presença (E+) e na ausência (E-) de endotélio de ratos dos grupos controle sedentário (C/SD), controle treinado (C/TR), falso operado sedentário (SHAM/SD), isquemia/reperfusão sedentário (IR/SD) e isquemia/reperfusão treinados (IR/TR).

Artéria Mesentérica						
	ACh (E+)	HIST (E+)	SNP (E+)	SNP (E-)	PHE (E+)	U46619 (E+)
C/SD	7,14 ± 0,03	5,40 ± 0,08	8,30 ± 0,03	8,48 ± 0,03	7,18 ± 0,05	7,24 ± 0,06
C/TR	7,33 ± 0,07	5,36 ± 0,10	8,27 ± 0,06	8,29 ± 0,05	7,18 ± 0,04	7,28 ± 0,03
SHAM/SD	7,10 ± 0,14	5,33 ± 0,05	8,27 ± 0,03	8,51 ± 0,06	7,03 ± 0,04	7,09 ± 0,19
IR/SD	7,04 ± 0,04*	5,30 ± 0,06	8,32 ± 0,07	8,44 ± 0,03	6,84 ± 0,05 [#]	7,12 ± 0,04
IR/TR	7,25 ± 0,04	5,26 ± 0,09	8,27 ± 0,06	8,41 ± 0,08	7,13 ± 0,06	7,29 ± 0,05

Valores de potência são representados como $-\log$ da concentração do agonista necessária para produzir 50 % da resposta máxima.

Os dados são expressos como média ± SEM, n= 7-11 animais por grupo.

*, $p < 0,05$ comparado ao grupo C/TR e IR/TR.

[#], $p < 0,05$ comparado aos grupos C/SD, C/TR e IR/TR.

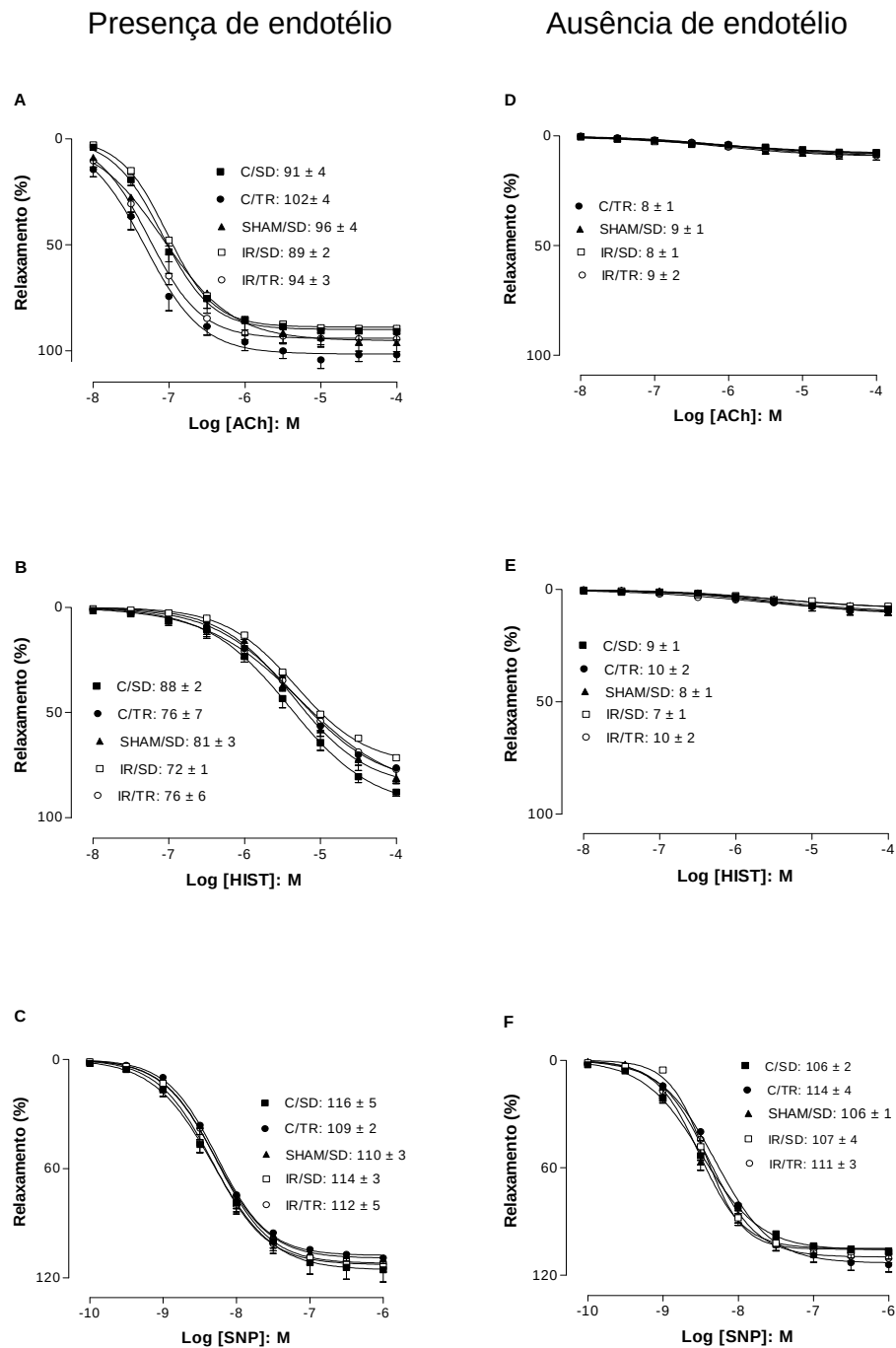


Figura 9 – Curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh, painel A e D), histamina (HIST, painel B e E) e nitroprussiato de sódio (SNP, painel C e F) em anéis de artéria mesentérica na presença (esquerda) e na ausência (direita) de endotélio de ratos dos grupos experimentais: controle sedentário (■: C/SD), controle treinado (●: C/TR), falso operado sedentário (▲: SHAM/SD), isquemia/reperfusão sedentário (□: IR/SD) e isquemia/reperfusão treinados (○: IR/TR). Respostas máximas estão inseridas na figura. Os dados estão expressos como média ± SEM, n= 7 – 11 animais por grupo.

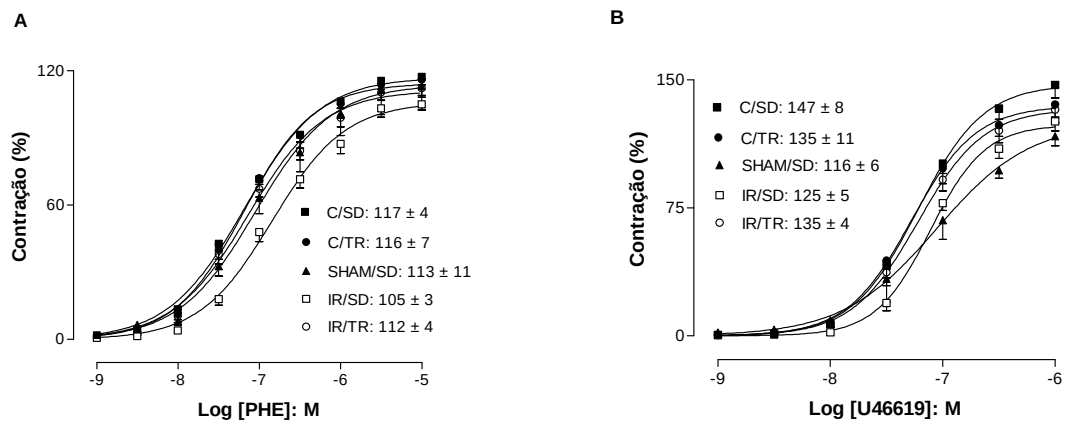


Figura 10 – Curvas concentração-resposta à fenilefrina (PHE, painel A) e ao análogo do tronboxano A₂ (U46619, painel B) em anéis de artéria mesentérica na presença de endotélio de ratos dos grupos experimentais: controle sedentário (■: C/SD), controle treinado (●: C/TR), falso operado sedentário (▲: SHAM/SD), isquemia/reperfusão sedentário (□: IR/SD) e isquemia/reperfusão treinados (○: IR/TR). Respostas máximas estão inseridas na figura. Os dados estão expressos como média $\pm$ SEM, n= 7 – 11 animais por grupo.

6.7 Curvas concentração-resposta em anéis de artéria pulmonar

Os agonistas ACh (10 nM – 100 μ M) e HIST (100 nM – 1 mM) produziram relaxamento concentração dependente em anéis de artéria pulmonar. No entanto, não houve alterações nos valores de potência e resposta máximas para ambos os agonistas (Tabela 4, Figura 11 painel A e B). Por outro lado, os valores de potência ao doador de óxido nítrico, SNP (100 pM – 3 μ M) foram significativamente diminuídos nos anéis de artéria pulmonar do grupo IR/SD quando comparado aos grupos treinados C/TR e IR/TR (aproximadamente 2,4 vezes, $p<0,05$). Nenhuma alteração foi observada nos valores de respostas máximas (Tabela 4, Figura 11 painel C).

A resposta de relaxamento induzida pelos agonistas ACh e HIST foram abolidas em anéis de artéria pulmonar com endotélio removido. Não foram observadas alterações nos valores de potência e resposta máxima para ambos os agonistas (Figura 11 painel D e E). Como esperado, a resposta relaxante induzida pelo SNP não foi afetada pela remoção do endotélio, produzindo assim relaxamento concentração dependente em anéis de artéria pulmonar. Foi observada diminuição significativa no valor de potência ao SNP do grupo IR/SD quando comparado aos grupos treinado C/TR e IR/TR (aproximadamente 2,7 vezes, $p<0,05$). Nenhuma alteração foi observada nos valores de respostas máximas ao SNP (Tabela 4, Figura 11 painel F).

