



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

LUCIANA DIAS BELCHIOR

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES DA CONTRATILIDADE DE ANÉIS DE
TRAQUÉIA ISOLADA DE RATOS EM RESPOSTA AO CARBACOL E
AO POTÁSSIO APÓS TREINAMENTO FÍSICO**

**FORTALEZA
2010**

LUCIANA DIAS BELCHIOR

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES DA CONTRATILIDADE DE ANÉIS DE TRAQUÉIA
ISOLADA DE RATOS EM RESPOSTA AO CARBACOL E AO POTÁSSIO APÓS
TREINAMENTO FÍSICO**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Profa. Dra. Danielle Silveira Macêdo

FORTALEZA
2010

B372e Belchior, Luciana Dias

Estudo das alterações da contratilidade de anéis de traquéia isolada de ratos em resposta ao carbacol e ao potássio após treinamento físico/ Luciana Dias Belchior. – Fortaleza, 2010.

97 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Danielle Silveira Macêdo

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Fortaleza, Ceará.

1. Traquéia. 2. Exercício. 3. Asma. I. Macêdo, Danielle Silveira (orient.). II. Título.

CDD: 615.1

LUCIANA DIAS BELCHIOR

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES DA CONTRATILIDADE DE ANÉIS DE TRAQUÉIA
ISOLADA DE RATOS EM RESPOSTA AO CARBACOL E AO POTÁSSIO APÓS
TREINAMENTO FÍSICO**

**Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Farmacologia**

Aprovada em ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Danielle Silveira Macêdo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará -UFC

Profa. Dra. Francisca Cléa F. de Sousa (Co-orientadora)
Universidade Federal do Ceará -UFC

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Vasco Pinheiro Diógenes Bastos
Universidade Federal do Ceará - UFC

À Deus, por mais esta meta compartilhada e alcançada.
À minha mãe Socorro, pela formação e ajuda hercúlea em cada passo
da minha caminhada.
Às minhas filhas, Laís e Lícia, meu tudo.
Ao meu irmão Arnaldo (*in memoriam*) e às minhas irmãs e sobrinhos
(em especial Mairon de Araújo Belchior), por tamanha ajuda recebida.
À grande semeadora, Profa. Dra. Danielle Silveira Macêdo, meu tripé...
...com todo o meu carinho.

AGRADECIMENTOS

À prof^a. Dr^a. Francisca Cléa Florenço de Sousa, pela co-orientação, confiança e amizade na realização desse trabalho.

Ao prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães, pela presteza em ceder sua estrutura física e humana nesta universidade, indispensáveis à realização de grande parte dessa pesquisa.

Ao prof. Dr. Vasco Pinheiro Diógenes Bastos, pela doação de seus conhecimentos na conclusão da pesquisa.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Farmacologia, pelos conhecimentos científicos, fundamentais à minha formação.

Às alunas Marília Almeida e Gabrielle, trabalhadoras incansáveis, pela dedicação e colaboração inestimáveis.

Aos colegas dos Laboratórios de Neurofarmacologia (em especial às amigas Fernanda Ivelize e Gersilene Valente) e do Músculo Liso (em especial ao amigo Francisco José Batista), pelo convívio agradável e colaboração em muitas etapas da pesquisa.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, pela presteza em seus trabalhos.

À Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP), pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização dessa pesquisa científica.

"A mente que se abre a uma nova idéia, jamais volta ao seu tamanho original"

Albert Einstein

“A luta na qual, todos:

Os velhos, os apaixonados, os jovens, os hábeis e os ponderados,
Aqueles para quem o sentimento é uma ciência, aqueles para quem o
estudo,

De tudo que pode ser somado e comparado, é uma paixão devastadora,

Nas cidades e desertos, nos navios e alojamentos junto ao porto,

Desvendando entre os livros o passado estranho,

Criando o futuro na indolência, cada qual com seu tesouro,

Em meio aos risos e virar de corpos e confiando em si,

Ou salientes e abandonados como tristes cosvos-marinhos,

Por toda a vida profundamente comprometidos.”

(Autor desconhecido)

RESUMO

Estudo das alterações da contratilidade de anéis de traquéia isolada de ratos em resposta ao carbacol e ao potássio após treinamento físico. Luciana Dias Belchior. Orientadora: Profa. Dra. Danielle Silveira Macêdo. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2010.

A presente pesquisa visou determinar a contratilidade do músculo liso traqueal de ratos submetidos a exercício leve de curto prazo, ou seja, treinados 1h ou pré-treinados e posteriormente exercitados por 1, 5 e 10 hs (PT1, PT5 e PT10, respectivamente), bem como de animais sensibilizados com OVA, submetidos ao exercício por 5hs e posteriormente desafiados, com o objetivo de verificar as alterações causadas pelo exercício neste músculo determinando também a interferência da broncoprovocação antigênica sobre a contratilidade traqueal de animais previamente exercitados. Para a realização da pesquisa, ratos machos (250-350g) foram submetidos a diferentes protocolos de nado, por 1, 5 e 10hs, sendo um grupo submetido à sensibilização com OVA e, 21 dias depois, desafiados em intervalos de 15 minutos através da inalação do antígeno sensibilizante (grupo S/D). No grupo sensibilizado e submetido ao exercício, este último foi realizado durante 5 dias antes do desafio (grupo S/E pré desafio). O sacrifício dos animais ocorreu 30 min após a sessão de nado ou 24 horas após o desafio antigênico no caso dos animais submetidos ao modelo de asma. Os ratos sedentários não foram submetidos a nenhum treino. Os controles do grupo asma inalaram apenas o veículo (NaCl 0,9%). Para os experimentos *in vitro* a traquéia foi removida e montada em cuba para órgão isolado contendo 5ml de solução *Tyrod* (mantida a $37 \pm 0,5$ °C) e aerada com mistura de O₂. Foram confeccionadas curvas concentração-efeito (CCE) para carbacol e cloreto de potássio. Os resultados mostraram que o pD₂ não apresentou valores significativos nos grupos em estudo, exceto em PT5 e PT10, ambos em relação ao grupo PT1. A resposta máxima (%) apresentou valores significativamente crescentes e maiores nos grupos PT1 ($107,62 \pm 3,57$), PT5 ($116,35 \pm 0,54$) e PT10 ($123,50 \pm 2,59$) em relação ao grupo sedentário ($82,70 \pm 5,90$), quando o carbacol foi utilizado como estímulo contrátil. Situação semelhante ocorreu nos grupos PT1 ($105,19 \pm 1,12$), PT5 ($112,02 \pm 1,44$) e PT10 ($119,56 \pm 0,95$) em relação ao grupo sedentário ($90,45 \pm 2,22$), para o potássio e nos grupos S/D ($100,74 \pm 4,79$) e S/E pré-desafio ($109,09 \pm 3,68$) em relação ao grupo sensibilizado ($82,69 \pm 5,90$) para o carbacol, e nos grupos S/D ($105,50 \pm 2,37$) e S/E pré-desafio ($115,05 \pm 1,96$) em relação ao grupo sensibilizado ($93,11 \pm 3,58$). Para verificar a participação do óxido nítrico, acetilcolina e estresse oxidativo no mecanismo da ação pró-contrátil da musculatura lisa traqueal induzida pelo exercício foram determinados, respectivamente os níveis de nitrito, atividade da acetilcolinesterase (AChE) e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como uma maneira de determinar a peroxidação lipídica. Os valores de nitrito foram significativos para o grupo PT5 em relação aos grupos sedentário e treinado 1h. Nos animais submetidos ao protocolo da asma ocorreu queda significativa dos níveis de nitrito nos grupos S/D e S/E pré-desafio. Ocorreu aumento da peroxidação lipídica nos grupos PT1, PT5 e PT10 em relação ao grupo sedentário. Já no grupo asmático, os valores foram significativamente maiores nos grupos S/D e S/E pré-desafio em relação ao grupo controle. A atividade da AChE apresentou redução significativa nos grupos PT1, PT5 e PT10 em relação aos grupos sedentário e treinado 1h. No grupo asmático, também ocorreu redução na atividade da AChE nos grupos S/D e S/E pré-desafio. Portanto, os resultados mostram que o exercício a curto prazo aumenta a contratilidade da musculatura lisa traqueal isolada em ratos, para o carbacol e o potássio dos grupos em estudo; provavelmente com a participação do óxido nítrico, acetilcolina e peroxidação lipídica neste mecanismo pró-contrátil.

Palavras-chave: traquéia, exercício, asma.

ABSTRACT

Study of the alterations on tracheal rings contractility isolated from rats in response to carbacol and potassium after physical training. LUCIANA DIAS BELCHIOR. Supervisor: Profa. Dra. Danielle Silveira Macêdo. Master Dissertation. Program of Post-graduation in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, UFC, 2010.

This work aimed to determine the contractility of tracheal smooth muscle of rats submitted to short-term light exercise, trained for 1h or pre-trained and, then, trained for 1, 5 and 10hs (PT1, PT5 and PT10, respectively), as well as, animals sensitized with OVA, submitted to exercise for 5hs and subsequently challenged, with the objective of verifying the changes caused by exercise in this muscle, also determining the interference of antigen bronchoprovocation on the contractility of tracheal smooth muscle of animals previously exercised. To conduct the study male rats (250-350g) were subjected to different protocols of swimming, by 1, 5 and 10hs, in addition to one group that was subjected to sensitization with OVA and 21 days later, challenged at intervals of 30 min through sensitizing antigen inhalation (group S/D). In the sensitized group submitted to exercise, this latter was held for 5 days before OVA challenge (group S/E pre-challenge). The animals were sacrificed 15 min after the swimming session or 24 hs after antigen challenge, in the case of rats submitted to asthma model. Sedentary rats were not subjected to any training session. Asthma control group inhaled only the vehicle (NaCl 0.9%). For *in vitro* experiments the trachea was removed and mounted in an isolated organ bath containing 5ml of Tyrode solution (maintained at 37 ± 0.5 °C) and aerated with O₂. Concentration-effect curves (CEC) were designed for carbacol and potassium chloride. The results showed that the pD₂ values were not significant among the groups except in PT5 and PT10, both in relation to group PT1. The maximum response values were significantly increased and higher in the groups PT1 ($107,62 \pm 3,57$), PT5 ($116,35 \pm 0,54$) and PT10 ($123,50 \pm 2,59$) compared to the sedentary group ($82,70 \pm 5,90$), when carbacol was used as the contractile stimulus. A similar situation occurred in the groups PT1 ($105,19 \pm 1,12$), PT5 ($112,02 \pm 1,44$) and PT10 ($119,56 \pm 0,95$) as compared to the sedentary group ($90,45 \pm 2,22$), for potassium and S/D ($100,74 \pm 4,79$) and S/E pre-challenge groups ($109,09 \pm 3,68$) as compared to the sensitized group ($82,69 \pm 5,90$) for carbacol, as well as, S/D ($105,50 \pm 2,37$) and S/E pre-challenge ($115,05 \pm 1,96$) groups when compared to the sensitized one for potassium ($93,11 \pm 3,58$). To verify the involvement of nitric oxide, acetylcholine, and oxidative stress on the pro-contractile mechanism of the tracheal smooth muscle induced by exercise, nitrite levels, acetylcholinesterase (AChE) activity and thiobarbituric acid reactive species (TBARS), as a way of determining lipid peroxidation, were determined. Nitrite levels decreased in the PT5 group as compared to sedentary and 1h trained groups. In the animals subjected to the asthma protocol there was a significant decrease in the nitrite levels in the S/D and S/E pre-challenge groups. An increase in lipid peroxidation occurred in the groups PT1, PT5 and PT10 in relation to the sedentary one. In the asthmatic group, the TBARS values were significantly higher in S/D and S/E pre-challenge groups as compared to the control one. The AChE activity showed a significant reduction in the groups PT1, PT5 and PT10 in relation to sedentary and 1h trained groups. The groups S/D and S/E pre-challenge also presented a decrease on AChE activity. Therefore, the results showed that short-term light exercise increases the tracheal smooth muscle contractility of the study groups, probably with the participation of nitric oxide, acetylcholine, and lipid peroxidation in this pro-contractile mechanism.

Keywords: trachea, exercise, asthma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema das vias aéreas humanas	21
Figura 2 Contração do músculo liso	23
Figura 3 Respostas asmáticas à provocação com alérgeno inalado.....	25
Figura 4 As complexas interações celulares e neurais presentes na patogenia da asma resultam em manutenção da inflamação e conduzem ao remodelamento brônquico.....	29
Figura 5 Representação clássica da resposta imunológica ao estímulo irritante ou antígeno na fase imediata da asma.	30
Figura 6 Fisiopatologia da asma	31
Figura 7 Sistema de cubas isoladas e captação dos dados.....	48
Figura 8 Análise da contratilidade dos anéis de traquéia de rato pela curva concentração-efeito induzida pelo CCh do grupo treinado 1 hora em relação ao grupo sedentário.	57
Figura 9 Análise da contratilidade dos anéis de traquéia de ratos pela curva concentração-efeito induzida pelo CCh do grupo PT1 em relação ao grupo sedentário.....	58
Figura 10 Análise da contratilidade dos anéis de traquéia de rato pela curva concentração-efeito induzida pelo CCh do grupo PT5 em relação ao grupo sedentário.....	59
Figura 11 Análise da contratilidade dos anéis de traquéia de rato pela curva concentração-efeito induzida pelo CCh do grupo PT10 em relação ao grupo sedentário.....	60
Figura 12 Análise da contratilidade dos anéis de traquéia de rato pela curva concentração-efeito induzida pelo K ⁺ do grupo treinado 1 hora em relação ao grupo sedentário.....	62
Figura 13 Análise da contratilidade dos anéis de traquéia de rato pela curva concentração-efeito induzida pelo K ⁺ do grupo PT1 em relação ao grupo sedentário.	63
Figura 14 Análise da contratilidade dos anéis de traquéia de rato pela curva concentração-efeito induzida pelo K ⁺ do grupo PT5 em relação ao grupo sedentário.	64

Figura 15 Análise da contratilidade dos anéis de traquéia de rato pela curva concentração-efeito induzida pelo K ⁺ do grupo PT10 em relação ao grupo sedentário.....	65
Figura 16 Análise da contratilidade dos anéis de traquéia de rato pela curva concentração-efeito induzida pelo CCh em grupos sensibilizados e/ou desafiados com OVA ou solução salina.	67
Figura 17 Análise da contratilidade dos anéis de traquéia de rato pela curva concentração-efeito induzida pelo CCh no grupo S/E pré-desafio em relação aos grupos sensibilizado e S/D. Grupo sensibilizado - sensibilizado com OVA e desafiado com salina.....	68
Figura 18 Análise do tecido muscular liso em curva concentração-efeito induzida por K ⁺ em traquéias isoladas de ratos sensibilizados e/ou desafiados com OVA ou solução salina.....	70
Figura 19 Análise do tecido muscular liso em curva concentração-efeito induzida pelo K ⁺ do grupo S/E pré-desafio em relação aos grupos sensibilizado e S/D.	71
Figura 20 Análise comparativa dos valores de nitrito em lavado broncoalveolar de ratos, submetidos ou não a treinamento (valores expressos em μM).	73
Figura 21 Análise comparativa dos valores de nitrito em lavado broncoalveolar de ratos controle e do grupo sensibilizado e/ou desafiado com OVA ou solução salina, treinados ou não (valores expressos em μM).	74
Figura 22 Análise comparativa dos valores da peroxidação lipídica em lavado broncoalveolar de ratos, submetidos ou não a treinamento (valores expressos em absorbância).....	75
Figura 23 Análise comparativa dos valores da peroxidação lipídica em lavado broncoalveolar de ratos controle e do grupo sensibilizado e/ou desafiado com OVA ou solução salina, treinados ou não (valores expressos em absorbância).	76
Figura 24 Análise comparativa dos valores da acetilcolinesterase em lavado broncoalveolar de ratos submetidos ou não a treinamento (valores expressos em nmoles/mg de proteína/min).....	77
Figura 25 Análise comparativa dos valores da acetilcolinesterase em lavado broncoalveolar de ratos controle e do grupo sensibilizado e/ou desafiado com OVA ou solução salina, treinados ou não (valores expressos em nmoles/mg de proteína/min).	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Potência (pD_2) e valores de E_{max} no efeito pró-contrátil induzido por CCh em traquéia de ratos sedentários ou não.	61
Tabela 2 Potência (pD_2) e valores de E_{max} do efeito pró-contrátil induzido por K^+ em traquéia de ratos sedentários ou não.	66
Tabela 3 Potência (pD_2) e valores de E_{max} das curvas concentração-efeito induzidas por carbacol em traquéias obtidas de ratos controle, sensibilizados e desafiados, submetidos ou não a treinamento.	69
Tabela 4 Potência (pD_2) e valores de E_{max} das curvas concentração-efeito induzidas por potássio em traquéias obtidas de ratos sensibilizados com salina ou OVA e/ou desafiados com salina ou OVA, submetidos ou não a treinamento.	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Característica da função do sistema nervoso autônomo na asma.	26
Quadro 2 Patologia das vias aéreas na asma – mediadores implicados	27
Quadro 3 Principais materiais utilizados nos experimentos	42
Quadro 4 Resumo dos grupos experimentais	46