Os agentes contráteis PHE (1 nM – 10 μ M) e U46619 (1 nM – 1 μ M) produziram contração dependente de concentração em anéis de artéria pulmonar. Os valores de potência à PHE foram significativamente reduzidos nos anéis de artéria pulmonar do grupo IR/SD e essa redução não foi modificada pelo treinamento físico no grupo IR/TR (aproximadamente 3,0 vezes e 4,0 vezes respectivamente, $p<0,05$), quando comparados aos demais grupos C/SD, C/TR e SHAM/SD. Não foram observadas diferenças nos valores de resposta máxima ao agonista α -adrenérgico (Tabela 4, Figura 12 painel A). Nenhuma alteração foi observada nos valores de potência ou de resposta máxima ao U46619 para todos os grupos (Tabela 4, Figura 12 painel B).

Tabela 4 – Valores de potência (pEC_{50}) obtidas a partir de curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh), à histamina (HIST), ao nitroprussiato de sódio (SNP), à fenilefrina (PHE) e ao análogo do tromboxano A_2 (U46619) em anéis de artéria pulmonar na presença (E+) e na ausência (E-) de endotélio de ratos dos grupos experimentais: controle sedentário (C/SD), controle treinado (C/TR), falso operado sedentário (SHAM/SD), isquemia/reperfusão sedentário (IR/SD) e isquemia/reperfusão treinados (IR/TR).

Artéria Pulmonar						
	ACh (E+)	HIST (E+)	SNP (E+)	SNP (E-)	PHE (E+)	U46619 (E+)
C/SD	6,74 ± 0,05	5,08 ± 0,09	8,08 ± 0,04	8,04 ± 0,04	7,34 ± 0,05	7,28 ± 0,05
C/TR	6,85 ± 0,09	5,06 ± 0,07	8,27 ± 0,09	8,35 ± 0,06	7,25 ± 0,06	7,22 ± 0,05
SHAM/SD	6,76 ± 0,12	5,27 ± 0,11	8,08 ± 0,06	8,03 ± 0,05	7,28 ± 0,11	7,13 ± 0,08
IR/SD	6,79 ± 0,08	5,25 ± 0,07	7,89 ± 0,03*	7,92 ± 0,04*	6,77 ± 0,05 [#]	7,05 ± 0,09
IR/TR	6,95 ± 0,04	5,06 ± 0,06	8,26 ± 0,08	8,19 ± 0,05	6,63 ± 0,04 [#]	7,13 ± 0,04

Valores de potência são representados como -log da concentração do agonista necessária para produzir 50 % da resposta máxima.

Os dados são expressos como média ± SEM, n= 5 – 9 animais por grupo.

*, $p < 0,05$ comparado ao grupo C/TR e IR/TR.

[#], $p < 0,05$ comparado ao grupos C/SD, C/TR e SHAM/SD.

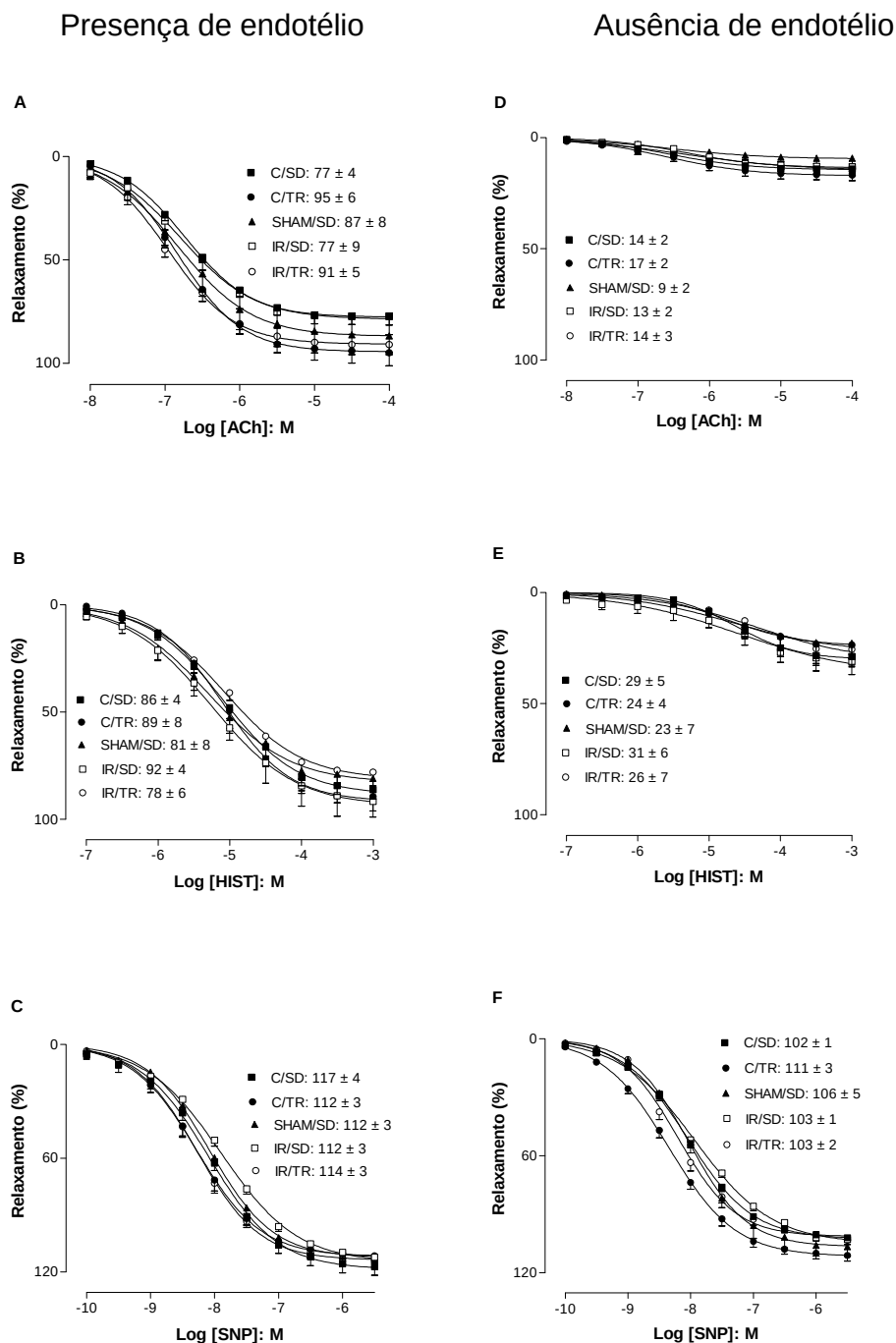


Figura 11 – Curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh, painel A e D), histamina (HIST, painel B e E) e nitroprussiato de sódio (SNP, painel C e F) em anéis de artéria pulmonar na presença (esquerda) e na ausência (direita) de endotélio de ratos dos grupos experimentais: controle sedentário (■: C/SD), controle treinado (●: C/TR), falso operado sedentário (▲: SHAM/SD), isquemia/reperfusão sedentário (□: IR/SD) e isquemia/reperfusão treinados (○: IR/TR). Respostas máximas estão inseridas na figura. Os dados estão expressos como média ± SEM, n= 7 – 11 animais por grupo.

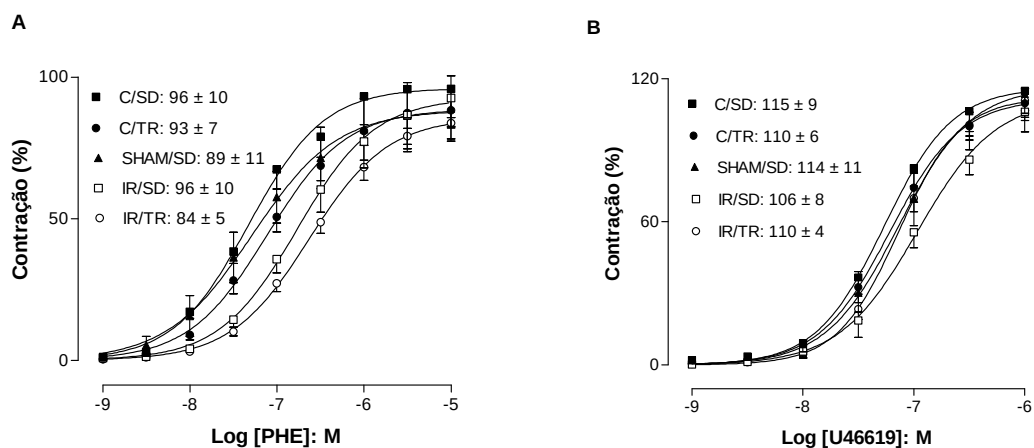


Figura 12 – Curvas concentração-resposta à fenilefrina (PHE, painel A) e ao análogo do tromboxano A_2 (U46619, painel B) em anéis de artéria pulmonar de ratos dos grupos experimentais: controle sedentário (■: C/SD), controle treinado (●: C/TR), falso operado sedentário (▲: SHAM/SD), isquemia/reperfusão sedentário (□: IR/SD) e isquemia/reperfusão treinados (○: IR/TR). Respostas máximas estão inseridas na figura. Os dados estão expressos como média $\pm$ SEM, $n = 5 - 9$ animais por grupo.