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	- Acetilcolina
AChE	- Acetilcolinesterase
AMPc	- Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA	- Análise de variância
APC	- Célula apresentadora de antígeno
CCE	- Curva concentração-efeito
CK	- Creatina quinase
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
DTNB	- Ácido ditiobisnitrobenzóico
EO	- Estresse oxidativo
EPM	- Erro padrão da média
ERO	- Espécies reativas do oxigênio
GMPc	- Guanosina 3',5'-monofosfato cíclico
GSH	- Glutathiona reduzida
GSH-Px	- Glutathiona peroxidase
IgE	- Imunoglobulina E
i.p.	- Intraperitoneal
LBA	- Lavado broncoalveolar
LPS	- Lipopolissacarídeo
Min	- Minuto
NO	- Óxido nítrico
NOS	- Óxido nítrico sintase
NOS_e	- Óxido nítrico sintase endotelial
NOS_i	- Óxido nítrico sintase induzível
NOS_n	- Óxido nítrico sintase neuronal
OVA	Ovalbumina
PKC	- Proteína quinase C
PT1	- Pré-treinado 1 hora
PT5	- Pré-treinado 5 horas
PT10	- Pré-treinado 10 horas
S/D	Sensibilizado/desafiado
S/E	Sensibilizado/desafiado com exercício antes do desafio
SNC	- Sistema Nervoso Central
SOD	- Superóxido dismutase
TE	- Agentes transferidores de elétrons
VO₂máx	- Consumo máximo de oxigênio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Anatomofisiologia das Vias Aéreas Humanas.....	20
1.2	Músculo Liso das Vias Aéreas Humanas	21
1.3	O Processo Asmático	24
1.3.1	Definição e Desenvolvimento	24
1.3.2	Fisiopatologia da Asma	24
1.3.3	Estresse Oxidativo na Asma	31
1.3.4	Broncoconstrição (BIE) e Asma (AIE) Induzidas pelo Exercício.....	33
1.3.5	Modelos Animais de Asma	36
2	RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	38
3	OBJETIVOS.....	40
4	METODOLOGIA	42
4.1	Materiais Utilizados nos Experimentos.....	42
4.2	Animais	42
4.3	Procedimento Experimental.....	43
4.3.1	Animais submetidos ao protocolo de exercícios a curto prazo.....	43
4.3.2	Sensibilização Antigênica dos Animais	43
4.3.3	Protocolo de exercícios para os animais sensibilizados e desafiados com OVA.....	44
4.3.4	Experimentos com Traquéias Isoladas.....	47
4.4	Protocolos Experimentais para a Avaliação da Contratilidade Traqueal.....	48
4.4.1	Obtenção das Curvas Concentração-Efeito	48
4.4.2	Efeitos do Carbacol na Musculatura Lisa Isolada da Traquéia de Ratos Submetidos ou Não ao Protocolo de Asma, Sedentários ou Exercitados em Diferentes Tempos	49

4.4.3	Efeitos do Potássio na Musculatura Lisa Isolada da Traquéia de Ratos Submetidos ou Não ao Protocolo de Asma, Sedentários ou Exercitados em Diferentes Tempos	49
4.5	Isolamento do Lavado Broncoalveolar (LBA).....	50
4.5.1	Avaliação da Peroxidação Lipídica no Lavado Broncoalveolar (DRAPER et al.,1990).	50
4.5.2	Dosagem de Nitrito (Green et al., 1981).....	50
4.5.2.1	Método	50
4.5.2.2	Procedimento Experimental	51
4.5.2.3	Soluções Reagentes:	51
4.5.3	Dosagem de Proteína (Método Lowry):.....	52
4.5.3.1	Método	52
4.5.3.2	Soluções reagentes	52
4.5.4	Determinação da Atividade da Enzima Acetilcolinesterase	53
4.5.4.1	Método	53
4.5.4.2	Procedimento Experimental	53
4.5.4.3	Soluções Reagentes	53
4.6	Análise Estatística.....	54
5	RESULTADOS.....	56
5.1	Análise dos Efeitos do Treinamento na Resposta da Traquéia Isolada ao K⁺	56
5.2	Efeitos do Pré-Treinamento e Treinamento na Contração Induzida por CCh em Traquéias Isoladas de Ratos	56
5.3	Efeitos do Pré-Treinamento e Treinamento na Contração Induzida por Potássio em Traquéias Isoladas de Ratos.....	61
5.4	Análise das Alterações nas Curvas Concentração-efeito do Carbacol em Traquéias Isoladas de Ratos Sensibilizados e/ou Desafiados ao Antígeno Sensibilizante e os Efeitos do Exercício	66
5.5	Análise das Alterações do Potássio nas Curvas Concentração-efeito do Potássio em Traquéias Isoladas de Ratos Sensibilizados e/ou Desafiados ao Antígeno Sensibilizante e os Efeitos do Exercício	69

5.6	Efeito do Exercício nos Níveis de Nitrito em Lavado Broncoalveolar de Ratos Submetidos ou Não a Treinamento.....	72
5.7	Efeitos do Exercício nos Níveis de Nitrito em Lavado Broncoalveolar de Ratos Sensibilizados e/ou Desafiados com OVA e Submetidos ou não a Treinamento	73
5.8	Análise dos Efeitos da Peroxidação Lipídica (TBARs) em Lavado Broncoalveolar de Ratos Submetidos ou Não a Treinamento.....	74
5.9	Análise dos Efeitos da Peroxidação Lipídica (TBARs) em Lavado Broncoalveolar de Ratos Sensibilizados e/ou Desafiados com OVA e Submetidos ou Não a Treinamento.....	75
5.10	Análise dos Efeitos da Enzima Acetilcolinesterase (AChE) em Lavado Broncoalveolar de Ratos Submetidos ou não a Exercícios	76
5.11	Análise dos Efeitos da Enzima Acetilcolinesterase (AChE) em Lavado Broncoalveolar de Ratos Sensibilizados e/ou Desafiados com OVA e Submetidos ou não a Treinamento.....	77
6	DISCUSSÃO	80
7	CONCLUSÃO	90
	REFERÊNCIAS.....	92

↳INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

1.1 Anatomofisiologia das Vias Aéreas Humanas

O mecanismo respiratório, a nível celular (quebra das cadeias de carbono) e orgânico (captura de oxigênio do ar ambiente, transporte deste até a célula e eliminação do gás carbônico), permite aos seres vivos retirar a energia química dos alimentos sendo esta a fonte das diversas atividades metabólicas (Seow e Fredberg, 2001).

É através das vias aéreas que o oxigênio passa do meio externo até chegar às células. Tais vias podem dividir-se em superiores e inferiores, segundo sua localização (FIGURA 1). As superiores compreendem as fossas nasais, faringe, laringe e parte superior da traquéia. O ar atravessa a cavidade nasal, onde é aquecido, umidificado e filtrado. A faringe fica por trás das cavidades nasal e bucal, subdividindo-se em naso, oro e hipofaringe, onde, anteriormente, está situada a laringe. É neste tubo, sustentado por peças de cartilagem articuladas, que estão as cordas vocais e os músculos que respondem pela fonação. Das segundas, fazem parte a porção inferior da traquéia, brônquios, bronquíolos e alvéolos, esses três últimos, no interior dos pulmões.

A traquéia segue logo abaixo da cartilagem cricóide indo até a carina. É constituída por uma série de semianéis (16 a 20 peças) cartilagosos incompletos, em forma de "C", e unidos por tecido fibroelástico, o que impede que esta zona aérea colapse quando a pressão torácica torna-se negativa, em sua parte anterior, e de fibras musculares lisas que correm verticalmente em sua estrutura posterior, para acompanhar os pulmões nos movimentos respiratórios. Funciona como um tubo condutor de ar aos pulmões. Já os brônquios se distinguem dos bronquíolos por apresentarem ainda cartilagem em suas paredes e glândulas mucosas. Os alvéolos estão logo abaixo dos bronquíolos, são de pequena dimensão e neles se dá a troca de gases ou hematose (Stephens *et al.*, 1998).

O tecido epitelial que reveste a traquéia contém apenas uma camada celular, sendo que os núcleos que as compõem apresentam-se redimensionados em alturas adversas, dando a impressão de estratificação (tecido pseudo-estratificado). Há

células em forma de cálice, as caliciformes, aí presentes, cujo papel é a produção de muco, que serve para proteger tal estrutura, já que as impurezas a ele se aderem. Ainda presentes, estão as células ciliadas. Como o próprio nome evidencia, possuem cílios que literalmente varrem o muco agregado às impurezas deste espaço. Por último, há que se referir às células basais da camada adventícia, fontes de novas células. Internamente, a traquéia é revestida por uma mucosa, com a presença de grande quantidade de glândulas. Do tubo traqueal, via respiratória de primeira ordem, até os alvéolos, há 23 ramificações, as primeiras 16 são condutoras e as demais são de transição e troca. Essas ramificações promovem um aumento da área de transsecção do sistema respiratório, o que resulta em morosidade na passagem do fluxo aéreo (Moreira, Soares e Lourenço, 2003).

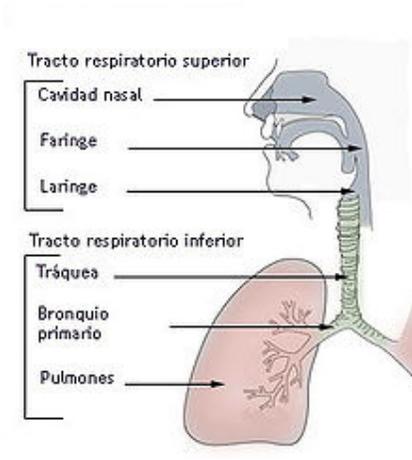


Figura 1 Esquema das vias aéreas humanas

Fonte: www.pt.wikipedia.org (data de acesso: 27/07/2010)

1.2 Músculo Liso das Vias Aéreas Humanas

A grande diversidade entre os músculos esquelético e liso são as características físicas e químicas que os compõem, fato este que agrega ao músculo liso contrações do tipo tônicas e prolongadas, podendo chegar a horas ou dias. Ademais, compreende fibras bem menores, dispostas em feixes ou camadas. Está dividido em dois tipos principais: - multiunitário: fibras musculares lisas, individualizadas e recobertas por uma fina membrana semelhante à membrana basal, atuando de forma independente e inervadas por uma só terminação, com controle motor através de sinais nervosos; - unitário ou visceral: suas membranas

celulares possuem vários pontos de adesão através de junções comunicantes, de forma que a força de contração pode ser transmitida a favor de um gradiente de concentração para a fibra muscular seguinte, fazendo com que todas as fibras se contraíam concomitantemente, funcionando como um sincício. É este o tipo de fibras presente nas vias aéreas (Guyton, 2002).

Em sua base química, o músculo liso contém os filamentos de actina e miosina, tal qual o músculo esquelético. O mecanismo contrátil (FIGURA 2) dá-se mediante a presença intracelular de cálcio e adenosina-trifosfato, que fornece energia necessária para a contração. A base da organização física das fibras musculares lisas é representada por um imenso número de filamentos de actina presos a corpos densos, no interior da célula ou ligados à membrana celular. Logo após o aumento da concentração intracelular de cálcio, este íon acopla-se à calmodulina, desencadeando o processo excitação-contração, pela ativação da miosina quinase e fosforilação da cadeia leve de miosina que, por sua vez, liga-se à actina, promovendo a contração muscular. Já o relaxamento se dá quando os níveis de cálcio caem abaixo de um valor crítico, revertendo os processos acima, exceto a fosforilação da miosina (Crimi *et al.*, 2001).

A energia necessária para manter a contração do músculo liso é bem menor em relação ao esquelético, e esse é um mecanismo importante para o corpo, já que muitos órgãos mantêm-se em contração longamente (Alexandre *et al.*, 2000).

Os estímulos para a contração do músculo liso agregam sinais neurais, hormonais, alongamento/estiramento da fibra muscular, alteração do ambiente químico, presença de íons cálcio, canais de potássio e nucleotídeos tricíclicos; o AMPc está envolvido em resposta a reações alérgicas (Guyton, 2002). A acetilcolina liga-se a receptores transmembrana, eleva as concentrações intracelulares de trifosfato de inositol (IP₃), que, por sua vez, libera íons cálcio do retículo sarcoplasmático. O cálcio, em concentração elevada no meio intracelular, liga-se à calmodulina e tem início o processo de contração da musculatura lisa. O óxido nítrico (NO) intracelular liga-se à guanilato ciclase, aumenta os níveis de GMPc, desencadeando o processo de relaxamento da musculatura lisa. Agentes oxidantes também são fatores desencadeantes da contração do músculo liso (Cortijo *et al.*, 1999; Prousky, 2008).

O músculo liso é inervado em grande parte por fibras nervosas autonômicas. Estas se subdividem profusamente por sobre camadas de fibras musculares em junções difusas, que produzem substâncias neurotransmissoras, as quais se difundem através das células. A inervação é somente externa, sendo que o potencial de ação passa por condução para as camadas mais internas. As terminações axônicas do músculo liso possuem múltiplas varicosidades, com vesículas que contêm substâncias transmissoras excitatórias e inibitórias, por todo o seu eixo. Acetilcolina e norepinefrina são os neurotransmissores secretados individualmente por fibras nervosas. A primeira é excitatória em alguns órgãos e inibitória em outros, dando-se efeito contrário para a norepinefrina. E isso é determinado pelo tipo de receptor. No músculo liso do tipo unitário, os potenciais de ação podem ocorrer na forma de ponta ou em platô (Nishida *et al.*, 2007).