6.8 Expressões da nNOS, Cu/Zn SOD-1 e p47^{phox} em artéria mesentérica

A expressão da isoforma neuronal da sintase do óxido nítrico, nNOS, foi determinada em artéria mesentérica. Tanto o treinamento físico como o processo de isquemia/reperfusão pulmonar não modificaram a expressão da nNOS na artéria mesentérica (Figura 13, painel A). A expressão da enzima antioxidante Cu/Zn SOD-1 e da sub-unidade citoplasmática da NADPH p47^{phox} oxidante foram quantificadas. De maneira similar, nenhuma diferença foi encontrada na expressão dessas enzimas entre os grupos estudados (Figura 13, painel B Cu/Zn SOD-1 e painel C p47^{phox}). Resultados confiáveis da quantificação da expressão para eNOS, iNOS, TNF- α e IL-6 em artéria mesentérica não foram obtidos.

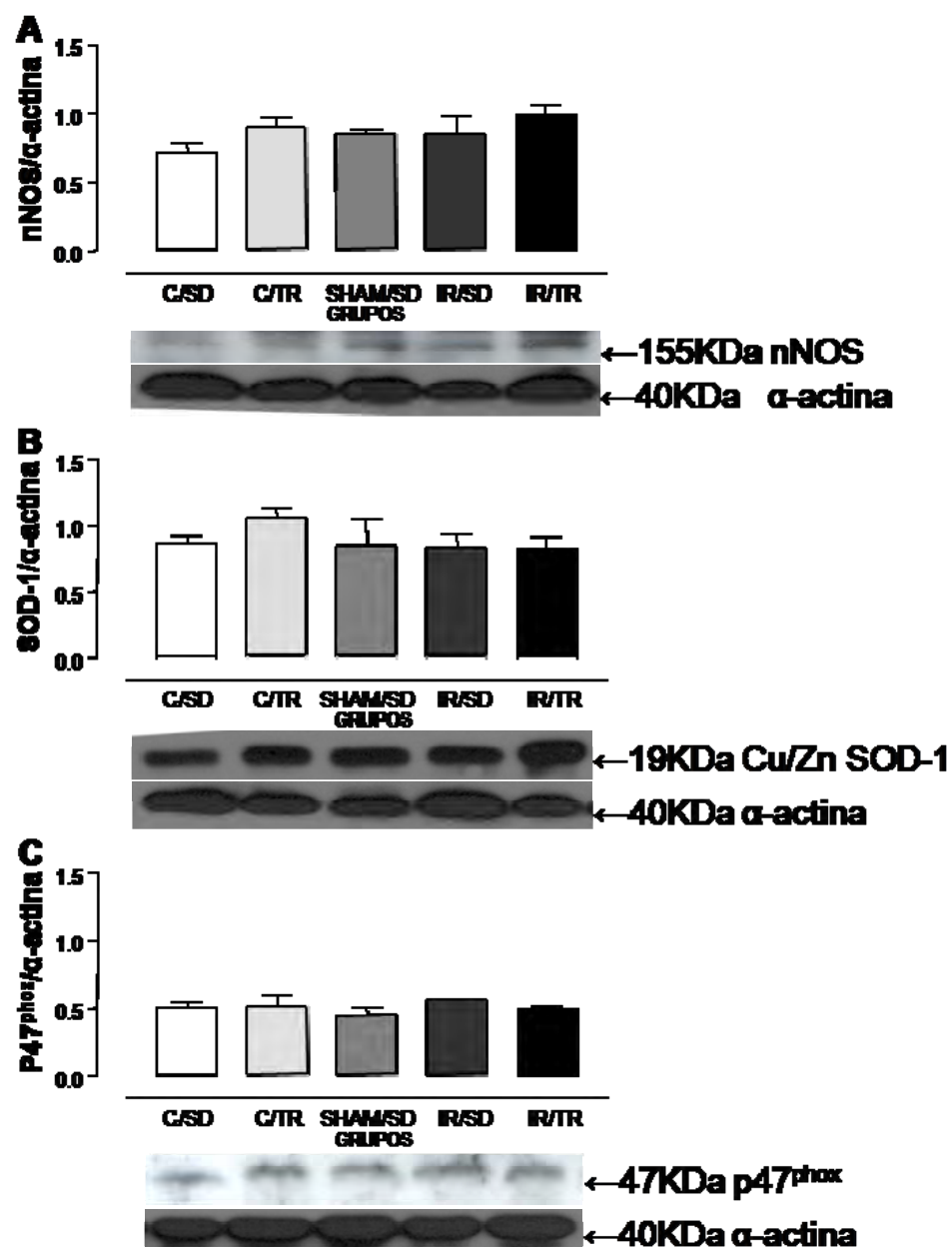
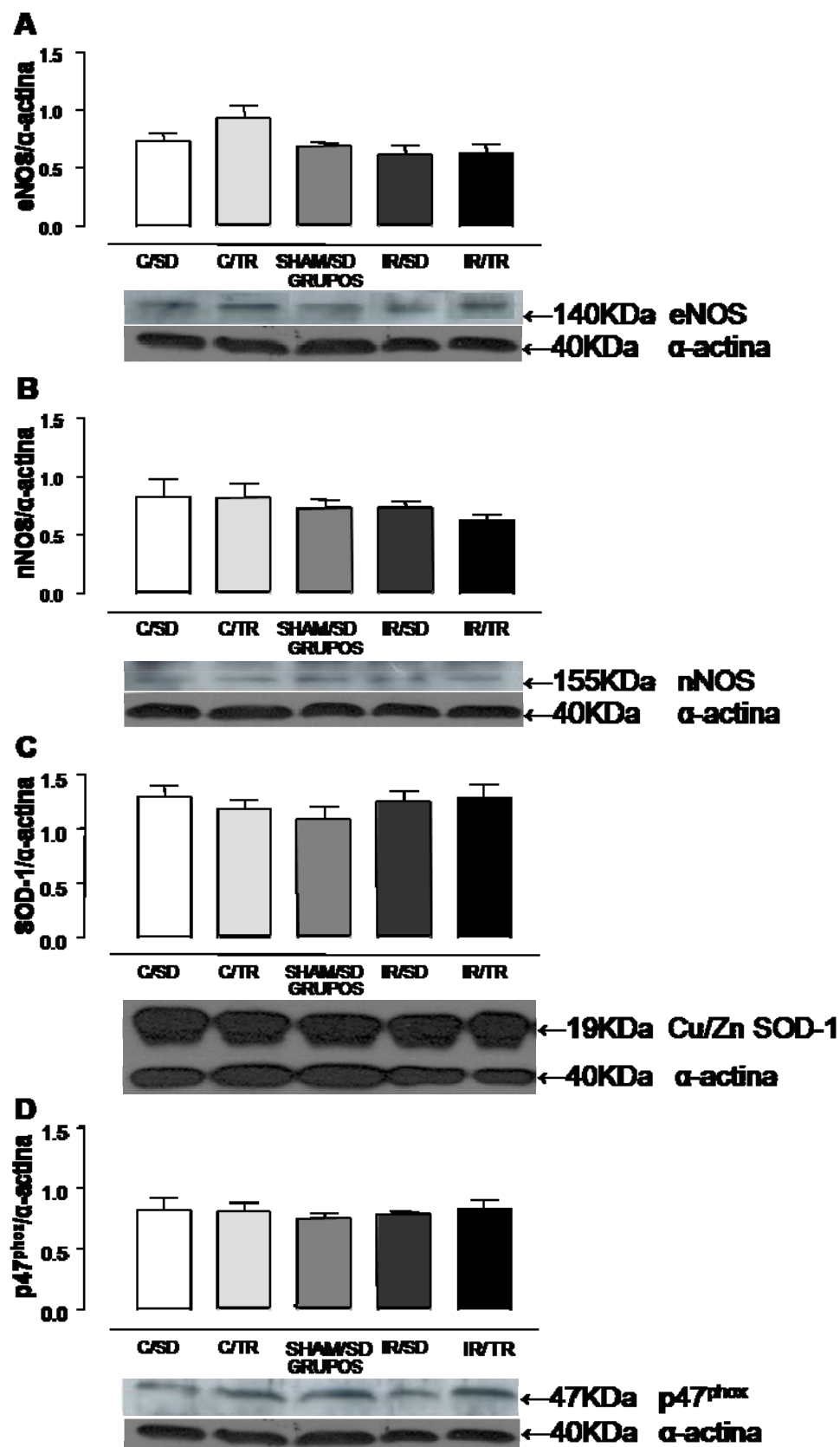


Figura 13 – Expressão da nNOS (A), Cu/Zn SOD-1 (B) e da p47^{phox} (C) em artéria mesentérica de ratos dos grupos controle sedentário (C/SD), controle treinado (C/TR), falso operado sedentário (SHAM/SD), isquemia/reperfusão sedentário (IR/SD) e isquemia/reperfusão treinados (IR/TR). Pesos moleculares foram inseridos na figura. Os dados são mostrados como média $\pm$ SEM, n= 4 – 5 animais por grupo.

6.9 Expressões da eNOS, nNOS, Cu/Zn SOD-1, p47^{phox} e TNF- α em artéria pulmonar

A expressão da isoforma endotelial e neuronal da sintase do oxido nítrico, eNOS e nNOS, respectivamente, foram determinadas em artéria pulmonar. Tanto o treinamento físico como o processo de isquemia/reperfusão pulmonar não alteraram a expressão dessas enzimas (Figura 14, painel A eNOS e painel B nNOS). A expressão da enzima antioxidante Cu/Zn SOD-1 e da sub-unidade citolósica da NADPH p47^{phox} oxidante foram quantificadas e de maneira similar nenhuma diferença foi encontrada em todos os grupos experimentais (Figura 14, painel C Cu/Zn SOD-1 e painel D p47^{phox}).

Por outro lado, foi verificado aumento da expressão de TNF- α em artéria pulmonar dos animais submetidos ao processo de isquemia/reperfusão pulmonar (IR/SD e I/TR) quando comparados aos demais grupos experimentais (C/SD, C/TR e SHAM/SD). O treinamento físico não reverteu esse aumento (Figura 14, painel E). Resultados confiáveis da quantificação da expressão para iNOS e IL-6 em artéria pulmonar não foram obtidos.



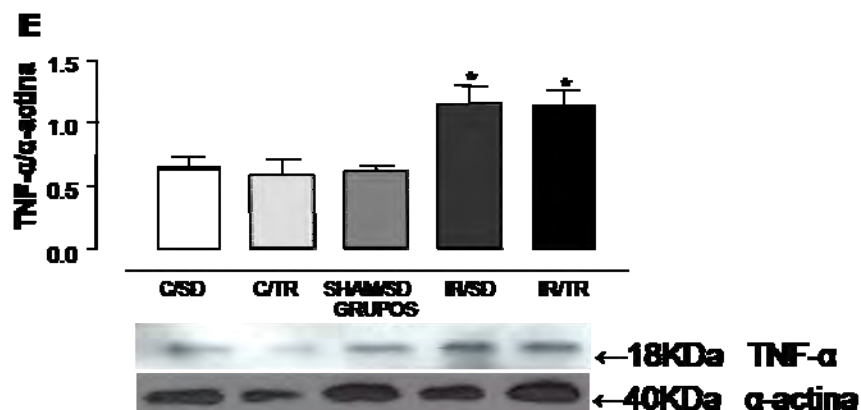


Figura 14 – Expressão da eNOS (A), nNOS (B), Cu/Zn SOD-1 (C), da p47^{phox} (D) e do TNF- α (E) em artéria pulmonar de ratos dos grupos controle sedentário (C/SD), controle treinado (C/TR), falso operado sedentário (SHAM/SD), isquemia/reperfusão sedentário (IR/SD) e isquemia/reperfusão treinados (IR/TR). Pesos moleculares foram inseridos na figura. Os dados são mostrados como média $\pm$ SEM, n= 5 – 6 animais por grupo.

7. SUMÁRIO DOS RESULTADOS

- ✓ Diminuição de 12% do peso corporal nos grupos C/TR e IR/TR;
- ✓ Aumento nos valores plasmáticos de NO_x^- , SOD e IL-6 nos grupos IR/SD e IR/TR;
- ✓ Aumento nos valores de extravasamento de proteínas plasmáticas e infiltrado de neutrófilos nos pulmões nos grupos IR/SD e IR/TR;

ARTÉRIA MESENTÉRICA

- ✓ Diminuição da potência à ACh em anéis de artéria mesentérica com endotélio no grupo IR/SD;
- ✓ Diminuição da potência à PHE em anéis de artéria mesentérica com endotélio no grupo IR/SD;

ARTÉRIA PULMONAR

- ✓ Diminuição da potência ao SNP em anéis de artéria pulmonar com endotélio no grupo IR/SD;
- ✓ Diminuição da potência à PHE em anéis de artéria pulmonar com endotélio nos grupos IR/SD e IR/TR;
- ✓ Aumento da expressão do $\text{TNF-}\alpha$ em artéria pulmonar nos grupos IR/SD e IR/TR.

8. DISCUSSÃO

O presente trabalho mostra que o treinamento físico previne as alterações de sensibilidade aos agonistas acetilcolina e fenilefrina em artéria mesentérica induzida pelo processo de isquemia/reperfusão pulmonar. Por outro lado, o treinamento físico não foi eficaz em atenuar as modificações observadas para o agonista fenilefrina em artéria pulmonar.

O estilo de vida saudável está associado à prática regular de exercício físico, e evidências mostram que sujeitos fisicamente ativos possuem maior longevidade e redução na taxa de morbidade e mortalidade. O exercício físico regular promove efeitos benéficos à saúde prevenindo ou reduzindo efeitos deletérios de diversas doenças como hipertensão arterial, doença arterial coronariana, aterosclerose, diabetes mellitus, osteoporose, doença de Parkinson e Alzheimer (KINGWELL, 2000; DELBIN; MORAES; ZANESCO, 2004; PRIVIERO et al., 2004). Os benefícios da prática regular de exercício físico também estão associados ao controle do peso corporal (DONNELLY et al., 2004).

Nosso estudo mostrou diminuição significativa do peso corporal dos grupos treinados quando comparados aos grupos sedentários, mostrando a eficácia do treinamento físico empregado. Estes dados confirmam estudos anteriores em nosso laboratório que também demonstraram diminuição do peso corporal de grupos submetidos ao treinamento quando comparados aos grupos experimentais sedentários (PRIVIERO et al., 2004; CLAUDINO et al., 2007; MORAES et al., 2008).

Em relação à pressão arterial sistólica, trabalhos prévios mostram que a redução da pressão arterial após o exercício crônico é maior em indivíduos hipertensos do que em normotensos, tanto para humanos quanto em animais de laboratório (DUNCAN et al., 1985; KENNEY e SEALS, 1993; KOKKINOS e PAPADEMETRIOU, 2000; LASH, 1998; FAGARD, 2006; NUNES et al., 2006). Como esperado, nenhuma alteração em relação à pressão arterial sistólica final foi verificada em nosso protocolo experimental quando comparamos os grupos treinados e sedentários, confirmando assim estudos anteriores.

Dados experimentais relacionados à glicemia sanguínea mostram que o exercício físico é um componente essencial no tratamento do diabetes mellitus, e

estudos recentes constataram que o exercício físico aeróbio e de resistência são capazes de reduzir os valores de glicemia sanguínea em diabéticos. No entanto essas alterações não são constatadas em sujeitos normais ou saudáveis, tanto em animais de laboratório quanto em humanos (WU; YANG; LI, 2000; CONG e CHEN, 2001; OBERBACH et al., 2006; COLBERG, 2007; SIGAL, et al., 2007). Nenhuma alteração em relação à glicemia sanguínea final foi verificada em nosso protocolo experimental quando comparamos os grupos treinados e sedentários, confirmando assim estudos anteriores (TANCRÈDE; ROUSSEAU-MIGNERON; NADEAU, 1982; GOODYEAR et al., 1988; SIGAL, et al., 2007;).

Embora o sistema inflamatório participe na lesão de reperfusão pulmonar, o tempo e o envolvimento exato em que cada um dos componentes humorais e celulares promovem estes danos não estão bem esclarecidos. Participam desse processo, diversas células e citocinas inflamatórias. Os neutrófilos são conhecidos como uma das principais células responsáveis na resposta inflamatória, sendo reconhecidos como componentes críticos da cascata inflamatória. Vários modelos experimentais demonstraram ativação neutrofílica em tecidos pós-isquêmicos. Observou-se que a isquemia provoca aumento significativo da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) neutrofílica, que é exacerbada pela reperfusão tecidual (KUROSE e GRANGER, 1994; ZIMMERMAN e GRANGER, 1994). Assim, a medida de MPO é uma medida indireta da infiltração de neutrófilos. Nosso estudo constatou aumento significativo na atividade da MPO em ambos os pulmões, esquerdo e direito, após o processo de isquemia/reperfusão pulmonar indicando assim elevação na infiltração de neutrófilos no tecido pulmonar. Dados anteriores de nosso grupo mostraram que o treinamento físico não modifica a elevação da atividade da MPO (MUSSI et al., 2008).

Outro fator importante na lesão de isquemia/reperfusão é o extravasamento de proteínas que está diretamente relacionado ao aumento da permeabilidade vascular levando ao edema. O edema por sua vez dificulta a utilização de oxigênio pelas células aumentando a distância entre a mitocôndria e o capilar (SCHUMACKER e SANSEL, 1989). Nossos resultados mostram aumento significativo do extravasamento de proteínas plasmáticas nos pulmões dos grupos submetidos à isquemia/reperfusão caracterizando a gravidade do quadro de isquemia/reperfusão. Por outro lado, o

treinamento físico não foi capaz de modificar estas alterações, demonstrando apenas uma tendência a redução do extravasamento. Estudo anterior de nosso grupo também verificou aumento do extravasamento de proteínas em modelos experimentais de isquemia/reperfusão pulmonar, mas diferentemente dos nossos resultados, o treinamento físico foi eficaz em atenuar a formação do edema (MUSSI et al., 2008). A razão para isso não é clara para nós, neste momento.

A gênese da resposta inflamatória pulmonar envolve a produção de citocinas advindas da membrana celular tanto dos capilares quanto dos alvéolos (BHATHIA e MOOCHHALA, 2004). Posteriormente, as citocinas TNF- α e IL-1 β , produzidas pelos macrófagos alveolares, e a migração de neutrófilos exacerbam o processo inflamatório (MAXEY et al., 2004; NAIDU et al., 2004). A elevação dessas citocinas pró-inflamatórias estão relacionadas ao aumento da permeabilidade capilar pulmonar e edema pulmonar, indicando que estas citocinas são importantes mediadores da resposta inflamatória nos estágios iniciais da lesão de isquemia/reperfusão pulmonar (NG et al., 2006). Estudos mostram aumento nas concentrações destas duas citocinas após o processo de isquemia/reperfusão pulmonar (PALACE et al., 1993; KHIMENKO et al., 1998; KRISHNADASAN et al., 2003; MUSSI et al., 2008). Em nosso estudo a medida da expressão protéica de TNF- α em artéria pulmonar foi significativamente aumentada nos animais submetidos ao processo de isquemia/reperfusão, e o treinamento não modificou essa elevação. A resposta na produção de citocinas frente ao exercício físico se difere da resposta inflamatória encontrada nas situações de IR, em geral as citocinas clássicas como TNF- α e IL-1 β não se elevam ao exercício físico e tipicamente a primeira citocina elevada e encontrada na circulação em resposta ao exercício físico é a IL-6, indicando uma diferença na cascata de liberação (PETERSEN e PEDERSEN, 2005).