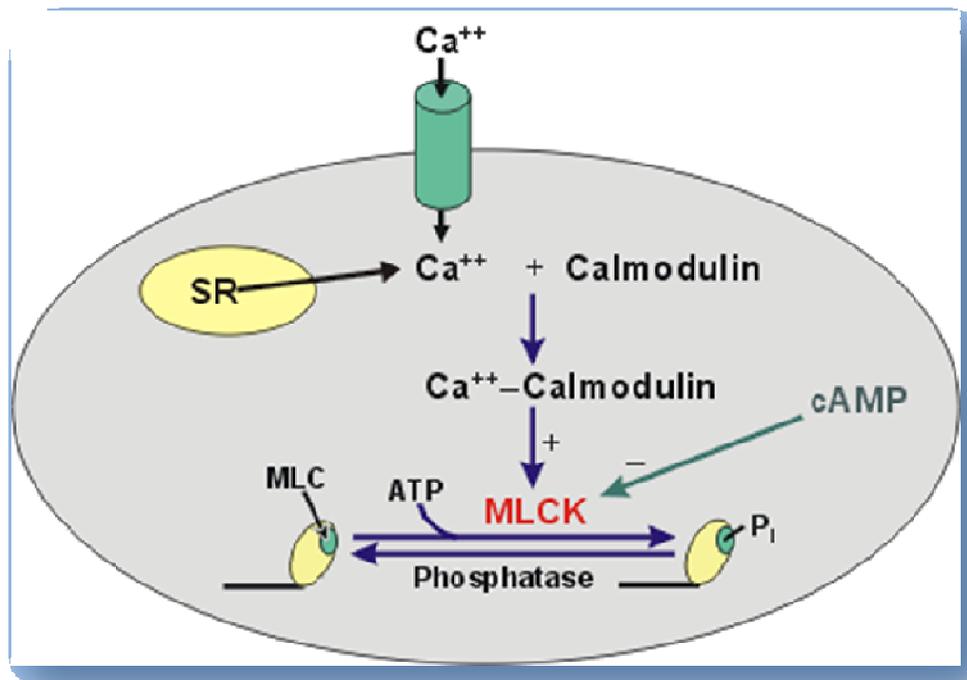


Figura 2 Contração do músculo liso

Fonte: www.cvphysiology.com (acesso:27/07/2010)

1.3 O Processo Asmático

1.3.1 Definição e Desenvolvimento

A asma é uma afecção das vias aéreas inferiores que se dá mediante o aumento da responsividade a uma série de estímulos a qual se manifesta por obstrução das vias aéreas que se altera espontânea ou terapêuticamente, é uma patologia comum nas populações pediátrica e adulta. Definição amplamente aceita de asma deve incluir características, como: obstrução das vias aéreas inferiores total ou parcialmente reversível, quer de forma espontânea ou com o uso de fármacos; presença de inflamação nas vias aéreas e exacerbada responsividade destas vias aéreas inferiores a vários estímulos, como ar frio ou exercício em ambiente natural (Busse e Lemanske, 2001).

A prevalência parece ter aumentado em todos os grupos etários, mas os indivíduos abaixo de vinte anos tem sido os mais amplamente acometidos de asma. Esta patologia pode apresentar-se de formas diferentes, indo desde uma história de associação com infecção do trato respiratório superior, a uma exposição a alérgenos, tosse crônica isolada ou sibilância induzida por exercício, até episódios repetidos de sibilância, dispnéia e taquipnéia com vários índices de sobrecarga. A presença de tosse recorrente e/ou sibilos e o desencadeamento desses sintomas noturnos, ou pela prática de exercícios ou mesmo exposição ao ar frio, são particularmente úteis no estabelecimento do diagnóstico da asma (Cookson, 1999).

Os sintomas mais agudos consistem do aumento progressivo da tosse e dispnéia, com ou sem rinorréia, estado febril e outros sintomas de infecção do trato respiratório superior. De forma subjetiva, há ainda que se comentar sobre a opressão torácica, ansiedade e grande dificuldade para respirar (Kumar, 2001).

1.3.2 Fisiopatologia da Asma

É sabido que os asmáticos manifestam hiperresponsividade das vias aéreas, embora outros distúrbios possam afetar, em menor grau, tal quadro. Os possíveis meios que levam à hiperresponsividade destas vias incluem inflamação, anormalidades na integridade do epitélio brônquico, alterações no controle nervoso

autônomo das vias aéreas e grau de obstrução do fluxo de ar no período basal (Fireman, 1998).

Os fatores desencadeantes da asma estão assim distribuídos:

- Infecções: virais e sinusite bacteriana
- Alérgenos: pólen, produtos de origem animal, fungos e poeira
- Agentes irritantes: gases nocivos, odores, fumaça de cigarro
- Farmacológicos: aspirina (por exemplo)
- Psicossociais: emoções
- Outros: ar frio, hiperventilação (choro, riso), exercício (FIGURA 3).

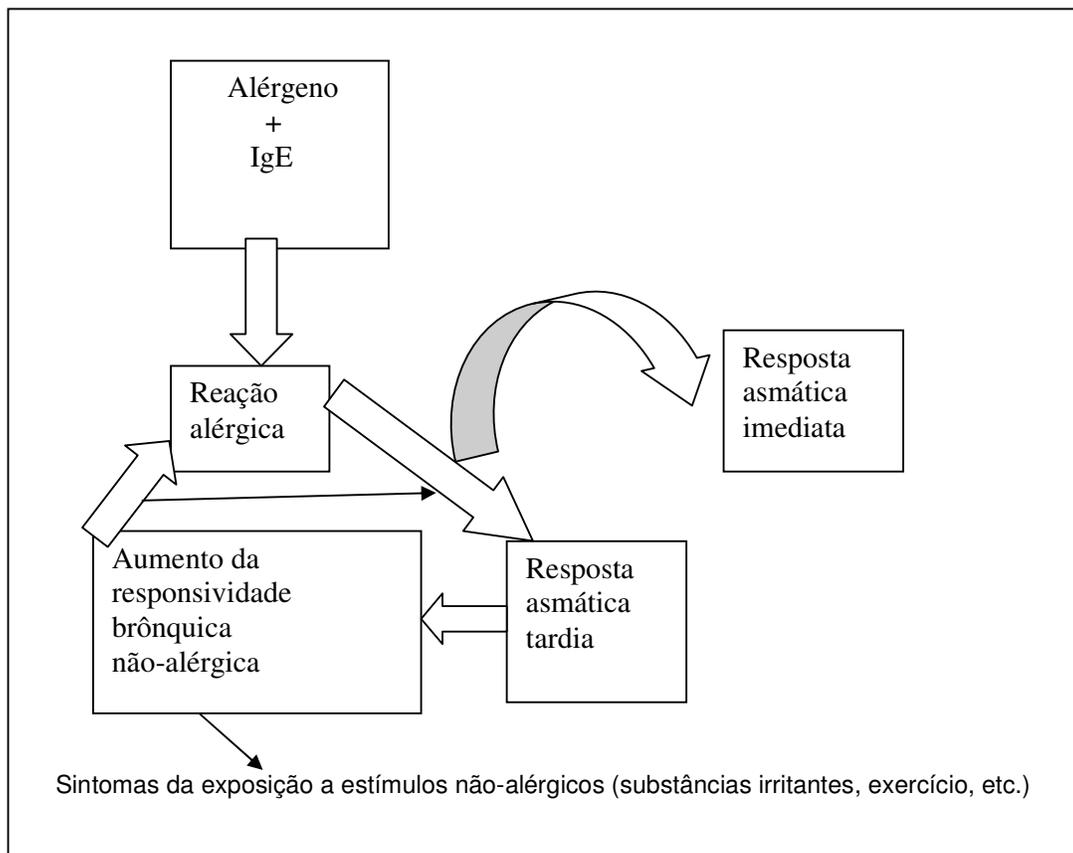


Figura 3 Respostas asmáticas à provocação com alérgeno inalado

Fonte: Adaptado de Fireman, 1998

Dentre os mecanismos neurogênicos envolvidos no processo asmático pode-se citar um desequilíbrio do sistema nervoso autônomo (QUADRO 1). Segundo tal ponto de vista, a broncoconstricção resulta de uma variedade de estímulos que diminuem o limiar de receptores irritativos vagais aferentes de rápida adaptação. Esse desequilíbrio colinérgico promove a constricção do músculo liso, e isso resulta da ação vagal parassimpática eferente. Acredita-se que um meio primário que responde pelo desenvolvimento de hiperreatividade das vias aéreas seja a inflamação dessas vias (Fireman, 1998).

Quadro 1 Característica da função do sistema nervoso autônomo na asma

Função do Sistema Nervoso Autônomo na Asma				
Parâmetro	β -adrenérgico	α -adrenérgico	Colinérgico	
Monofosfatos cíclicos	aumento do AMPc ^a	reduz o AMPc	Aumento do	GMPc ^b
Músculo liso	dilata	contraí	contraí	
Degranulação (mediadores)	inibe	estimula	estimula	
Glândula mucosa	—	estimula	estimula	
Condição de resposta	diminuída	aumentada	aumentada	

a AMPc = monofosfato cíclico de adenosina

b GMPc = monofosfato cíclico de guanosina

Na asma, as glândulas mucosas e o músculo liso das vias aéreas tornam-se hipertrofiados. Ademais, as vias aéreas inferiores apresentam infiltração de células inflamatórias, rompimento epitelial e sinais de edema da mucosa. A luz das vias aéreas pode ser ocluída por fragmentos inflamatórios. A quantidade de células

participantes é grande e possui níveis complexos de interação entre células, tecidos e mediadores (Louis *et al.*, 2000).

Os mediadores inflamatórios desempenham importante papel na patogênese da asma (QUADRO 2). Leucotrienos e prostaglandinas derivados da membrana fosfolipídica do ácido araquidônico, são liberados por basófilos e mastócitos. Já os eosinófilos, cuja migração e ativação nos tecidos pode ser desencadeada por macrófagos e mastócitos pulmonares, influem na integridade epitelial, anormalidades no controle nervoso autônomo do tônus das vias aéreas e aumento da responsividade do músculo liso das vias aéreas. Outra célula, o linfócito T, uma vez ativada pelo antígeno, pode produzir secreção de citocinas solúveis, pró-inflamatórias, com capacidade de ativar várias células inflamatórias. Fatores genéticos e ambientais participam na patogênese da asma (Fireman, 1998).

Quadro 2 Patologia das vias aéreas na asma – mediadores implicados

Patologia das Vias Aéreas na Asma – Mediadores Implicados				
Prostaglandinas	Leucotrienos	Histamina	PAF (fator ativador de plaquetas)	Evento Patológico
+	+	+	+	Constricção do músculo liso
+	+	+	+	Edema da mucosa
+	+	+	+	Secreção de muco
±	+ ^a	±	+	Infiltração de células (quimiotaxia)

Legenda: ^aLTB₄, apenas

O desenvolvimento de sintomas típicos da asma, tais como agravamento progressivo da tosse, dispnéia, sibilos e opressão torácica, é acompanhado por reduções nos níveis de fluxo expiratório. A contração do músculo liso brônquico é um dos fatores primários que contribuem para a obstrução das vias aéreas. Outros fatores incluem o edema de mucosa e tampões de muco que resultam em aprisionamento de ar e hiperinsuflação. Outras alterações fisiológicas que ocorrem no processo asmático são o aumento da resistência vascular pulmonar e elevação da pós-carga no ventrículo esquerdo devido às altas pressões pleurais negativas que culminam em hiperinsuflação pulmonar. É importante mencionar que o grau de hiperresponsividade brônquica a estímulos não específicos é aumentada em quadros que se desencadeiam mais tardiamente, e isto pode estar relacionado à intensa inflamação das vias aéreas que se desenvolve nesses casos, manifestada por aumento no número de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, basófilos e linfócitos (Braman e Hanania, 2007).

Segundo a definição, a asma resulta da interação entre fatores ambientais e genéticos, havendo uma associação entre os sintomas e uma limitação variável ao fluxo aéreo, determinada por uma inflamação crônica das vias aéreas. As alterações estruturais e celulares dessas vias define a expressão aumentada de genes inflamatórios, e o ambiente define as variáveis fenotípicas deste quadro. Infecções específicas e exposições ambientais atuando sobre um genoma predisposto leva a uma propensão sistêmica para respostas celulares do tipo Th₂, que, associado a eventos imunes, leva à inflamação alérgica nas vias aéreas (Campos, 2006). A resposta do asmático à exposição freqüente a aeroalérgenos mantém essas células Th₂ de memória ativadas, o que induz, no sistema imune, a uma disfunção crônica e acarreta inflamação continuada, mediada por citocinas, quimiocinas e fator de crescimento. Células residentes associadas a eosinófilos, basófilos, neutrófilos e monócitos ativados liberam mediadores pró-inflamatórios, incluindo EROs (espécies reativas de oxigênio). Estes últimos promovem injúria aguda de células e tecidos por peroxidação lipídica, o que, por sua vez, exacerba ainda mais a resposta inflamatória. Apesar de a inflamação consistir na mais importante característica do processo asmático, torna-se relevante considerar o remodelamento da mucosa brônquica (FIGURA 4), definindo uma alteração definitiva da arquitetura das vias aéreas (Sartorelliet *et al.*, 2009).

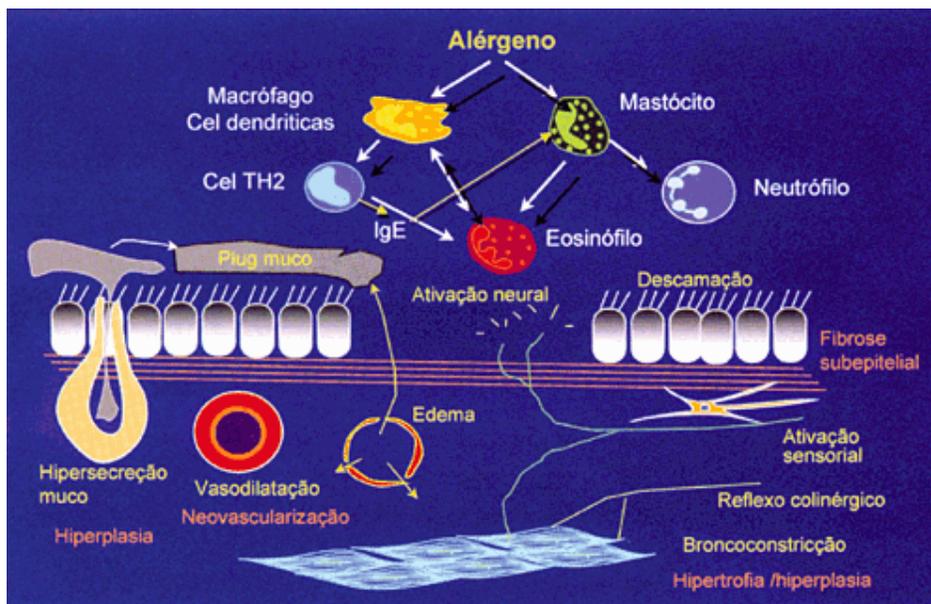


Figura 4 As complexas interações celulares e neurais presentes na patogênese da asma resultam em manutenção da inflamação e conduzem ao remodelamento brônquico

Fonte: www.cienciahoje.pt (acesso 27/07/2010)

Os episódios de asma desencadeiam crises que caminham desde uma resposta imediata (FIGURA 5), subdividida em fase de sensibilização- exposição ao alérgeno e consequente produção de anticorpos IgE (imunoglobulina E) específicos, e, reação da fase imediata- dá-se minutos após a exposição dos anticorpos IgE ao alérgeno, ocorrendo união entre estes com degranulação mastocitária e liberação de mediadores previamente formados, como histamina, e de mediadores recém sintetizados, como leucotrienos cisteínicos, o que desencadeia reação aguda com coceiras, espirros, secreção nasal aquosa e transparente. Já a reação de fase tardia dá-se nas horas que se seguem à esta exposição e denota a influência de células inflamatórias, que liberam mediadores, os quais recrutam um número maior de células inflamatórias, intensificando a reação inflamatória a qual, com o tempo, prejudica tecidos das vias aéreas, e tem por sintomatologia a obstrução nasal, rinorréia e espirros (Corrêa *et al.*, 2008).