O papel da IL-6 no transplante pulmonar e nas lesões de isquemia/reperfusão pulmonar ainda não está esclarecido. Aumento nos níveis de IL-6 em vias aéreas e tecido pulmonar lesionado após estímulo inflamatório e também em condições de sepse e traumas foram encontrados em vários trabalhos (HACK et al., 1997; GIANNOUDIS et al., 1998; RIZZO et al., 2000; TENG et al., 2004). Por outro lado, estudo realizado por FARIVAR et al. (2006) constatou que a administração de IL-6 previamente ao processo

de isquemia/reperfusão pulmonar promovia ação protetora a vários parâmetros de lesão tecidual pulmonar, e estava associado à redução da secreção de mediadores pró-inflamatórios. Em nosso estudo, os níveis de IL-6 foram significativamente aumentados no grupo SHAM/SD e este aumento foi exarcebado nos grupos submetidos à isquemia/reperfusão IR/SD e IR/TR, demonstrando associação positiva com o processo de isquemia/reperfusão pulmonar. No entanto, o exato papel da IL-6 na lesão de isquemia/reperfusão pulmonar ainda não está claro.

Os níveis de nitrato e nitrito plasmático (NO_x^-) foram significativamente aumentados em ambos os grupos submetidos a isquemia/reperfusão IR/SD e IR/TR. Esta elevação não foi associada às respostas relaxantes induzidas pela acetilcolina e histamina, uma vez que não observamos qualquer alteração na sensibilidade ao agonista histamina, e a resposta a acetilcolina foi reduzida em anéis de mesentérica de animais IR/SD. Assim, a elevada concentração plasmática de NO_x^- pode ser resultado da ativação leucocitária em resposta a intensa inflamação induzida no processo de isquemia/reperfusão pulmonar, que são capazes de ativar a isoforma induzível da NO sintase (iNOS) levando a produção maciça de NO.

Todos esses parâmetros analisados em conjunto mostram que o processo de isquemia/reperfusão pulmonar promove um intenso processo inflamatório local e sistêmico, onde o treinamento físico prévio não foi capaz de atenuar essa resposta diretamente.

Artéria mesentérica: resposta relaxante dependente do endotélio

A sensibilidade ao agonista relaxante acetilcolina em anéis de artéria mesentérica foi reduzida pela isquemia/reperfusão pulmonar que foi revertida pelo treinamento físico, sendo neste caso o treinamento importante na prevenção dessas alterações. Os mecanismos pelos quais o treinamento físico promove efeitos benéficos no sistema cardiovascular são múltiplos e complexos, envolvendo aumento na produção de NO pelas células endoteliais, aumento de expressão do gene da sintase do NO endotelial (eNOS), diminuição do NO inativo com melhora do sistema antioxidante, como superóxido dimutase (SOD), e glutatona peroxidase, diminuição da atividade oxidante de NADH e NADPH e angiogênese do tecido endotelial vascular

(RUSH; TURK e LAUGHLIN, 2003; THOMPSON et al., 2004; HIGASHI e YOSHIZUMI, 2004; ROBERTS et al., 2006).

A partir destes resultados em anéis de mesentérica, passamos a investigar os mecanismos pelos quais o treinamento físico reverteu as alterações provocadas pelo processo de isquemia/reperfusão. Primeiramente, avaliamos a expressão da eNOS e nNOS. Nossos resultados falharam em mostrar uma correlação positiva entre as expressões protéicas das sintases do NO, eNOS e nNOS, em anéis de artéria mesentérica e a melhora da resposta relaxante induzida pelo treinamento físico. Embora a medida da produção de NO e/ou a expressão da eNOS sejam usados como marcadores para avaliar os efeitos do exercício na resposta vascular, nem todos os trabalhos conseguiram encontrar uma direta correlação entre estes marcadores (OLTMAN et al., 1992; McALLISTER et al.; 1996; JASPERSE E LAUGHLIN; 1999, RUSH et al., 2003; WOODMAN et al.; 2005).

A etapa seguinte foi avaliar a atividade da SOD plasmática e sua expressão protéica no tecido vascular de anéis de mesentérica. Nossos resultados mostraram um maior aumento na atividade da SOD plasmática no grupo submetido ao treinamento físico (IR/TR: 70 %) quando comparada ao grupo sedentário (IR/SD: 40 %). Por outro lado, a expressão protéica da SOD em anéis de mesentérica não foi modificada pelo treinamento físico.

O exercício físico de intensidade moderada contribui de maneira positiva para a redução do estresse oxidativo, e isso pode ocorrer pelo aumento da atividade antioxidante como também em alguns casos pela redução da atividade pró-oxidante (HIGASHI E YOSHIZUMI, 2004; KOJDA E HAMBRECHT, 2005). Trabalho prévio mostra que a melhora da resposta relaxante em resposta ao treinamento físico pode ser também devido a redução da expressão de enzimas oxidantes, como a NADPH oxidase. As sub-unidades da NADPH oxidase têm sido identificadas em células vasculares como p47^{phox}, p67^{phox} e gp91^{phox} (REY e PAGANO, 2002; LASSÈGUE e CLEMPUS, 2003; TOUYZ; YAO; SCHIFFRIN, 2003). Muitos estudos confirmaram também a presença da p22^{phox} em todos os sistemas da NADPH oxidase e sugerem que esta sub-unidade é essencial ao funcionamento desta enzima oxidante (USHIO-FUKAI et al., 1996; LASSÈGUE e CLEMPUS, 2003). No entanto a expressão dessas

sub-unidades não são facilmente detectadas em células endoteliais e do músculo liso vascular, apenas a p47^{phox} e a p22^{phox} parecem ser consistentemente expressas e mais abundantes do que as expressões de p67^{phox} e gp91^{phox} (LI e SHAH, 2001). Nosso estudo mostrou que a expressão protéica da sub-unidade da NADPH oxidase, a p47^{phox} não foi alterada por qualquer tratamento experimental excluindo assim a via das enzimas oxidantes na dessensibilização da resposta dependente de endotélio induzida pela isquemia/reperfusão pulmonar bem como a participação desta sub-unidade da reversão do fenômeno.

Artéria pulmonar: resposta relaxante independente do endotélio (SNP)

A potência ao doador de NO, nitroprussiato de sódio (SNP) foi significativamente reduzida no grupo IR/SD comparado aos grupos C/TR e IR/TR em anéis de artéria pulmonar com endotélio intacto. Como esperado, a resposta de relaxamento induzida pelo SNP não foi afetada pela remoção do endotélio vascular em nosso estudo, demonstrando assim ser uma droga de ação independente de endotélio, pois age diretamente no músculo liso doando moléculas de NO. Os mecanismos pelos quais a isquemia/reperfusão pulmonar e/ou treinamento físico alteram o caminho de sinalização do GMPc ainda não são claros. Estudos evidenciaram que a isquemia/reperfusão induz a diminuição dos níveis de GMPc no tecido pulmonar (PINSKY et al., 1994; PINSKY et al., 1995). Estes resultados também foram encontrados em condição de hipoxia crônica em células do músculo liso vascular pulmonar (PENG et al., 1997). A reversão da atenuação da resposta relaxante ao SNP em resposta ao exercício físico poderia ser devido a capacidade anti-oxidante que foi observada pela elevação da atividade da SOD plasmática, o que levaria ao aumento na via de sinalização ao GMPc uma vez que a ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs), e subsequente acúmulo de GMPc é o mecanismo primário de relaxamento induzido pelo SNP. Além disso, estudos prévios têm mostrado que o inibidor de GCs, ODQ, é capaz de abolir completamente o relaxamento induzido pelo SNP, mas não ao óxido nítrico em artéria umbilical de humanos (LOVREN e TRIGGLE, 2000).

Artérias mesentérica e pulmonar: resposta contrátil

Em relação à resposta contrátil após o processo de isquemia/reperfusão os resultados existentes são conflitantes. Estudos mostram aumento na potência e na resposta máxima a fenilefrina (PHE) em anéis de artéria mesentérica (KOKSOY et al., 2000; DOGUET et al., 2004). Por outro lado, outro estudo não constatou qualquer diferença na resposta à PHE em anéis de artéria aorta (TOKUNO et al., 2002). Nosso estudo mostra que a resposta contrátil a PHE em anéis de artéria mesentérica e pulmonar de ratos submetidos à isquemia/reperfusão está diminuída. Essa dessensibilização da resposta contrátil mediada pelos receptores α -adrenérgicos pode ser consequência da elevação da atividade simpática em resposta ao processo de isquemia/reperfusão. Assim, é plausível admitir que a subsensibilidade ao agonista PHE em anéis de artéria pulmonar e mesentérica seja resultado de maior ativação simpática neste modelo experimental. Estudos prévios evidenciaram uma elevação nos níveis de catecolaminas após o processo de isquemia/reperfusão (WALLACH et al., 1980; REVES et al., 1984). Trabalho prévio de nosso laboratório mostrou que a excessiva estimulação dos receptores adrenérgicos pelas catecolaminas pode gerar a dessensibilização da resposta mediada pelos receptores adrenérgicos (ZANESCO et al., 1997). Além disso, nossos resultados são reforçados pela ausência de alterações na resposta contrátil ao análogo no tramboxano A_2 , U46619.

O treinamento físico por 8 semanas foi capaz de reverter a dessensibilização da resposta contrátil a PHE, apenas em anéis de artéria mesentérica, mostrando que o exercício físico restaura a resposta vascular mediada pelos receptores α -adrenérgicos, na tentativa de manter a homeostase cardiovascular sistêmica em um processo de isquemia/reperfusão. Por outro lado, o treinamento físico não foi eficaz em atenuar essas modificações na artéria pulmonar, sugerindo que as alterações locais não são afetadas pelo treinamento físico.

9. CONCLUSÃO

O presente trabalho mostra que o treinamento físico previne as alterações de sensibilidade aos agonistas acetilcolina e fenilefrina em artéria mesentérica induzida pelo processo de isquemia/reperfusão pulmonar, promovendo efeitos benéficos sistêmicos importantes para o controle da homeostasia cardiovascular.

Por outro lado, o treinamento físico não foi eficaz em atenuar as modificações observadas para o agonista fenilefrina em artéria pulmonar e estas alterações foram positivamente associadas com elevação na concentração de TNF- α , sugerindo que as alterações locais não são afetadas pelo treinamento físico.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELDA, S.M.; BUCK, C.A. Integrins and the other cell adhesion molecules. **FASEB J**, v. 4, p. 2868-2880, 1990.

ANDREJAITIENE, J.; SIRVINSKAS E.; BAZELIENE R. Prevention of pulmonary alterations cardiopulmonary bypass. **Medicina**, v. 40, n. 6, p. 517-521, 2004.

ANTONIAZZI, P. et al. Síndrome da angústia respiratória aguda (SARA). **Medicina**, v. 31, p. 493-506, 1998.

ASHARAF, M.; ZHAI, X. Patophysiology of myocardial reperfusion injury: role of oxygen free radicals. **Transplant Proc**, v. 27, p. 2000-2001, 1995.

BAYRAKTUTAN, U.; BLAYNEY, L.; SHAN, A.M. Molecular characterization and localization of the NAD(P)H oxidase components gp91-phox and p22-phox in endothelial cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 20, p. 1903-1911, 2000.

BANDA, M.A.; LEFER, D.J.; GRANGER, D.N. Postischemic endothelium-dependent vascular reactivity is preserved in adhesion molecule-deficient mice. **Am J Physiol**, v. 273, p. H2721-H2725, 1997.

BARAKAT, S. et al. Outpatient pulmonary rehabilitation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, v. 1, p. 155-162, 2008.

BECKER, L.C.; AMBROSIO, G. Myocardial consequences of reperfusion. **Prog Cardiovas Dis**, v. 30, p. 23-44, 1987.

BECKMAN, J.S.; KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am J Physiol**, v. 271, n. 5 (Pt 1), p. C1424- C1437, 1996.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N. **Fisiologia**. 4^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.S., 2000.

BHATIA, M.; MOOCHHALA, S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. **J Pathol**, v. 202, p. 145-156, 2004.

BISHOP, M.J.; CHI, E.Y.; CHENEY, F.W. Lung reperfusion in dogs causes bilateral lung injury. **J Appl Physiol**, v. 63, p. 942-950, 1987

BRADLEY, P.P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol**, v. 78, p. 206-209, 1982.

BRAIN, S.D.; WILLIAMS, T.J. Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. **Br J Pharmacol**, v. 86, p. 855-860, 1985.

BROWN, D.A. et al. Exercise training preserves coronary flow and reduces infarct size after ischemia-reperfusion in rat heart. **J Appl Physiol**, v. 95, p. 2510-2518, 2003.

CARDEN, D.L.; GRANGER D.N. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. **J Pathol**, v. 190, p. 255-266, 2000.

CHAN, R.K. et al. Ischaemia-reperfusion is an event triggered by immune complexes and complement. **Br J Surg**, v. 90, p. 1470-1478, 2003.

CIOLAC, E.G.; GUIMARÃES, G.V. Exercício físico e síndrome metabólica. **Rev Bras Med Esporte**, v. 10, p. 319-324, 2004.

CLAUDINO, M.A. et al. Improvement in relaxation response in corpus cavernosum from trained rats. **Urology**, v. 63, p. 1004-1008, 2004.

CLAUDINO, M.A. et al. Protective effect of prior physical conditioning on relaxing response of corpus cavernosum from rats made hypertensive by nitric oxide inhibition. **Int J Impot Res**, v. 19, n. 2, p. 189-195, 2007.

COLBERG, S.R. Physical activity, insulin action, and diabetes prevention and control. **Curr Diabetes Rev**, v. 3, n. 3, p. 176-184, 2007.

COOPER, C.B. Exercise in chronic pulmonary disease: aerobic exercise prescription. **Med Sci Sports Exerc**, v.33, p. S671-S679, 2001.

CONG, L.; CHEN, J. Effect of exercise on leptin in streptozotocin-induced diabetic rats. **Wei Sheng Yan Jiu**, v. 30, n. 3, p. 158-162, 2001.

CREMONA, G.; DINH XUAN, A.T.; HIGENBOTTAM, T.W. Endothelium-derived relaxing factor and the pulmonary circulation. **Lung**, v. 169, n. 4, p. 185-202, 1991.

DATE, H. et al., Evaluation of lung metabolism during successful twenty-four-hour canine lung preservation. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 105, p. 480-491, 1993.

DELBIN, M.A.; de MORAES, C.; ZANESCO, A. Efeito do exercício por dança na pressão arterial de mulheres hipertensas. **Rev Bras Hipert**, v.11, n. 4, p. 267-269, 2004.

DELP, M.D.; McALLISTER, R.M.; LAUGHLIN, M.H. Exercise training alters endothelium-dependent vasoreactivity of rat abdominal aorta. **J Appl Physiol**, v. 75, p. 1354-1363, 1993.

de PERROT, M.; LIU, M.; WADDELL, T.K; KESHAVJEE, S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 167, p. 490-511, 2003.

DOGUET, F. et al. Changes in mesenteric vascular reactivity and inflammatory response after cardiopulmonary bypass in a rat model. **Ann Thorac Surg**, v. 77, p. 2130-2137, 2004.

DONNELLY, J.E. et al. The role of exercise for weight loss and maintenance. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 18, n. 6, p. 1009-1029, 2004.

DOWNEY, J.M. Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia and reperfusion. **Ann Rev Physiol**, v. 52, p. 487-504, 1990.

DUNCAN, J.J. et al. The effects of aerobic exercise on plasma catecholamines and blood pressure in patients with mild essential hypertension. **Jama**, v. 254, p. 2609-2613, 1985.

ECKENHOFF R.G. et al. Oxygen-dependent reperfusion injury in the isolated rat lung. **J Appl Physiol**, v. 72, p. 1454-1460, 1992.

EPPINGER, M.J. et al. Mediators of Ischemia-Reperfusion Injury of Rat Lung. **Am J Pathol**, v. 150, n. 5, p. 1773-1784, 1997.

ERTEL, W. et al. The complex pattern of cytokines in sepsis. Association between prostaglandins, cachectin and interleukins. **Ann Surg**, v.214, p.141-148, 1991.

ESME H, FIDAN H, KOKEN T, SOLAK O. Effect of lung ischemia-reperfusion on oxidative stress parameters of remote tissue. **Eur J Cardiothorac Surg**. 2006;29(3):294-298.

FAGARD, R.H. Exercise is good for your blood pressure: effects of endurance training and resistance training. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 33, p. 853-856, 2006.

FAVIRAR, A.S. Cyclosporine Modulates the response to Hypoxia-Reoxygenation in Pulmonary Artery Endothelial Cells. **The Annals Thoracic Surgery**, v. 79, n. 3, p. 1010-1016, 2005.

FAVIRAR, A.S. et al. Interleukin-6 regulation of direct lung ischemia-reperfusion injury. **Am Thorac Surg**, v. 82, p. 472-479, 2006.

FEBBRAIO, M.A.; PEDERSEN, B.K. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. **FASEB J**, v. 16, p. 1335-1347, 2002.

FISHER, A.B. et al. Endothelial cellular response to shear stress. **Am J Physiol**, v. 281, p. L-529-533, 2001.

FISHER, A.B. et al. Oxygen-dependent lipid peroxidation during ischemia. **J Clin Invest**, v. 88, p. 674-679, 1991.

FOULDS, S. et al. Visceral ischemia and neutrophil activation in sepsis and organ dysfunction. **J Surg Res**, v.75, p. 170-176, 1998.

FORTUÑO, A. et al. Oxidative stress and vascular remodeling. **Exp Physiol**, v. 90, n. 4, p. 457- 462, 2005.

FRANKLIN, B.A.; SEYMOUR, G.; TIMMIS, G.C. Exercise prescription for hypertensive patients. **Ann Med**, v. 23, p. 279-287, 1991.

FREDERIKS, W.M; KOOJI, A.; BOSCH, K.S. Role of xanthine oxidase activity in tissue damage of rat liver after ischemia. **Transpl Proc**, v. 27, p. 2855-2856, 1995.

FROSTELL, C.G. et al. Near fatal pulmonary hypertension after surgical repair congenital diaphragmatic hernia. Sucessful use of inhaled nitric oxide. **Anesthesia**, v. 48, n. 8, p. 679-683, 1993.

GARCIA-VALDECASAS, J.C. et al. Prostacyclin, tromboxane, and oxygen free radicals and postoperative liver function in human liver transplantation. **Transplantation**, v. 60, p. 662-667, 1995.

GIANNOUDIS, P.V. et al. Stimulation of inflammatory markers after blunt trauma. **Br J Surg**, v. 85, p. 986-990, 1998.

GOODYEAR, L.J. et al. Effect of exercise training on glucose homeostasis in normal and insulin-deficient diabetic rats. **J Appl Physiol**, v. 65, n. 2, p. 844-851, 1988.

GUTIERREZ, G.; BROW, S.D. Gastrointestinal tonometry: a monitor of regional dysoxia. **New Horiz**, v. 4, p. 413-419, 1996.