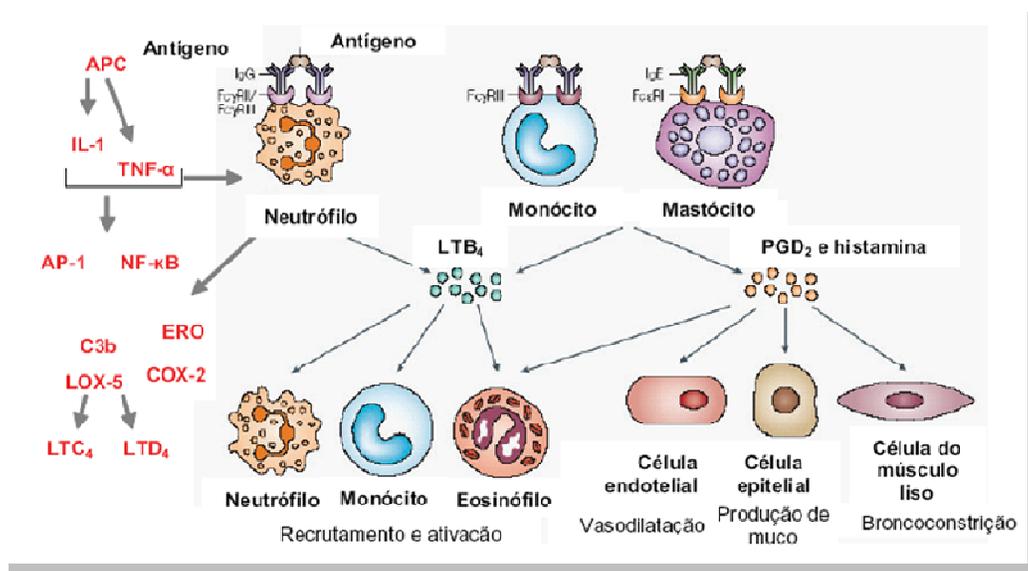


Figura 5 Representação clássica da resposta imunológica ao estímulo irritante ou antígeno na fase imediata da asma

APC: células apresentadoras de antígeno;

IL-1: interleucina do tipo 1;

TNF- α : fator de necrose tumoral;

AP-1 e NF- κ B: fatores de transição pró-inflamatórios;

ERO: espécie reativa de oxigênio;

C3b: opsonin;

LOX-5: lipooxigenase do tipo 5;

COX-2: ciclooxigenase do tipo 2;

LTC₄ e LTD₄: cisteinil-leucotrienos, espasmógenos;

LTB₄: leucotrieno do tipo B, ação quimiotática; PGD: prostagladina do tipo D, potente espasmógeno

Fonte: Corrêa *et al*, 2008

A limitação ao fluxo aéreo, que se dá por causa das alterações inflamatórias, consiste na principal característica da fisiopatogenia da asma, que se apresenta, dentre outros fatores, devido a vasodilatação e congestão da microvascularização brônquica, resultando em edema, hipersecreção mucosa, hipertrofia das glândulas mucosas e aumento das células caliciformes, obstruindo as vias aéreas por rolas de muco; e, contração e encurtamento da musculatura lisa espiral com hipertrofia e hiperplasia muscular (Telles Filho, 2010).

O quadro asmático (FIGURA 6) evidencia maior comprometimento das vias aéreas de menor calibre; os brônquios podem conter células caliciformes hiperplasiadas, metaplasia e hiperplasia de glândulas mucosas, assim como ectasia de ductos glandulares e desnudamento de células ciliares (Bramane Hanania, 2001).

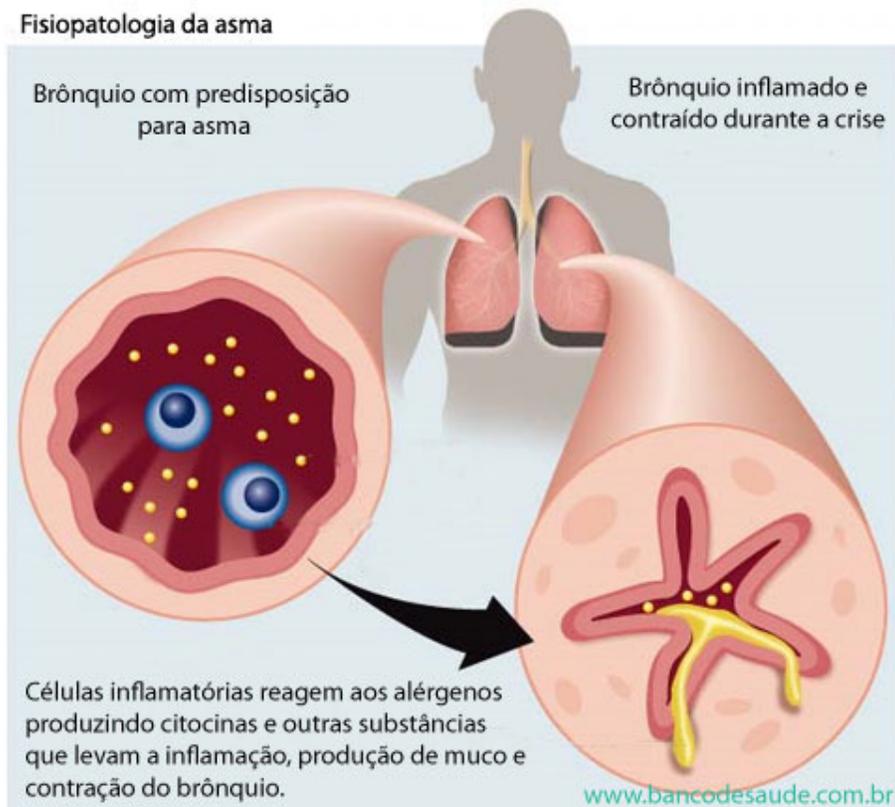


Figura 6 Fisiopatologia da asma

Fonte: www.bancodesaude.com.br (acesso: 27/07/2010)

1.3.3 Estresse Oxidativo na Asma

O organismo produz oxidantes constantemente, fruto de seu metabolismo, e isso é importante para a homeostasia do corpo. É certo também, que há um sistema antioxidante de defesa. O equilíbrio entre esses dois agentes denota a homeostase. No entanto, quando se dá uma produção desigual, com ganho para o primeiro fator, desenvolve-se o processo de lesão tecidual por peroxidação lipídica, bem conhecido como sendo o estresse oxidativo (Silva, 2008).

As células, em seus componentes, são suscetíveis à ação do mecanismo de lesão oxidativa, sendo a membrana celular o foco principal em virtude da peroxidação lipídica, levando a alterações estruturais e de permeabilidade desta membrana. O que traz, por consequência, alteração na seletividade em canais iônicos, liberação do conteúdo de organelas e síntese de produtos citotóxicos (com o malonaldeído), resultando na morte da célula. A lipoperoxidação pode estar associada a mecanismos de envelhecimento tecidual e nem sempre traz somente prejuízos à célula, pois seus produtos finais também são importantes nas reações do ácido aracdônico (formação de prostaglandinas) sendo importante na resposta inflamatória (Ferreira e Matsubara, 1997).

O ambiente, como alvo de agentes oxidantes, pode contribuir para o aparecimento de asma, assim como existem evidências de que, em doenças inflamatórias do aparelho respiratório, haja aumento do estresse oxidativo, sugerindo que espécies reativas de oxigênio e nitrogênio possam reduzir o mecanismo de defesa antioxidante. Pesquisas mostram que, em processos inflamatórios como a asma, a inflamação e o broncoespasmo resultam de um aumento do estresse oxidativo das vias aéreas (Silva, 2008).

Está claro que a típica inflamação crônica das vias aéreas característica da asma é fruto de estresse oxidativo acentuado. E esta inflamação está associada com o aumento na produção de EROs, tais como peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e radicais hidroxila, por eosinófilos, macrófagos, neutrófilos no alvéolo (Silva, 2008). Pesquisas evidenciaram que células envolvidas no processo inflamatório asmático tem capacidade de produzir EROs (Andreadis *et al.*, 2003). Além disso, a concentração de NO^- é aumentado em vias aéreas com processo asmático. A produção aumentada das EROs causa efeitos danosos por induzir à síntese de radicais livres que oxidam proteínas, lipídios de membrana e DNA levando a dano tecidual direto e evocação de respostas celulares pela geração de espécies reativas secundárias (Silva, 2008).

As EROs, como O_2^- e OH^- , possuem um número ímpar de elétrons na sua última camada de valência, sendo considerados como altamente reativos e capazes de iniciar a oxidação. Tais radicais são gerados constantemente nos sistemas biológicos por agentes oxidantes. A fim de se proteger contra o efeito deletério dos

oxidantes, os pulmões possuem um sistema bem desenvolvido de defesa antioxidante, que age diretamente ou por meio de enzimas neutralizando a ação de radicais livres. As fontes enzimáticas potencialmente produtoras de EROs são: cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, NADPH oxidase associado à membrana, sistema xantina oxidase citosólico, ciclooxigenase e lipooxigenases e citocromo P450. Já na defesa antioxidante estão presentes fatores não enzimáticos, como ácido úrico, ácido ascórbico, α -tocoferol, bilirrubina, β -caroteno, glutathione, além de enzimáticos, tais como a enzima superóxido desmutase (SOD), glutathione peroxidase e catalase (Henrickis e Nijkamp, 2001).

O processo de estresse oxidativo desencadeia disfunção tissular ou lesão tecidual, já que radicais livres interagem de maneira eficaz com macromoléculas desestruturando membranas celulares, alterando a capacidade de captação de nutrientes para o seu interior e a remoção de seus produtos. A consequência disso é o envelhecimento tecidual precoce e a reprodução das células. O elevado grau ativo de células inflamatórias promove o surgimento de doenças, como a asma. O sistema de defesa antioxidante atua eliminando EROs e inativando a reação de peroxidação lipídica. Dessa forma, agentes antioxidantes tornam-se eficazes na redução e gravidade da asma, modulando o efeito de oxidantes na resposta inflamatória e na função pulmonar (Santos e Guedes, 2009).

1.3.4 Broncoconstrição (BIE) e Asma (AIE) Induzidas pelo Exercício

Atividade física, segundo Porto, 2004, é todo movimento corporal voluntário humano, que resulta num gasto energético acima dos níveis de repouso, caracterizado pela atividade do cotidiano e pelos exercícios físicos. É parte de comportamento próprio do ser humano com características biológicas e sócio-culturais. Já exercício físico, para este autor, pode ser definido como uma sequência sistematizada de movimentos de diferentes segmentos corporais, executados de forma planejada, segundo um determinado objetivo a atingir. É uma das formas de atividade física planejada, estruturada, repetitiva, que objetiva o desenvolvimento da aptidão física, do condicionamento físico, de habilidades motoras ou reabilitação orgânico-funcional, definido de acordo com diagnóstico de necessidade ou carências específicas de seus praticantes, em contextos sociais diferenciados, diz Porto (Porto, 2004).

Conforme estudos, Bastos, 2010, apresenta uma lista dos benefícios obtidos pela prática regular de atividade física, cabendo destacar: prevenção da osteoporose, melhoria da função cardiovascular e respiratória, aumento da força muscular, redução dos fatores de risco para doença das artérias coronárias, diminuição de incidentes mortais provocados por doença cardiovascular, melhoria da função imunitária, diminuição da incidência de doença das artérias coronárias, cancro do cólon e diabetes tipo II, atraso de certos processos do envelhecimento, aumento do metabolismo em repouso, aumento da sensação de bem-estar e da auto-estima, diminuição da massa gorda e manutenção ou aumento da massa muscular, melhoria dos estados de depressão e ansiedade, e, aumento da resistência de tendões e ligamentos.

A prática regular de exercícios físicos demanda gasto energético para a manutenção da atividade de músculos então solicitados. A energia química presente nos alimentos é fundamental no fornecimento de adenosina trifosfato (ATP). O estado inicial das reservas energéticas, a intensidade e a duração do exercício determinam a predominância de uma ou outra via metabólica, sugerindo a maior utilização de um dado substrato energético, tais como fosfatos de alta energia, glicogênio armazenado no fígado e em músculos, e os lipídios de adipócitos podem suprir a necessidade energética durante o exercício (Rogatto, 2002).

O treinamento físico pode desenvolver uma série de respostas tecido-específicas de estresse oxidativo, segundo a quantidade de antioxidantes endógenos. Se intenso, pode acarretar perda de desempenho, danos e fadiga musculares, subtreinamento (o condicionamento pode advir, em parte, pela geração de radicais livres, assim como o treino acima deste condicionamento), em virtude de pesquisas apontarem o pré-treinamento como capaz de minimizar o efeito do estresse oxidativo em caso de exercícios agudos intensos. Já o exercício crônico e moderado parece aumentar a resistência e diminuir os níveis basais de danos oxidativos. Em contrapartida, o exercício regular cria adaptações de proteção na capacidade antioxidante (Vancini e Lira, 2005).

A intensidade e o nível de exaustão do indivíduo em treinamento físico, promovendo assim maior aporte de oxigênio, que podendo servir de fonte para a

produção de oxidantes, constituem os pontos mais importantes para a formação de estresse oxidativo (Schneider e Oliveira, 2004).

Esforços vigorosos, capazes de elevar a frequência cardíaca a 170-180bpm, a ventilação acima de $200\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, consumo de oxigênio (VO_2) com valores entre 6-85%, ventilação de 60% ou mais da ventilação máxima e esforço vigoroso de 6-8 minutos podem precipitar asma esforço induzida. Com o fim do esforço, pode advir o quadro de obstrução brônquica, que regride espontaneamente. O aumento no nível de catecolaminas e a redução do tônus brônquico servem de proteção durante o exercício, evitando a broncoconstrição esforço induzida. Além disso, o leucotrieno D_4 (LTD_4) liberado nas vias aéreas durante o exercício lentifica a liberação de prostaglandina do tipo PGE_2 , cujo papel é de relaxamento do músculo liso brônquico (Telles, 2010).

Mas, há duas descrições utilizadas na literatura sobre asma esforço induzida, que ainda cria divergências entre alguns autores. O termo broncoconstrição esforço induzida (BIE) consiste em broncoespasmo ou obstrução brônquica observada após o exercício em pessoas que apresentam a função pulmonar normal em repouso. E, para certos pesquisadores, este termo é distinto da asma induzida pelo exercício (AIE), que descreve a acentuação dos sintomas de asma após o exercício. Esta última é intercambiável com os níveis de hiperreatividade brônquica, bem como outros fatores desencadeantes, como infecções virais e alergias (Laitano, 2007).

Algumas hipóteses têm sido sugeridas para determinar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos em provocar obstrução das vias aéreas pelo exercício. Uma dessas hipóteses é a osmótica, através da qual a inalação de ar seco durante o exercício eleva a osmolaridade dos líquidos periciliares, liberando histamina, leucotrienos e prostaglandinas e, por conseguinte, causando obstrução. Outra explicação versa sobre o efeito térmico, por meio do qual o resfriamento das vias aéreas sequencial a um aquecimento após o exercício leva a hiperemia vascular local e edema de parede das vias aéreas, entretanto, há controvérsias. Ainda trata sobre esse assunto, o fato de que o ácido láctico (produto final do metabolismo anaeróbico) aumenta a concentração de íons hidrogênio, este, por sua vez, libera mediadores inflamatórios e bradicinina (pró-inflamatória).

O desequilíbrio entre as descargas α (relaxamento) e β -adrenérgicos (contração), também é uma sugestão sobre os fatores desencadeantes de AIE. Em atletas, pôde-se evidenciar que uma redução nos líquidos corporais (suor, saliva e lágrimas) é sugestivo de produção reduzida de fluidos nas vias aéreas. Além disso, o consumo de sal é outro fator aqui precipitante. Postula-se ainda, que a hipocapnia, cuja causa seria uma hiperventilação, pode provocar aumento da resistência das vias aéreas e, com isso, deliberar broncoespasmo continuado, levando ao quadro de AIE. Não é certo ainda o quanto cada uma dessas hipóteses influencia a ocorrência da AIE. Sabe-se, porém, que não atuam isoladas no desencadeamento desse fenômeno, sugerindo que há interação desses fatores determinando o evento final de AIE (Laitano, 2007).

1.3.5 Modelos Animais de Asma

O ser humano envolveu-se com as demais espécies animais ao longo dos tempos, buscando sua sobrevivência e evolução da espécie. O modelo de pesquisas em animais é hoje largamente utilizado (Fagundes, 2004).

Há uma grande diversidade de modelos animais visando imitar o processo asmático. O modelo utilizado no presente trabalho desenvolveu-se com ratos Wistar sensibilizados ativamente com ovalbumina. A broncoprovocação antigênica leva ao surgimento das fases inicial e tardia semelhantes ao processo asmático. Tal modelo já foi validado em pesquisas pregressas (Bellofiore; Marin, 1988; Watanabe; Mishima, 1990; Lissen *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1993; Viana; Garcia Leme, 1995 (Moura, 2004).

II- RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA



2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A literatura relata poucos estudos relacionando os efeitos do exercício físico sobre o músculo liso, fato este que nos levou a analisar os efeitos do nado realizado a curto prazo e de leve intensidade, já que foram desenvolvidos em tempos de 1, 5 ou 10 horas, limitados a 1 hora diária, sem o uso de carga nos animais. Os tempos de exercícios deste estudo foram assim determinados mediante tentativas de se verificar a presença de alterações nas fases iniciais de realização do exercício, visto que este evento, além de pouco estudado ainda é controverso na literatura. Para reforçar esta determinação foram escolhidos parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo (determinação dos níveis de TBARs), participação do óxido nítrico (determinação de nitrito) e envolvimento do sistema nervoso parassimpático (determinação da atividade da AChE), visto que os fatores mais importantes na formação do estresse oxidativo são a intensidade e conseqüentemente o nível de exaustão do indivíduo submetido ao exercício e, portanto, a exposição a um maior fluxo de oxigênio.

Também baseado no fato de que existem cada vez mais evidências que a típica inflamação crônica das vias aéreas observada na asma, resulta de um estresse oxidativo acentuado, resolveu-se procurar as alterações na musculatura lisa traqueal e nos parâmetros de estresse oxidativo, participação do óxido nítrico e atividade da AChE em ratos submetidos ao modelo de asma e exercitados antes do desafio com ovalbumina de forma a determinar que tipo de efeito um exercício de leve intensidade e na forma de nado poderia produzir sob a musculatura lisa brônquica dos animais, visto que o exercício é um dos mais comuns precipitantes da asma brônquica.

III- OBJETIVOS



3 OBJETIVOS

Devido à ausência de estudos esclarecedores acerca dos efeitos do exercício físico no sistema respiratório, o presente trabalho teve por objetivos:

Geral:

Avaliar a contratilidade de traquéias isoladas de animais submetidos ao exercício leve de curto prazo, sensibilizados com ovalbumina e as alterações em parâmetros bioquímicos previamente determinados (peroxidação lipídica - TBARs, nitrito e atividade da AChE), como forma de tentar elucidar parte dos efeitos do exercício físico sob o músculo liso traqueal em modelo de asma.

Específicos:

Analisar a influência da pré-adaptação ao exercício na resposta contrátil de anéis isolados de traquéia;

Verificar as respostas contráteis da traquéia após submissão dos animais ao esforço ergonômico do nado a curto prazo (1, 5 e 10 dias) em animais saudáveis ou submetidos ao modelo experimental de asma;

Mensurar o estresse oxidativo (peroxidação lipídica) e níveis de nitrito nos lavados broncoalveolares de animais submetidos ao exercício leve a curto prazo, sensibilizados ou não com ovalbumina;

Determinar a atividade da acetilcolinesterase nos lavados broncoalveolares coletados dos grupos em estudo.

IV- MATERIAIS E MÉTODOS



4 METODOLOGIA

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa Animal – CEPA da Universidade Federal do Ceará, protocolo nº 95/09, segundo os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pelo *Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research*.

4.1 Materiais Utilizados nos Experimentos

A relação mostrada no QUADRO 3 se refere aos principais materiais utilizados para a realização dos experimentos.

Quadro 3 Principais materiais utilizados nos experimentos

Material	Marca / Modelo
- Nebulizador ultrassônico	RespiraMax, NS Indústria de Aparelhos Médicos, São Paulo, Brasil
- Unidade transdutora de força	Grass, modelo FT03C, Quincy, Mass, EUA
-Agitador de tubos	Modelo 251, FANEN, SP, Brasil
-Balança analítica	Modelo H5, Mettler, Suíça
-Banho Maria	Modelo 102/1, FANEN, SP, Brasil
-Centrífuga refrigerada	Eppendorff
-Cubetas de plástico para leitura em espectrofotômetro	Sarstedt, Alemanha Oriental
-Espectrofotômetro	Modelo Beckman DU 640B, Fullerton, CA, USA
-Estufa para secagem	Modelo 315 SE FANEM, SP, Brasil
-Freezer a – 20 °C	-
-Medidor de pH, modelo B374	Micronal, SP, Brasil
-Micropipetas	H.E., Pedersen, Dinamarca
-Sonicador	Modelo PT 10-35. Brinkmann Instruments Inc. NY, USA

4.2 Animais

Os experimentos foram realizados utilizando-se ratos albinos (*Rattus norvegicus*) adultos, machos, da variedade Wistar, pesando entre 250 e 350g,

provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina. Os animais foram divididos em grupos de 6 por gaiola, em períodos reversos de claro/escuro de 12 horas para ambientação e aclimatização. Aos animais foram fornecida água e ração à vontade.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso e no Laboratório de Neurofarmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

4.3 Procedimento Experimental

4.3.1 Animais submetidos ao protocolo de exercícios a curto prazo

No presente estudo, diferentes grupos de ratos foram submetidos ao nado, conforme descrito abaixo. Este exercício é considerado leve, pois apesar de ser feito de forma contínua não foram acoplados pesos ao corpo dos animais. A natação contínua produz recrutamento significativo de ambos os músculos dos membros anteriores e posteriores do animal.

Os grupos com 6-8 animais cada foram divididos da seguinte forma: um grupo de animais com treinamento de 1h sem qualquer pré-treinamento (grupo treinado - T), outros grupos de animais receberam pré-treinamento por 20 min no primeiro dia, 30 min no segundo dia, repouso no terceiro dia e 1 hora de treino diário (grupo pré-treinado - PT), por 1, 5 e 10 dias, respectivamente denominados PT1, PT5 e PT10, o grupo de animais denominado sedentário não foi submetido a qualquer treinamento (grupo sedentário - S).

4.3.2 Sensibilização Antigênica dos Animais

Um grupo de animais foi sensibilizado ativamente por meio de injeções intraperitoneias de ovalbumina (*chicken egg albumin, grade II*, 10mg/kg, 3 aplicações em dias alternados – nos dias 1, 3 e 5) de acordo com o método descrito por Weinreich; Udem (1987), dissolvida em solução salina (0,5 ml, 10 mg.kg⁻¹), este procedimento foi chamado de “sensibilização”.

Vinte e um dias após, os animais sensibilizados foram submetidos à broncoprovocação antigênica. Para tal, estes foram colocados em uma caixa de acrílico (20 x 30 x 21 cm), onde ocorreu a inalação de OVA (em primeiro lugar com uma solução de $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ e, em segundo lugar com $5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ por 15 minutos cada) ou somente o veículo (solução salina por 30 min - controle), através de um nebulizador ultra-sônico (RespiraMax[®], NS Indústria de Aparelhos Médicos, São Paulo, Brasil). Na parte superior da caixa há uma tampa removível para a colocação dos animais no compartimento interno. Nas porções laterais existem dois orifícios: um para acoplar o nebulizador ultra-sônico, por meio do qual foi realizada a nebulização de solução com o antígeno sensibilizante e o outro para servir de escape, evitando a reinalação do ar expirado; esses animais foram chamados de "desafiados".

Após colocação do animal na caixa de acrílico, o período máximo de duração da inalação foi mantido em trinta minutos, exceto quando ocorreram alterações respiratórias (aparecimento de tiragem intercostal, desconforto respiratório, aumento do ritmo respiratório ou tosse associada à coriza intensa) que pudessem, eventualmente, comprometer a sobrevivência do animal. Os animais controle receberam, no momento da sensibilização, injeções intraperitoneais de salina (solução fisiológica dissolvida) e aqueles usados como controle dos grupos desafiados além da injeção de ovalbumina receberam o desafio com solução salina inalada - 21 dias após a sensibilização. Os animais assim manipulados foram utilizados para os experimentos. Foram considerados animais desafiados os ratos previamente sensibilizados que foram submetidos ao desafio antigênico por inalação.

4.3.3 Protocolo de exercícios para os animais sensibilizados e desafiados com OVA

No presente estudo, os animais sensibilizados e desafiados foram submetidos à natação, como descrito abaixo.

Os ratos submetidos ao protocolo de asma foram submetidos aos seguintes procedimentos: Grupo 1 - ratos controle (sensibilizados e desafiados com solução salina – chamado grupo C), Grupo 2 - ratos sensibilizados (sensibilizados com OVA e desafiados com solução salina – chamado grupo S), Grupo 3 - ratos desafiados (sensibilizados e desafiados com OVA – chamado grupo S/D) e grupo 4 - ratos

desafiados, pré-treinados e treinados 1h ao dia durante cinco dias antes do desafio com OVA (sensibilizados e exercitados pré-desafio - chamado grupo S/E pré-desafio).

Em todos os casos, os treinamentos foram realizados sempre entre 8 e 16 h, e a temperatura da água manteve-se em 30°C, variando $\pm 1^\circ\text{C}$. Todo o protocolo experimental foi realizado em condições ambientais idênticas às ocorridas durante o período de adaptação.

Quadro 4 Resumo dos grupos experimentais

Atividade Grupo	Pré-treino (20 min, 30 min e 1 dia de repouso)	Treino 1h/dia	Treino antes do desafio antigênico com ovalbumina
Grupo Treinado - (Grupo - T)	-	X	-
Grupo Pré-treino 1 (Grupo - PT1)	X	X	-
Grupo Pré-treino 5 (Grupo - PT5)	X	X (5 dias)	-
Grupo Pré-treino 10 (Grupo - PT10)	X	X (10 dias)	-
Grupo Sedentário (Grupo S)	-	-	-
Grupo Controle Não-Sensibilizado Não-Desafiado (Grupo C)	-	-	-
Grupo Sensibilizado (Grupo Sens.)	-	-	-
Grupo Sensibilizado e Desafiado (Grupo S/D)	-	-	-
Grupo Sensibilizado e desafiado com pré-treino e exercício pré-desafio (Grupo -S/E pré-desafio)	X		X (5 dias)

4.3.4 Experimentos com Traquéias Isoladas

Para a obtenção de traquéias para os estudos de contratilidade do músculo liso das vias aéreas, os animais sofreram eutanásia com altas doses de uma mistura dos anestésicos cloridrato de xilazina (10mg/kg) e quetamina (80mg/kg). Em seguida, após incisão mediana ventral, a traquéia foi imediatamente cortada em segmento único de aproximadamente 8 – 10 mm. Logo depois, o segmento cortado foi transportado para uma placa de Petri contendo solução de *Tyrode* (NaCl-136mM, KCl-2,6mM, MgCl₂-0,98mM, NaH₂PO₄-0,36mM, NaHCO₃-11,9mM, CaCl₂-2mM e Glicose 5,5mM para 1l) sob pH= 7,40, à temperatura ambiente. Após a remoção dos tecidos adjacentes, a traquéia foi cortada em dois segmentos sob a forma de anéis, que foram transferidos para câmaras de banho para órgão isolado, contendo 5ml de solução de *Tyrod*, aerada continuamente com ar atmosférico, o pH da solução foi ajustado para 7,4 e mantida a 37°C pelo uso de bomba de circulação Haake FJ equipada com termostato. A luz dos anéis traqueais foi atravessada por duas peças metálicas confeccionadas em fino aço inoxidável, e que foram atadas a dois pontos, um fixo na câmara e outro conectado à unidade transdutora de força (Grass, modelo FT03C, Quincy, Mass, EUA) apropriada para registro das contrações isométricas.

Os sinais gerados pelo transdutor de força foram amplificados e registrados em um sistema de aquisição computadorizado (registradas com o auxílio do software WindaqTM para WindowsTM) (FIGURA 7). A tensão aplicada a cada segmento traqueal foi ajustada em 1g. O período de equilíbrio foi de 1 hora com troca do líquido de incubação a cada 15 minutos.

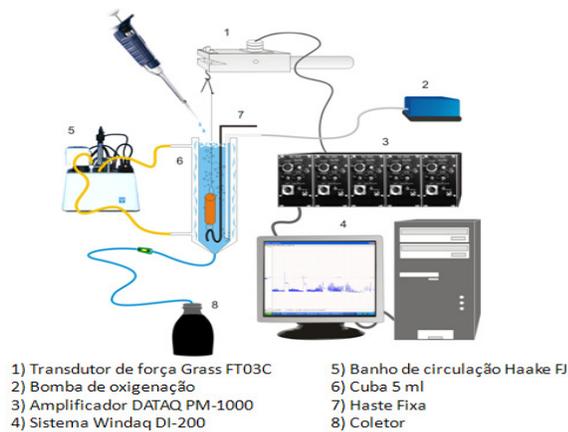


Figura 7 Sistema de cubas isoladas e captação dos dados

Fonte: Figura adaptada de Jucá, 2007, p. 33

4.4 Protocolos Experimentais para a Avaliação da Contratilidade Traqueal

Após período de equilíbrio das preparações conforme descrição anterior, os tecidos foram estimulados visando a obtenção de contrações de referência para avaliar inicialmente a responsividade tecidual. As contrações foram consideradas como a deflexão positiva dos traçados experimentais registrados no *software* de aquisição e foram medidas pela diferença entre o valor assintótico do pico da deflexão e o valor registrado no traçado de tensão basal observada antes da adição do agente contrátil.

Em todos os experimentos, contrações iniciais foram induzidas pela adição de alta concentração de K^+ (60mM) e esse procedimento foi repetido até que duas contrações da mesma magnitude fossem observadas. Nesse momento, o tecido foi considerado em condições de iniciar qualquer outro procedimento, salvo quando explicitamente indicado, foram normalizadas em função da amplitude dessa última contração registrada para o K^+ (Bastos, 2009).

4.4.1 Obtenção das Curvas Concentração-efeito

Curvas concentração-efeito (CCE) foram obtidas pela exposição da preparação a concentrações cumulativamente crescentes de carbacol (CCh) ou KCl. Cada concentração de uma dada substância foi adicionada ao banho e assim foi mantida por um período de cinco minutos até a adição da concentração subsequente

(eventualmente foram necessários até dez minutos para observação do platô da resposta contrátil). O efeito máximo (Emax) para a CCE foi alcançado quando o aumento na concentração de dada substância não induziu resposta contrátil adicional àquela observada com a concentração anterior (Bastos, 2009).

4.4.2 Efeitos do Carbacol na Musculatura Lisa Isolada da Traquéia de Ratos Submetidos ou Não ao Protocolo de Asma, Sedentários ou Exercitados em Diferentes Tempos

Anéis de traquéia com o epitélio íntegro obtidos de animais sedentários ou submetidos a diferentes tempos de exercícios desafiados ou não, conforme descritos no item 4.3.2 e 4.3.3 foram montados em câmaras para órgãos isolados conforme descrição no item 4.3.4. Para estudar as alterações de traquéias isoladas de ratos, foram produzidas CCEs com a adição cumulativa e crescente de carbacol (nas concentrações de 10^{-9} a 10^{-5} M). Após a observação do efeito máximo, o tecido foi lavado mediante trocas sucessivas e completas da solução nutritiva *Tyrod* na câmara de banho, para se observar o retorno do traçado à linha de base, indicando assim a recuperação do tecido.

4.4.3 Efeitos do Potássio na Musculatura Lisa Isolada da Traquéia de Ratos Submetidos ou Não ao Protocolo de Asma, Sedentários ou Exercitados em Diferentes Tempos

Anéis de traquéia com o epitélio íntegro de animais sedentários ou submetidos a diferentes tempos de exercícios asmáticos ou não-asmáticos, conforme descritos no item 4.3.1 e 4.3.2 foram montados em câmaras para órgãos isolados conforme descrição no item 4.3.4. Para estudar as alterações de traquéias isoladas de ratos, foram produzidas CCEs com a adição cumulativa e crescente de potássio (nas concentrações de 10^{-2} a $1,2 \times 10^{-1}$ M). Após a observação do efeito máximo, o tecido foi lavado mediante trocas sucessivas e completas da solução fisiológica na câmara de banho, para se observar o retorno do traçado à linha de base. Dando continuidade, duas novas curvas de referência, para o K^+ 60mM, foram obtidas, conforme protocolo inicial, visando verificar-se a resposta tecidual ao final do experimento.

4.5 Isolamento do Lavado Broncoalveolar (LBA)

O LBA foi retirado dos animais através de cânula traqueal, introduzida por duas vezes com 5 ml de soro fisiológico. O LBA foi recuperado por aspiração manual suave com uma seringa. O volume recuperado, calculado pela média de 75-80% da solução salina instilada, foi imediatamente centrifugado (1000g, por 10 minutos, a 4°C) e o sobrenadante foi armazenado a -20°C até a realização das análises bioquímicas.

4.5.1 Avaliação da Peroxidação Lipídica no Lavado Broncoalveolar (DRAPER *et al.*, 1990).

A peroxidação lipídica foi avaliada pela mensuração de substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas (TBARS). A peroxidação lipídica é uma das mais importantes expressões orgânicas do estresse oxidativo induzido pela reatividade dos radicais livres de oxigênio. O método mais empregado para determinação do MDA (malondialdeído) em amostras biológicas é baseado na sua reação com ácido tiobarbitúrico (TBA). Nesta reação, duas moléculas de TBARS reagem estequiometricamente com uma molécula de MDA para formar um cromóforo róseo, que tem absorvância máxima em solução ácida em 532 a 535 nm. O coeficiente de extinção deste cromóforo num comprimento de onda de 535 nm, pH 1,0, é $1,53 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

Para a realização dos experimentos 63 µl do LBA foram adicionados a 100 µl de ácido perclórico a 35% para precipitar as proteínas. A mistura foi centrifugada a 5000 RPM por 10 min e 150 µl do sobrenadante foram adicionados a 50 µl de uma solução de tiobarbiturato de sódio a 1,2%. A mistura foi levada a banho-maria e aquecida a 95 °C por 30 min. Após resfriada, a absorvância foi medida em um leitor de microplacas a 535 nm e o resultado expresso em absorvância.

4.5.2 Dosagem de Nitrito (Green *et al.*, 1981)

4.5.2.1 Método

O reativo de Griess (N-1-naftiletlenodiamina a 0,1 % em água, sulfanilamida 1 % em ácido fosfórico 5 %) revela a presença de nitrito em uma amostra (urina,

plasma, homogenato tecidual) por uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor róseo, com um pico de absorvância em 560nm.

4.5.2.2 Procedimento Experimental

Para a realização do ensaio foram usados 100 µl do reagente de Greiss e adicionados 100µl do sobrenadante (centrifugado) do LBA dos ratos ou 100 µl dos padrões nas várias concentrações. Para o branco foram usados 100 µl do reagente de Greiss e adicionados 100 µl de salina. A leitura da absorvância foi feita em 560nm em leitor de placa. As leituras da absorvância dos padrões (y) foram plotadas contra as concentrações de cada padrão (x), então determinou-se a equação da reta, que foi usada para a determinação da concentração de cada amostra. Os resultados foram expressos em µM.

4.5.2.3 Soluções Reagentes:

⇒ NEED 0,1 % (N-1-naftiletilenodiamina)

0,1 g de N-1-naftiletilenodiamina (Sigma, EUA) foram diluídos em 100 ml de água destilada.

⇒ Ácido fosfórico 5 %

5ml do ácido fosfórico (Sigma, EUA) foram diluídos para um volume final de 100ml em balão volumétrico.

⇒ Sulfanilamida 1 % em ácido fosfórico 5 %

1g de sulfanilamida (Sigma, EUA) foram dissolvidos em um volume final de 100ml de ácido fosfórico.

⇒ Reagente de uso (Reagente de Greiss)

Misturaram-se partes iguais de NEED 0,1 %, água bidestilada, sulfanilamida a 1 % e ácido fosfórico a 5 % (1:1:1:1).

⇒ Padrão

Foi preparada uma solução de NaNO₂ estoque (10mM em tampão). Foram feitas diluições em série e usadas na obtenção da curva padrão (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 1,32, 0,75 µM).

4.5.3 Dosagem de Proteína (Método Lowry):

4.5.3.1 Método

A quantidade de proteína no LBA foi determinada a 25 °C utilizando albumina sérica bovina como padrão, de acordo com o método previamente descrito (LOWRY *et al.*, 1951), que utiliza duas reações de formação de cor para analisar a concentração protéica fotometricamente.

Inicialmente é feita uma reação biureto de baixa eficiência na qual os íons de cobre alcalino produzem uma cor azulada na presença de ligações peptídicas. Esta cor biureto é característica de todas as proteínas e fornece uma cor básica de fundo para a próxima etapa de ensaio. Depois o método emprega uma mistura complexa de sais inorgânicos, o reagente Folin-Ciocalteau que produz uma cor verde azulada intensa na presença de tirosina ou triptófano livres ou ligados a proteínas. Como as quantidades desses dois aminoácidos são geralmente constantes nas proteínas solúveis, com poucas exceções, a cor das reações (verde-azulada) é indicativa da presença de proteína e a intensidade da cor proporcional à concentração. Esta coloração foi medida em 750 nm, através de espectrofotômetro Beckman DU 640B.

4.5.3.2 Soluções reagentes

- ⇒ **Reagente A:** Na_2CO_3 (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 2 % em NaOH (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) 0,1 N;
- ⇒ **Reagente B:** $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 0,5 % em $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Grupo Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 1 %;
- ⇒ **Reagente C:** Solução de cobre alcalino (24 ml do reagente A com 1 ml do reagente B, misturados no momento de usar);
- ⇒ **Reagente de Folin - Ciocalteau - Fenol** (Labordin, Piraquara, PR, Brasil), 1:1 em água bidestilada;
- ⇒ **Solução de albumina sérica bovina** (Sigma, St Louis, MO, USA) 1 mg/ml em água bidestilada.

4.5.4 Determinação da Atividade da Enzima Acetilcolinesterase

4.5.4.1 Método

A atividade da acetilcolinesterase (AChE) no LBA foi medida de acordo com o método descrito por ELLMAN *et al.* (1961). O método é baseado na medida da velocidade de produção da tiocolina à proporção que a acetiltiocolina (ATC), utilizada como substrato, é hidrolisada. Isto é acompanhado pela reação contínua do tiol com o íon 5:5'-ditio-bis-2 nitrobenzoato, para produzir o ânion amarelo do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico. A atividade enzimática foi medida através da variação da absorbância, durante 3 minutos, sendo a reação linear durante pelo menos 10 minutos. As leituras das absorbâncias foram feitas em 412 nm. A atividade específica foi expressa em nmoles de ATC hidrolisado por miligrama de proteína por minuto.

4.5.4.2 Procedimento Experimental

O LBA foi homogeneizado em tampão fosfato (pH 8,0; 0,1M) 10% e o homogenato (5 µl) foi adicionado a uma cubeta contendo 500µl do tampão, 895µl de água destilada e 50µl de ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB) 0,01M e a absorbância zerada. Após a absorbância ser deixada em zero, a cubeta foi retirada e acrescentado iodeto de acetiotiocolina 0,075M e a absorbância foi registrada por 3min em 412nm.

A atividade da enzima foi calculada como modificações na absorbância do minuto 3 para o minuto 0, relativo ao conteúdo de proteína contido no homogenato (Lowry *et al.*, 1951). O procedimento completo foi feito em um espectrofotômetro Beckman DU 640B ajustado para um comprimento de onda de 412nm.

4.5.4.3 Soluções Reagentes

- ⇒ Solução do ácido 5-tio-2 nitrobenzóico, DTNB (Sigma, St Louis, MO, USA) em 10 mM de tampão fosfato de sódio
- ⇒ Solução de iodeto de acetiltiocolina, ATC (Sigma, St Louis, MO, USA) 75 mM em água bidestilada
- ⇒ Tampão fosfato de sódio: Na₂HPO₄ (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 0,1N em água bidestilada, pH 8,0.

Cálculo:

Δ densidade ótica (DO)/ 4 min

coeficiente de extinção do ânion amarelo formado – 0,0136 μ M

quantidade de LBA – determinação da proteína Lowry

volume final na cubeta – 1,5ml

$$\frac{\Delta (DO) / 4 \text{ min}}{0,0136} \times 1,5 = \text{Atividade da AChE em nmoles/ ml de LBA/ min}$$

4.6 Análise Estatística

Os dados referentes à contração do músculo liso traqueal estão expressos como média \pm EPM de 6 experimentos. A significância foi determinada através da ANOVA *two-way*, seguido pelo teste de *Holm-Sidak* como *post hoc*, além do teste de *Mann-Whitney* (usando Sigma Plot versão 11.0).

Os dados das determinações bioquímicas em LBA são apresentados como média \pm EPM de 6-8 animais por experimento. A significância foi estabelecida através de ANOVA *one way*, seguida pelo teste de *Student Newman-Keuls* como teste *post hoc* (através do programa GraphPad Prism 5.0). Em todos os casos, o nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

V - RESULTADOS



5 RESULTADOS

5.1 Análise dos Efeitos do Treinamento na Resposta da Traquéia Isolada ao K^+

A responsividade inicial do tecido traqueal foi avaliada por meio da obtenção de resposta contrátil induzida por alta concentração de K^+ (60mM). Evidenciou-se que tal resposta coletada na fase inicial dos experimentos foi de $0,83 \pm 0,05\%$ (n=60). Findos os protocolos experimentais, a responsividade ao K^+ foi testada novamente e a resposta contrátil foi de $0,75 \pm 0,03\%$ (n=60). Esses valores obtidos não apresentaram diferença significativa entre si ($p= 0,06$, teste de Mann-Whitney).

5.2 Efeitos do Pré-Treinamento e Treinamento na Contração Induzida por CCh em Traquéias Isoladas de Ratos

Em anéis de traquéias isoladas de ratos sedentários, as respostas contráteis foram avaliadas mediante curvas concentração-efeito construídas para o carbacol (CCh) (10^{-9} a 10^{-5} M) promovendo contração concentração dependente. O pD_2 da curva do grupo sedentário foi de 6,84 [6,22 – 7,28] (n=6) (TABELA 1). Tendo que a magnitude da contração dos anéis de traquéia, induzida pelo CCh nos animais sedentários alcançou, na concentração de 3×10^{-6} M, o valor máximo (E_{max}) de $82,70 \pm 5,90\%$ (n=6) da contração induzida por 60mM de K^+ .

No grupo de animais treinados durante 1 hora sem qualquer pré-treinamento (n=6) o pD_2 foi de 7,06 [6,72 – 7,40], porém este valor não apresentou alteração significativa em relação ao grupo sedentário (pD_2 : 6,84 [6,22 – 7,28]; n=6, $p > 0,05$, ANOVA *one way*) (TABELA 1).

A magnitude da contração dos anéis de traquéia, induzida pelo CCh nos animais treinados por 1 hora sem qualquer pré-treino alcançou, na concentração de 3×10^{-6} M, o valor máximo (E_{max}) de $98,34 \pm 2,64\%$ (n=6) da contração induzida por 60mM de K^+ (FIGURA 8). Essa resposta máxima não apresentou diferença do grupo treinado 1h em relação ao grupo sedentário ($p > 0,05$, ANOVA *one way*).

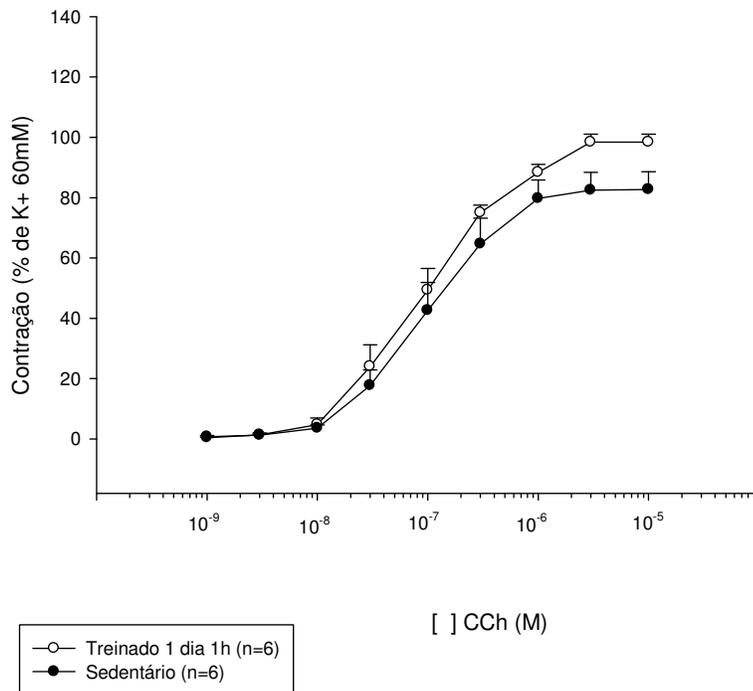


Figura 8 Análise da contratilidade dos anéis de traquéia de rato pela curva concentração-efeito induzida pelo CCh do grupo treinado 1 hora em relação ao grupo sedentário

Grupo sedentário, sem qualquer treinamento

Grupo treinado 1 hora, exercitado 1 hora por 1 dia, sem pré-treinamento

Dados expressos em média \pm E.P.M. ($p > 0,05$, ANOVA one way)

A curva concentração-efeito (CCE) do CCh também foi obtida em traquéias isoladas de ratos para o grupo PT1 ($n=6$), que apresentou pD_2 de 6,85 [6,64 – 7,08] (TABELA 1). Valor esse não diferente em relação ao pD_2 do grupo sedentário (6,84 [6,22 – 7,28], $n=6$, $p > 0,05$, ANOVA *one way*).

A magnitude da contração dos anéis de traquéia induzida pelo CCh no grupo PT1 alcançou, na concentração de 3×10^{-6} M, o valor máximo (E_{max}) de $107,62 \pm 3,57$ % ($n=6$) da contração induzida por 60mM de K^+ (FIGURA 9). A resposta do grupo PT1, nas concentrações 3×10^{-6} à 1×10^{-5} de CCh, foi significativamente maior em relação ao grupo sedentário, cujo valor foi de $E_{max} 82,70 \pm 5,90$ % ($p < 0,05$, ANOVA *two way*, *Holm Sidak*).

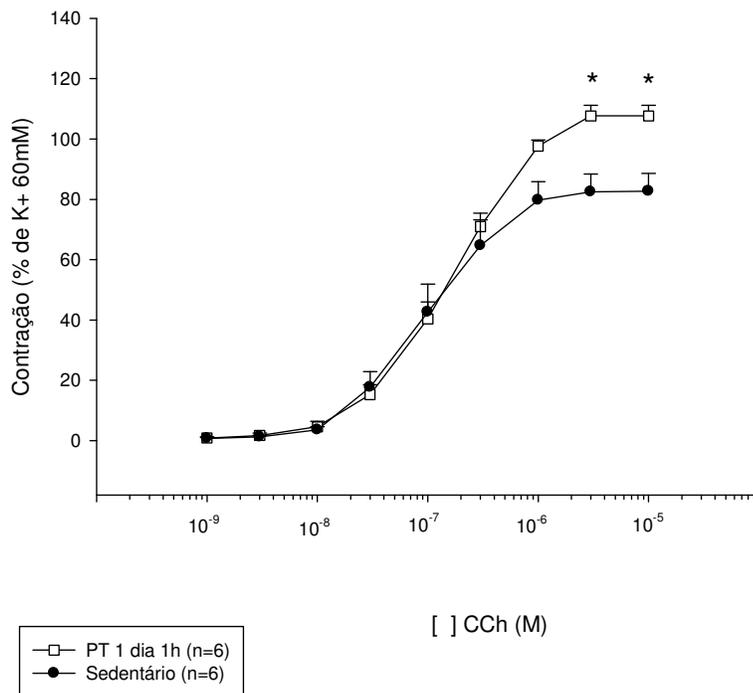


Figura 9 Análise da contratilidade dos anéis de traquéia de ratos pela curva concentração-efeito induzida pelo CCh do grupo PT1 em relação ao grupo sedentário

Grupo sedentário, sem qualquer treinamento

Grupo PT1, pré-treinado e exercitado por 1 hora

Dados expressos em média \pm E.P.M., * $p < 0,05$ em relação ao grupo sedentário, ANOVA two way, Holm Sidak

A resposta ao exercício foi também avaliada em animais do grupo PT5 ($n=6$), que apresentou pD_2 dessa curva de 7,06 [6,91 – 7,22] (TABELA 1). Valor esse significativamente maior que o pD_2 do grupo sedentário ($p < 0,05$, ANOVA *one way*).

A magnitude da contração dos anéis de traquéia induzida pelo CCh no grupo PT5 alcançou, na concentração de 3×10^{-6} M, o valor máximo (E_{max}) de $116,35 \pm 0,54$ % ($n=6$) da contração induzida por 60mM de K^+ (FIGURA 9). A resposta do grupo PT5 apresentou, nas concentrações 3×10^{-6} à 1×10^{-5} do CCh, valor significativamente maior em relação ao grupo sedentário ($p < 0,05$, ANOVA *two way*, *Holm-Sidak*).

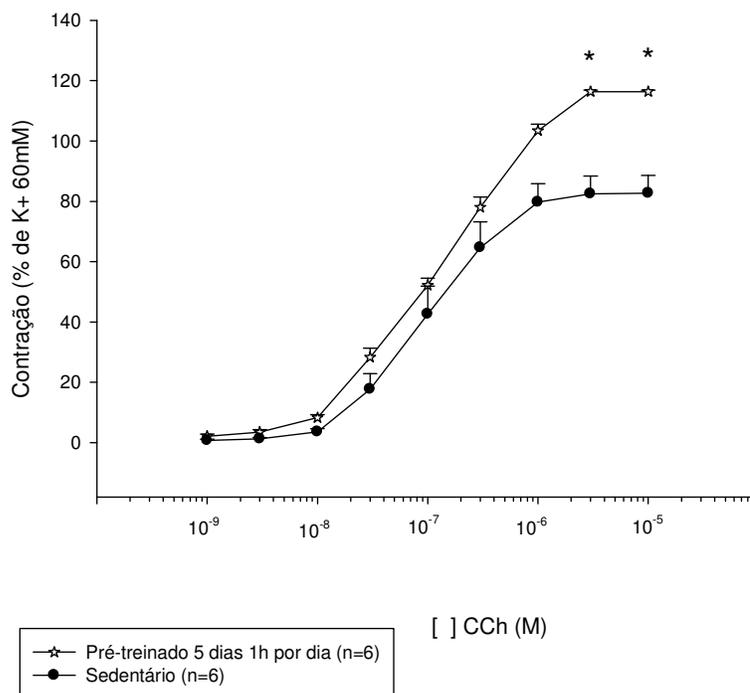


Figura 10 Análise da contratilidade dos anéis de traquéia de rato pela curva concentração-efeito induzida pelo CCh do grupo PT5 em relação ao grupo sedentário

Grupo sedentário, sem qualquer treinamento

Grupo PT5, pré-treinado e treinado 1 hora por dia durante 5 dias

Dados expressos em média \pm E.P.M., * $p < 0,05$ em relação ao grupo sedentário, ANOVA *two way*, *Holm Sidak*

O presente trabalho avaliou também o exercício no grupo PT10 (n=6), que apresentou pD_2 dessa curva de 7,20 [6,67 – 7,51] (TABELA 1). Valor esse significativamente maior que o pD_2 do grupo sedentário ($p < 0,05$, ANOVA *one way*, teste *t de Student*).

A magnitude da contração dos anéis de traquéia induzida pelo CCh no grupo PT10 alcançou, na concentração de 3×10^{-5} M, o valor máximo (E_{max}) de $123,50 \pm 2,59$ % (n=6) da contração induzida por 60mM de K^+ (FIGURA 11). Em anéis isolados de traquéia, a resposta de animais do grupo PT10 apresentou, nas concentrações 1×10^{-6} à 1×10^{-5} M do CCh, valor significativamente maior em relação ao grupo sedentário ($p < 0,05$, ANOVA *two way* e *Holm-Sidak*).

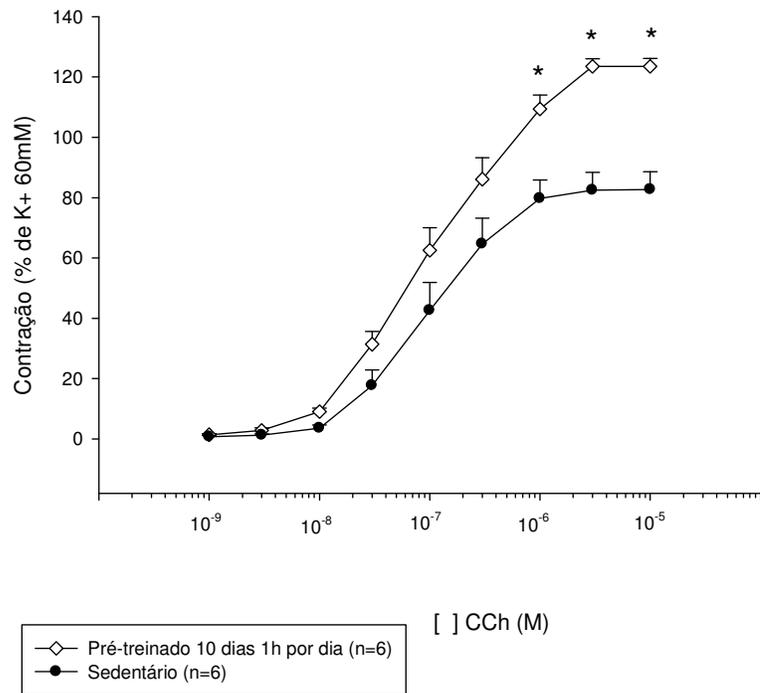


Figura 11 Análise da contratilidade dos anéis de traquéia de rato pela curva concentração-efeito induzida pelo CCh do grupo PT10 em relação ao grupo sedentário

Grupo sedentário, sem qualquer treinamento

Grupo PT10, pré-treinado e treinado 1 hora por dia durante 10 dias

Dados expressos em média \pm E.P.M., * $p < 0,05$ em relação ao grupo sedentário, ANOVA two way, Holm Sidak

Tabela 1 Potência (pD_2) e valores de E_{max} no efeito pró-contrátil induzido por CCh em traquéia de ratos sedentários ou não

CCh	pD_2 (n)	E_{max} (%)
Sedentário	6,84 [6,22 – 7,28] (6)	82,70 ± 5,90
Treinado 1h	7,06 [6,72 – 7,40] (6)	98,34 ± 2,64
PT1	6,85 [6,64 – 7,08] (6)	107,62 ± 3,57 ^b
PT5	7,06 [6,91 – 7,22] ^a (6)	116,35 ± 0,54 ^b
PT10	7,20 [6,67 – 7,51] ^a (6)	123,50 ± 2,59 ^b

pD_2 : expressa os valores do logaritmo negativo de 50% do efeito máximo da concentração máxima (EC_{50}), em mol/l;

E_{max} : valores da contração máxima expressos em % da contração inicial induzida por 60mM de K^+

Dados expressos em média ± E.P.M.,^a $p < 0,05$ em relação ao grupo sedentário, ANOVA *one way*, teste *t de Student*; ^b $p < 0,05$ em relação ao grupo sedentário, ANOVA *two way*, *Holm Sidak*

5.3 Efeitos do Pré-Treinamento e Treinamento na Contração Induzida por Potássio em Traquéias Isoladas de Ratos

Em anéis de traquéias isoladas de ratos sedentários, as respostas contráteis foram avaliadas mediante curvas concentração-efeito construídas para K^+ (10^{-2} à $1,2 \times 10^{-1}$ M) promovendo contração concentração-dependente. O pD_2 da curva do grupo sedentário foi de 1,38 [1,17 – 1,56] (n=6) (TABELA 2).

A magnitude da contração dos anéis de traquéia, induzida pelo K^+ nos animais sedentários alcançou, na concentração de 1×10^{-1} M, o valor máximo (E_{max}) de 90,45 ± 2,22 % (n=6) da contração induzida por 60mM de K^+ .

Em animais treinados 1 hora sem qualquer pré-treinamento (n=6) o pD_2 foi de 1,43 [1,31 – 1,51], porém esse valor não apresentou alteração significativa com relação ao grupo sedentário ($p > 0,05$, ANOVA *one way*) (TABELA 2).

A magnitude da contração dos anéis de traquéia, induzida por K^+ nos animais treinados 1 hora sem qualquer pré-treino alcançou, na concentração de 1×10^{-1} M, o valor máximo (E_{max}) de $98,89 \pm 1,12\%$ (n=6) da contração induzida por 60mM de K^+ (FIGURA 12). Essa resposta máxima não apresentou diferença estatística do grupo treinado 1h em relação ao grupo sedentário ($p > 0,05$, ANOVA *one way*).

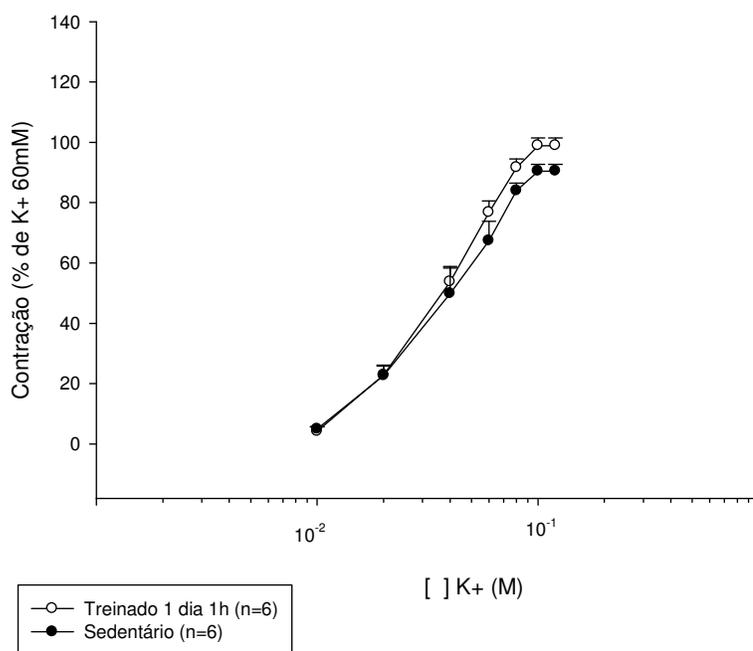


Figura 12 Análise da contratilidade dos anéis de traquéia de rato pela curva concentração-efeito induzida pelo K^+ do grupo treinado 1 hora em relação ao grupo sedentário

Grupo sedentário sem nenhum treinamento
 Grupo treinado 1 hora sem pré-treinamento
 Dados expressos em média \pm E.P.M

A CCE do K^+ também foi obtida em traquéias isoladas do grupo PT1 (n=6), que apresentou pD_2 de 1,46 [1,40 – 1,54] (TABELA 2). Valor esse não diferente em relação ao pD_2 do grupo sedentário ($p > 0,05$ ANOVA *one way*).

A magnitude da contração dos anéis de traquéia induzida pelo K^+ no grupo PT1 alcançou, na concentração de 1×10^{-1} M, o valor máximo (E_{max}) de $105,19 \pm$

1,22 % (n=6) da contração induzida por 60mM de K⁺ (FIGURA 13). A resposta do grupo PT1, nas concentrações de 8x10⁻² à 1,2x10⁻¹ M de K⁺, foi significativamente maior que a do grupo sedentário (p < 0,05, ANOVA *two way*, *Holm-Sidak*, n=6).

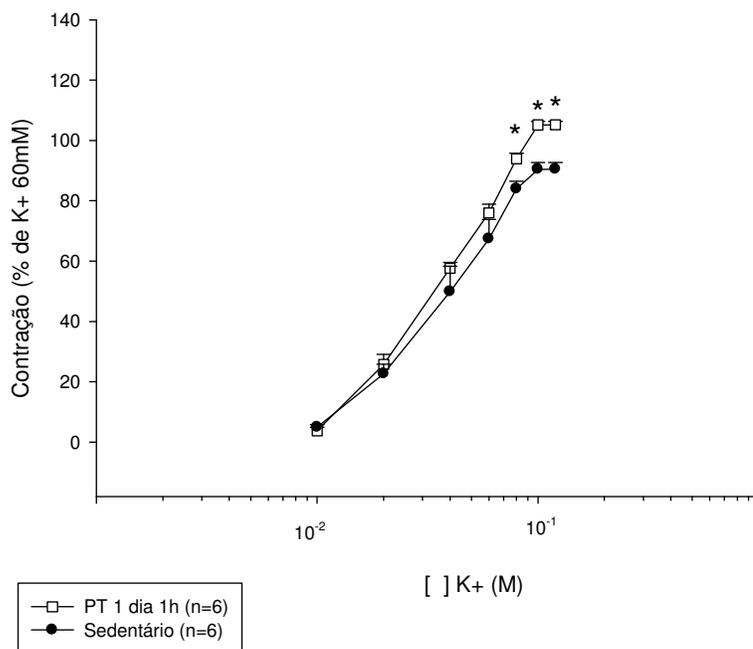


Figura 13 Análise da contratilidade dos anéis de traquéia de rato pela curva concentração-efeito induzida pelo K⁺ do grupo PT1 em relação ao grupo sedentário
 Grupo sedentário sem nenhum treinamento
 Grupo PT1, pré-treinado e treinado 1 hora por 1 dia
 Dados expressos em média ± E.P.M., * p < 0,05 em relação ao sedentário, ANOVA *two way*, *Holm Sidak*

O exercício foi avaliado em animais do grupo PT5 (n=6), que apresentou pD₂ de 1,48 [1,37-1,57] (TABELA 2). Valor esse que não apresentou diferenças estatísticas em relação ao pD₂ do grupo sedentário (1,38 [1,17 – 1,56], n=6, p > 0,05, ANOVA *one way*).

A magnitude da contração dos anéis de traquéia induzida pelo K⁺ no grupo PT5 alcançou, na concentração de 1x10⁻¹ M, o valor máximo (E_{max}) de 112,02 ± 1,44 % (n=6) da contração induzida por 60mM de K⁺ (FIGURA 14). A resposta do grupo PT5, nas concentrações de 8x10⁻² à 1,2x10⁻¹M de K⁺, foi significativamente maior que a do grupo sedentário (p < 0,05, ANOVA *two way*, *Holm-Sidak*, n=6).

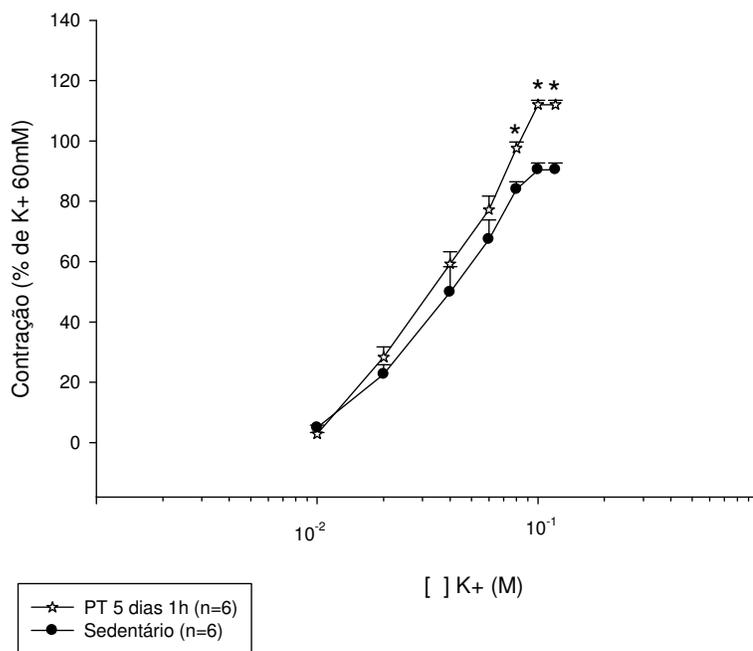


Figura 14 Análise da contratilidade dos anéis de traquéia de rato pela curva concentração-efeito induzida pelo K⁺ do grupo PT5 em relação ao grupo sedentário
 Grupo sedentário sem nenhum treinamento
 Grupo PT5 pré-treinado e treinado 1 hora por 5 dias
 Dados expressos em média ± E.P.M., * p < 0,05 em relação ao sedentário, ANOVA two way, Holm Sidak

O presente trabalho também analisou a resposta do exercício no grupo PT10 (n=6), que apresentou pD₂ de 1,43 [1,38 – 1,52] (TABELA 2). Valor esse não diferente em relação ao pD₂ do grupo sedentário (p > 0,05, ANOVA one way).

Já a magnitude da contração traqueal induzida pelo K⁺ alcançou, na concentração de 1x10⁻¹ M, o valor máximo (E_{max}) de 119,56 ± 0,95 % (n=6) da contração induzida por 60mM de K⁺ (FIGURA 15). A resposta do grupo PT10 apresentou significância estatística, nas concentrações de 6x10⁻² à 1,2x10⁻¹M de K⁺, em relação ao grupo sedentário (p < 0,05, ANOVA two way, Holm-Sidak).

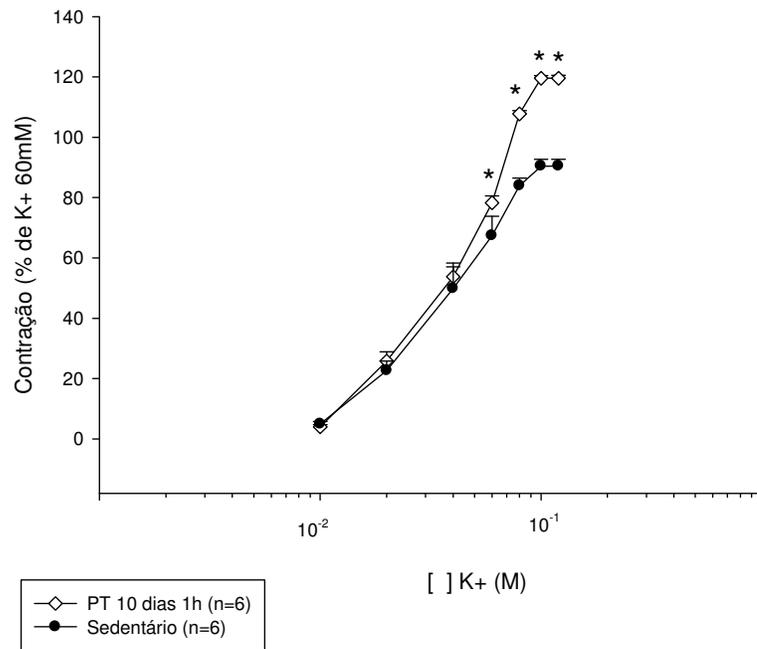


Figura 15 Análise da contratilidade dos anéis de traquéia de rato pela curva concentração-efeito induzida pelo K⁺ do grupo PT10 em relação ao grupo sedentário Grupo sedentário, sem qualquer treinamento Grupo PT10, pré-treinado 1 treinado 1 hora por dia durante 10 dias Dados expressos em média ± E.P.M., * p < 0,05 em relação ao sedentário, ANOVA two way, Holm Sidak

Tabela 2 Potência (pD_2) e valores de E_{max} do efeito pró-contrátil induzido por K^+ em traquéia de ratos sedentários ou não

K^+	pD_2 (n)	E_{max} (%)
Sedentário	1,38 [1,17 – 1,56] (6)	90,45 ± 2,22
Treinado 1h	1,43 [1,31 – 1,51] (6)	98,89 ± 2,58
PT1	1,46 [1,40 – 1,54] (6)	105,19 ± 1,12 ^a
PT5	1,48 [1,37 – 1,57] (6)	112,02 ± 1,44 ^a
PT10	1,43 [1,38 – 1,52] (6)	119,56 ± 0,95 ^a

pD_2 : expressa os valores do logaritmo negativo de 50% do efeito máximo da concentração máxima (EC50), em mol/l;

E_{max} : valores da contração máxima expressos em % da contração inicial induzida por 60mM de K^+

Dados expressos em média ± E.P.M., ^a $p < 0,05$ em relação ao grupo sedentário, ANOVA *two way*, *Holm Sidak*

5.4 Análise das Alterações nas Curvas Concentração-efeito do Carbacol em Traquéias Isoladas de Ratos Sensibilizados e/ou Desafiados ao Antígeno Sensibilizante e os Efeitos do Exercício

Curva concentração-efeito foi construída para CCh (10^{-9} à 10^{-5} M) em anéis de traquéia isolada dos animais controle, sensibilizados e desafiados com OVA sem exercício. O pD_2 na curva do grupo controle foi de 6,84 [6,22 – 7,28] e a resposta máxima deste mesmo grupo foi de 82,69 ± 5,90 %; já no grupo sensibilizado, o pD_2 foi de 6,80 [6,05 – 7,29], e a resposta máxima desse grupo sensibilizado, na concentração de 1×10^{-1} M, foi de 80,66 ± 5,86 %, valores esses não significativos tanto na potência quanto na E_{max} , respectivamente ($n=6$, $p > 0,05$, ANOVA *one way*). Daqui em diante, o grupo sensibilizado será utilizado como controle para a comparação dos valores em relação aos demais grupos em estudo.

O valor do pD_2 na curva para o grupo sensibilizado/desafiado (S/D) foi de 7,02 [6,50 – 7,43]. Esse valor não mostrou diferenças significativas em relação ao grupo sensibilizado (pD_2 : 6,80 [6,05 – 7,29]), (n=6) (TABELA 3).

A magnitude da contração induzida no grupo S/D alcançou, na concentração de 3×10^{-5} M, o valor máximo (E_{max}) de $100,57 \pm 4,16$ %. A resposta do grupo S/D foi significativamente maior, nas concentrações de 3×10^{-6} e 1×10^{-5} do CCh, em relação ao grupo sensibilizado (E_{max} : $80,66 \pm 5,86$ %) ($p < 0,05$, ANOVA *two way*, *Holm-Sidak*) (FIGURA 16 e TABELA 3).

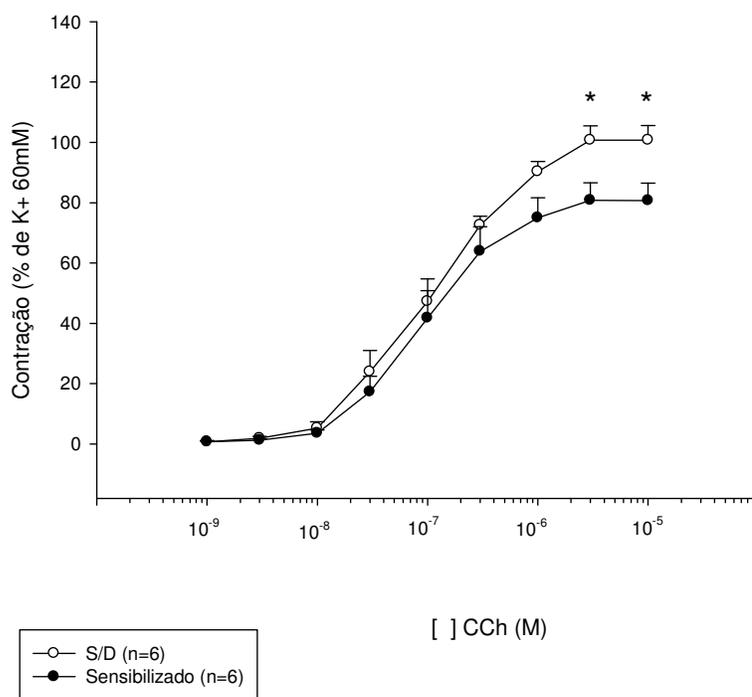


Figura 16 Análise da contratilidade dos anéis de traquéia de rato pela curva concentração-efeito induzida pelo CCh em grupos sensibilizados e/ou desafiados com OVA ou solução salina

Grupo sensibilizado - sensibilizado com OVA e desafiado com salina

Grupo S/D - sensibilizado com OVA e desafiado com OVA

Dados expressos em média \pm E.P.M., * $p < 0,05$ em relação ao sensibilizado, ANOVA *two way*, *Holm Sidak*

A resposta ao exercício foi avaliada em animais do grupo sensibilizado/exercitado (S/E) pré-desafio antigênico (n=6), cujo pD_2 foi de 7,02 [6,50 - 7,43] (TABELA 3). Valor esse não diferente em relação ao pD_2 do grupo sensibilizado (6,80 [6,05 – 7,29]) e do grupo S/D (7,02 [6,70 - 7,38]).

A magnitude da contração dos anéis de traquéia induzida pelo CCh no grupo S/E pré-desafio alcançou, na concentração de 3×10^{-5} M, o valor máximo (Emax) de $109,09 \pm 3,68$ % (n=6) em relação à contração induzida por 60mM de K^+ (FIGURA 17). A resposta do grupo S/E pré-desafio foi significativamente maior, nas concentrações 1×10^{-6} à 1×10^{-5} M de CCh, em relação aos grupos sensibilizado (Emax $80,66 \pm 5,86$ %) e S/D (Emax $100,57 \pm 4,16$ %, $p < 0,05$, *Holm-Sidak*, n=6).

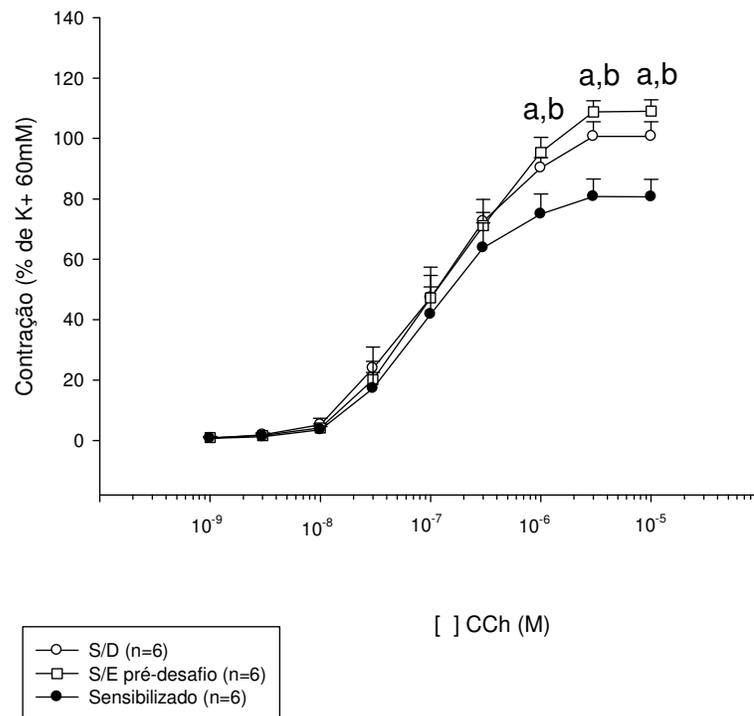


Figura 17 Análise da contratilidade dos anéis de traquéia de rato pela curva concentração-efeito induzida pelo CCh no grupo S/E pré-desafio em relação aos grupos sensibilizado e S/D

Grupo sensibilizado - sensibilizado com OVA e desafiado com salina;

Grupo S/D - sensibilizado com OVA e desafiado com OVA, sem qualquer treinamento;

Grupo S/E - pré-desafio, sensibilizado com OVA, exercitado 1 hora por dia durante 5 dias e desafiado com OVA

Dados expressos em média \pm E.P.M., ^a $p < 0,05$ em relação ao grupo sensibilizado, ^b $p < 0,05$ em relação ao grupo S/D

Tabela 3 Potência (pD_2) e valores de E_{max} das curvas concentração-efeito induzidas por carbacol em traquéias obtidas de ratos controle, sensibilizados e desafiados, submetidos ou não a treinamento

CCh	pD_2 (n)	E_{max} [3×10^{-5}]
Controle	6,84 [6,22 – 7,28] (6)	82,69 ± 5,90
Sensibilizado	6,80 [6,05 – 7,29] (6)	80,66 ± 5,86
S/D	7,02 [6,70 – 7,38] (6)	100,57 ± 4,16 ^c
S/E pré-desafio	7,02 [6,50 – 7,43] (6)	109,09 ± 3,68 ^{a,b}

pD_2 : expressa os valores do logaritmo negativo de 50% do efeito máximo da concentração máxima (EC_{50}), em mol/l;

E_{max} : valores de contração máxima expresso em % da contração inicial induzida por 60mM de K^+

Dados expressos em média ± E.P.M., ^a $p < 0,05$ significativo em relação ao grupo sensibilizado, ^b $p < 0,05$ significativo em relação ao grupo S/D, ^c $p < 0,05$ significativo em relação ao grupo sensibilizado

5.5 Análise das Alterações do Potássio nas Curvas Concentração-efeito do Potássio em Traquéias Isoladas de Ratos Sensibilizados e/ou Desafiados ao Antígeno Sensibilizante e os Efeitos do Exercício

Curva concentração-efeito foi construída para o K^+ (10^{-3} a $1,2 \times 10^{-2}$ M) em anéis de traquéia isolada dos animais controle, sensibilizados e desafiados com ou sem OVA sem exercício.

O pD_2 do grupo controle foi de 1,38 [1,20 – 1,54], e a resposta máxima foi de 93,11 ± 3,58 %, já para o grupo sensibilizado, esse valor foi de 1,40 [1,31-1,50], e a resposta máxima foi de 91,68 ± 2,99 %, valores esses não significativos em relação tanto à potência quanto ao E_{max} , respectivamente ($n=6$, $p > 0,05$, ANOVA one way) (TABELA 3). Daqui em diante, o grupo sensibilizado será utilizado como controle para a comparação dos valores em relação aos demais grupos em estudo.

O valor do pD_2 na curva para o grupo sensibilizado/desafiado (S/D) foi de 1,42 [1,29 – 1,52]. Esse valor não evidenciou diferenças significativas em relação ao grupo sensibilizado (pD_2 : 1,40 [1,31 – 1,50]), $n=6$ (TABELA 4).

A magnitude da contração induzida no grupo S/D alcançou, na concentração 1×10^{-1} M, o valor máximo (E_{max}) de $105,50 \pm 2,37$ %. A resposta do grupo S/D foi significativamente maior, nas concentrações de 8×10^{-2} e 1×10^{-1} do K^+ , em relação ao grupo sensibilizado (E_{max} : $91,68 \pm 2,99$ %) ($n=6$, $p < 0,05$, ANOVA *two way*, *Holm-Sidak*) (FIGURA 18) (TABELA 4).

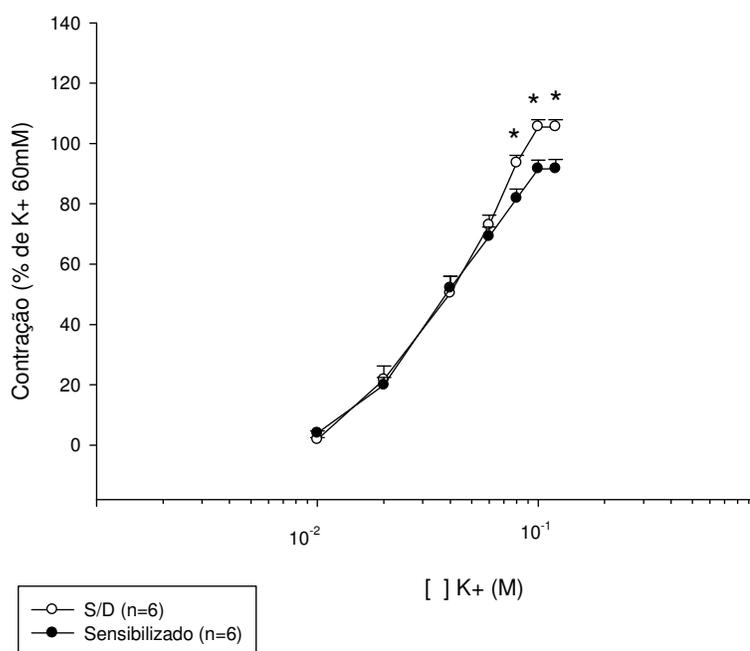


Figura 18 Análise do tecido muscular liso em curva concentração-efeito induzida por K^+ em traquéias isoladas de ratos sensibilizados e/ou desafiados com OVA ou solução salina

Grupo sensibilizado - sensibilizado com OVA e desafiado com salina;

Grupo S/D - sensibilizado com OVA e desafiado com OVA

Dados expressos em média \pm E