GRAHAN DA; RUSH JW. Exercise training improves aortic endothelium-dependent vasorelaxation and determinants of nitric oxide bioavailability in spontaneously hypertensive rats. **J Appl Physiol**, v. 96, p. 2088- 2096, 2004.

GRIENDLING, K.K.; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circ Res**, v. 17, n. 86(5), p. 494- 501, 2000.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11^a ed. Elsevier, 2006. p.470-551.

HACK, C.E.; AARDEN, L.A.; THIJS, LG. Role of cytokines in sepsis. **Adv Immunol**, v. 66, p. 101-195, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.; CROSS, C.E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? **J Lab Clin Med**, v. 19, p. 598-620, 1992.

HAMBLIN A.S. **Cytokines and cytokine receptors**. 2^a ed. New York: Oxford University Press, 1993.

HIGASHI, Y.; YOSHIZUMI, M. Exercise and endothelial function: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. **Pharmacol Ther**, v. 102, p. 87-96, 2004.

HOCKING, D.C. et al. Mechanism of pulmonary edema induced by tumor necrosis factor- α . **Circ Res**, v. 67, p. 68-77, 1990.

HOGG, J.L. Neutrophil kinetics and lung injury. **Physiol Rev**, v. 67, p. 1249-1287, 1987.

HORGAN, M.J.; WRIGHT, S.D.; MALIK, A.B. Antibody against leukocyte integrin (CD18) prevents reperfusion-induced lung vascular injury. **Am J Physiol**, v. 259, p. L315-L319, 1990.

HORIGUCHI, T.; HARADA, Y. The effect of protease inhibitor on reperfusion injury after unilateral pulmonary ischemia. **Transplantation**, v. 55, p. 254-258, 1993.

HOSENPUD, J.D. et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Seventeenth Official Report, 2000. **J Heart Lung Transplant**, v. 19, n. 909, 2000.

HULL Jr, S.S. et al. Exercise training confers anticipatory protection from sudden death during acute myocardial ischemia. **Circulation**, v. 89, p. 548-552, 1994.

IGNARRO, L.J. et al. Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study the endothelium-dependent and nitric oxide elicited vascular smooth muscle relaxation. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 244, p. 181-190, 1987.

IGNARRO, L.J. Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. **Biosci Rep**, v. 19, n. 2, p. 51- 71, 1999.

JACOB, N.N.; FRANCONI, C.A.; LOSSOW, W.J. **Anatomia e Fisiologia Humana**. 5ªed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1984. p. 383-90.

JASPERSE, J.L.; LAUGHLIN, M.H. Vasomotor responses of soleus feed arteries from sedentary and exercise-trained rats. **J Appl Physiol**, v. 86, p. 441-449, 1999.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9ªed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1999. p. 287-302.

JURMANN, M.J. et al. Pulmonary reperfusion injury: evidence for oxygen-derived free radical mediated damage and effects of different free radical scavengers. **Eur J Cardiothorac**, v. 4, p. 665-670, 1990.

KENNEY, M.J.; SEALS, D.R. Postexercise hypotension. **Hypertension**, v. 22, p. 653-664, 1993.

KHIMENKO, P.L. et al. Tumor necrosis factor alpha in ischemia and reperfusion in rat lungs. **J Appl Physiol**, v. 85, p. 2005-2011, 1998.

KINGWELL, B.A. Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease. **FASEB J**, v. 14, p. 1685-1696, 2000.

KOGA, S. et al. TNF modulates endothelial properties by decreasing cAMP. **Am J Physiol**, v. 268, p. C1104-C1113, 1995.

KOJDA G.; HAMBRECHT R. Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? **Cardiovasc Res**, v. 1, n. 67 (2), p. 187- 197, 2005.

KOKKINOS P.F.; PAPADEMETRIOU, V. Exercise and hypertension. **Coron Artery Dis**, v.11, n. 2, p. 99-102, 2000.

KOKSOY, C. et al. Effects of intestinal ischemia/reperfusion on major conduit arteries. **J Invest Surg**, v. 13, p. 35-43, 2000.

KRISHNADASAN, B. et al. The role of proinflammatory cytokines in lung ischemia-reperfusion injury. **J Thorac Cardiovas Surg**, v. 125, n. 2, p. 261-272, 2003.

KUROSE, L.; GRANGER. Evidence implicating xanthine oxidase and neutrophils in reperfusion-induced microvascular dysfunction. **Ann N Y Acad Sci**, v. 723, p. 158-179, 1994.

LASH J.M. Exercise training enhances adrenergic constriction and dilation in rat spinotrapezius muscle. **J Appl Physiol**, v. 85, p. 168-174, 1998.

LASSÈGUE, B.; CLEMPUS, R.E. Vascular NAD(P)H oxidase: specific features, expression, and regulation. **Am J Regul Integr Comp Physiol**, v. 285, n. 2, p. R277-R297, 2003.

LENNON, S.L. et al. Exercise and myocardial tolerance to ischemia-reperfusion. **Acta Physiol Scand**, v. 182, p. 161-169, 2004.

LI, J.M.; SHAH, A.M. Differential NADPH- versus NADH-dependent superoxide production by phagocyte-type endothelial cell NADPH oxidase. **Cardiovasc Res**, v. 52, n. 3, p. 477-486, 2001.

LOVREN, F.; TRIGGLE, C. Nitric oxide and sodium nitroprusside-induced relation of the human umbilical artery. **Br J Pharmacol**, v. 131, p. 521-529, 2000.

MAXEY, T.S. et al. Tumor necrosis factor- α from resident lung cells is a key initiating factor in pulmonary ischemia-reperfusion injury. **J Thorac Card Surg**, v. 127, p. 541-547, 2004.

McALLISTER, R.M. et al. Effects of exercise training on responses of peripheral and visceral arteries in swine. **J Appl Physiol**, v. 80, p. 216-225.

McARDLE, W.; KATCH, F.; KATCH V. **Fisiologia do exercício; energia, nutrição e desempenho humano**, 4 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1998.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, n. 2, p. 109- 142, 1991.

MANCHADO, F.B. et al. Maximal lactate steady state in running rats. **J Exerc Physiol JEPonline**, v. 8, n. 4, p 29-35, 2005.

MOORE, K.L. et al. Endotoxin enhance tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro. **J Clin Invest**, v. 79, p. 124-130, 1987.

MOORE, K.W. ET al. Interleukin-10. **Ann Rev Immunol**, v. 11, p. 165-190, 1993.

MORAES, C.D. et al. Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. **BMC Physiol**, v. 29, p. 8-12, 2008.

MORRIS, J.N. et al. Vigorous exercise in leisure-time: protection against coronary heart disease. **Lancet**, v. 2, p. 1207-1210, 1980.

MUSSI, R.K. et al. Exercise training reduces pulmonary ischemia-reperfusion-induced inflammatory response. **Eur Respir J**, v. 31, p. 1-5, 2008.

NAIDU, B.V. et al. Early tumor necrosis factor- α release from the pulmonary macrophage in lung ischemia-reperfusion injury. **J Thorac Cardiovas Surg**, v. 127, p. 1502-1508, 2004.

NG, C.S. et al. Inflammatory response to pulmonary ischemia-reperfusion injury. **Surg Today**, v. 36, p. 205-214, 2006.

NG, C.S. et al. Pulmonary dysfunction after cardiac surgery. **Chest**, v. 122, p. 1269-1277, 2002.

NOVICK, R.J. et al. Lung preservation: the importance of endothelial and alveolar type II cell integrity. **Ann Thorac Surg**, v. 62, p. 302-314, 1996.

NUNES, A.P.O.B. et al. The effects of nonsupervised exercise program, via internet, on blood pressure and body composition in normotensive and préhypertensive individuals. **Arq Bras Cardiol**, v.86, n. 4, p. 288-295, 2006.

OBERBACH, A. et al. Effect of a 4 week physical training program on plasma concentrations of inflammatory markers in patients with abnormal glucose tolerance. **Eur J Endoc**, v. 154, p. 577-585, 2006.

OKUSAWA, S.; GELFAND, J.A.; IKEJIMA, T. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. **J Clin Invest**, v. 81, p. 1162-1172, 1988.

OLTMAN, C.L. et al. Effects of exercise training on vasomotor reactivity of porcine coronary arteries. **Am J Physiol**, v.263, p. H372-H382, 1992.

OREDSON, S.; PLATE, G.; QVARFORDT, P. Reperfusion injury in skeletal muscle. **Transplant Proc**, v. 27, p. 2831-2833, 1995.

OVERAND, P.T. et al. Lack of alveolar oxygen during lung reperfusion does not decrease edema formation. **J Appl Physiol**, v. 67, p. 528-533, 1989.

PALACE, C.P. et al. Release of tumor necrosis factor after pulmonary artery occlusion and reperfusion. **Am Rev Respir Dis**, v. 147, p. 143-147, 1993.

PEDERSEN, B.K.; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and immune system: regulation, integration and adaptation, **Physiol Rev**, v. 80, p. 1055-1081, 2000.

PEDERSEN, B.K.; STEENBERG, A.; SCHJERLING, P. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. **J Physiol**, v. 536, p. 329-337, 2001.

PENG, W. et al. Effect of chronic hypoxia on K⁺ channels: regulation in human pulmonary vascular smooth muscle cells. **Am J Physiol**, v. 272, p. C1271-C1278, 1997.

PETERSEN, A.M.; PEDERSEN, B.K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl Physiol**, v.98, p.1154-1162, 2005

PINSKY, D.J. et al. Hypoxia and modification of the endothelium implications for regulation of vascular homeostatic properties. **Semin Cell Biol**, v. 6, p. 283-294, 1995.

PINSKY, D.J. et al. The nitric oxide/cyclic GMP pathway in organ transplantation: critical role in successful lung preservation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, p. 12086-12090, 1994.

POWERS, S.K.; COOMBES, J.; DEMIREL, H. Exercise training-induced changes in respiratory muscles. **Sports Med**, v.24, p.120-131.

POWERS, S.W.; HOWLEY, E.T. **Fisiologia do exercício – teoria e aplicações ao condicionamento e ao desempenho**. 3th ed. São Paulo: Manole, 2000. p.117-204.

PRETOLANI, M. Interleukin-10: an anti-inflammatory cytokine with therapeutic potential. **Clin Exp Allergy**, v. 29, p. 1164-1171, 1999.

PRIVIERO, F.B. et al. Negative chronotropic response to adenosine receptor stimulation in rat right atria after run training. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 31, n. 10, p. 741-743, 2004.

PRUNEAU, D.; BELICHARD, P. Endothelium-dependent control of vascular tone in the rabbit kidney after ischemia and reperfusion. **Eur J Pharmacol**, v. 231, p. 215-221, 1993.

PUTENSEN, C; WRIGGE, H. Ventilator-associated systemic inflammation in acute lung injury. **Intensive Care Med**, v. 26, p. 1411-1413, 2000.

RAM, F.S. et al. Physical training for asthma. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 19., p. CR001116.

REILLY, P.M.; SCHILLER, H.J.; BULKLEY, G.B. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. **Am J Surg**, New York, v. 161, p. 488-503, 1991.

REY, F.E; PAGANO, P.J. The reactive adventitia: fibroblast oxidase in vascular function. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 22, n. 12, p. 1962-1971, 2002.

REVES, J.G. et al. Elevated catecholamines during cardiac surgery: consequences of reperfusion of the postarrested Heart. **Am J Cardiol**, v. 53, p. 722-728, 1984.

RIZZO, M. et al. Increased expression of inflammatory cytokines and adhesion molecules by alveolar macrophages of human lung allograft recipients with acute rejection: decline with resolution of rejection. **J Heart Lung Transplant**, v.19, p. 858-865, 2000.

ROBERTS, C.K. et al. Effect of a diet and exercise intervention on oxidative stress, inflammation and monocyte adhesion in diabetic men. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 73, n. 3, p. 249-259, 2006.

RODRIGUEZ-SINOVAS, A. et al. Coronary smooth muscle reactivity to muscarinic stimulation alter ischemia-reperfusion in porcine myocardial infarction. **J Appl Physiol**, v. 95, p. 81-88, 2003.

RUSH, J.W.; TURK, J.R.; LAUGHLIN, M.H. Exercise training regulates SOD-1 and oxidative stress in porcine aortic endothelium. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 284, p. H1378-H1387, 2003.

RUSSELL, W.J.; JACKSON, R.M. Hydrogen peroxide release by mitochondria from normal and hypoxic lugs. **Am J Med Sci**, v. 308, p. 239-243, 1994.

SCANNELL, G. Leukocyte responses to hypoxic/ischemic conditions. **New Horiz**, v. 4, p. 179-183, 1996.

SCHUMACKER, P.T.; SANSEL, R.W. Oxygen delivery and uptake by peripheral tissues: physiology and pathophysiology. **Crit Care Med**, v. 13, p. 223-229, 1989.

SESSA, W.C. et al. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. **Circ Res**, v. 74, n. 2, p. 349- 353, 1994.

SHEN, W. et al. Role of EDRF in the regulation of regional blood flow and vascular resistance at rest and during exercise in conscious dogs. **J Appl Physiol**, v. 77, n. 1, p. 165- 172, 1994.

SHINOZAKI, K. et al. Abnormal biopterin metabolism is a major cause of impaired endothelium-dependent relaxation through nitric oxide/O₂⁻ imbalance in insulin-resistant rat aorta. **Diabetes**, v. 48, p. 2437- 2445, 1999.

SIGAL, R. et al. Effects of aerobic training, resistance training, or both on glycemic control in type 2 diabetes. **Ann Intern Med**, v. 147, p. 357-369, 2007.

SISCOVICK, D.S. et al. The incidence of primary cardiac arrest during vigorous exercise. **N Engl J Med**, v.311, p.874-877, 1984.

SUNDARESAN, R.S.; PATTERSON, G.A. Lung transplantation. **Glenn's Thorac Cardiovas Surg**, CT: Appleton & Lange, p. 511-535, 1996.

SUZUKI, K. et al. Systemic inflammatory response to exhaustive exercise: cytokine kinetics. **Exerc Immunol**, v. 8, p. 6-48, 2002.

TANCRÈDE, G.; ROUSSEAU-MIGNERON, S.; NADEAU, A. Beneficial effects of physical training in rats with a mild streptozocin-induced diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 31, p. 406-409, 1982.

TENG, S. et al. Cytokine mRNA expression in unilateral ischemic-reperfused rat lung with salt solution supplemented with low-endotoxin or standard bovine serum albumin. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 286, p. L137-142, 2004.

THOMPSON, M.A. et al. Exercise preserves endothelium dependent relaxation in coronary arteries of hypercholesterolemic male pigs. **J Appl Physiol**, v. 96, n. 3, p. 1114-1126, 2004.

TOKUNO, S. et al. Effects of spontaneous or induced brain ischemia on vessel reactivity: the role of inducible nitric oxide synthase. **Life Sci**, v.71, p. 679-692, 2002.

TOUYZ, R.M.; YAO, G.; SCHIFFRIN, E.L. c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 23, n. 6, p. 981-987, 2003.

USHIO-FUKAI, M. et al. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. **J Biol Chem**, v. 271, n. 38, p. 23317-23321, 1996.

Van ROSSUM, J. M. Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. **Arch Int Pharmacodyn**, v. 143, p. 299-330, 1963.

VANE, J.R; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M. Cyclooxygenase 1 and 2. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 38, p. 97-120, 1998.

VANHOUTTE, P.M. Endothelial control of vasomotor function: from health to coronary disease. **Circ J**, v.67, p.572-575, 2003.

VASCONCELOS, L.A.B.A.; CARVALHO, H.F. Célula muscular lisa. In: **Células: uma abordagem multidisciplinar**. Org: Carvalho HF e Collares-Buzato CB. São Paulo: Manole, 2005. p.68- 82.

WALLACH, R. et al. Pathogenesis of paroxysmal hypertension developing during and after coronary bypass surgery: a study of hemodynamic and humoral factors. **Am J Cardiol**, v. 46, p. 559-565, 1980.

WAN, S.; YIM, A.P. Cytokines in myocardial injury: impact on cardiac surgical approach. **Eur J Cardiothorac Surg**, v. 16, suppl .1, p. S107-S111, 1999.

WEBB, R.C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Adv Physiol Educ**, v. 27, n. 1-4, p. 201- 206, 2003.

WEST, J.B. **Fisiologia respiratória moderna**. 3th ed. São Paulo: Manole, 1986. p. 31-33.

WOODMAN, C.R. et al. Induction of nitric oxide synthase mRNA in coronary resistance arteries isolated from exercise-trained pigs. **Am J Physiol**, v. 273, n. 6 (pt 2), p. H2575-H2579, 1997.

WOODMAN, C.R. et al. Endurance exercise training improves endothelium-dependent relaxation in brachial from hypercholesterolemic male pigs. **J Appl Physiol**, v.99, p. 1412-1421, 2005.

WU, Y.; YANG, X.; LI, Y. Exercise induces increased GLUT4 gene expression and protein content in diabetic rats. **Zhonghua Yi Xue Za Zi**, v. 80, n. 3, p. 172-174, 2000.

WYNNE, R.; BOTTI, M. Postoperative pulmonary dysfunction in adults after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: clinical significance and implications for practice. **Am J Crit Care**, v. 13, n. 5, p. 384-393, 2004.

ZANESCO, A.; ANTUNES, E. Células Endoteliais. In: **Células: uma abordagem multidisciplinar**. 1ª ed. São Paulo: Manole, 2005. p. 184-191.

ZANESCO, A.; SPADARI-BRATFISH, R. C.; BARKER, L. A. Sino-aortic denervation causes right atrial beta adrenoceptor down-regulation. **J Pharmacol**, v. 208, p.677-685, 1997.

ZAPOL, W.M.; SNIDER, M.T. Pulmonary hypertension in severe acute respiratory failure. **N Engl J Med**, Massachusetts, v. 296, n. 9, p. 476-80, 1977.

ZATZ, R. A low cost tail-cuff method for the estimation of mean arterial pressure in conscious rats. **Lab Anim Sci**, Memphis v. 40, n. 2, p. 198-201, 1990.

ZIMMERMAN, B.J; GRANGER, D.N. Mechanisms of reperfusion injury. **Am Med Sci**, v. 307, n. 4, p. 284-292, 1994.

11. ANEXO

11.1 Anexo A – Parecer da Comissão de Ética na Experimentação Animal



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP

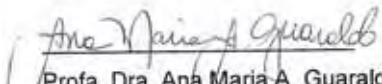
CERTIFICADO

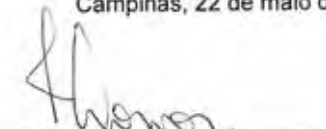
Certificamos que o Protocolo nº 1026-1, sobre "REATIVIDADE VASCULAR DE ARTÉRIAS MESENTÉRICA E PULMONAR DE RATOS APÓS ISQUEMIA/REPERFUSÃO PULMONAR: EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Angelina Zanesco / Maria Andréia Delbin está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 22 de maio de 2006.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1026-1, entitled "VASCULAR REACTIVITY IN RAT PULMONARY ARTERIES AND MESENTERIC AFTER PULMONARY ISCHEMIA/REPERFUSION: EFFECT OF THE PHYSICAL TRAINING", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on May 22, 2006.

Campinas, 22 de maio de 2006.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guarnido
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva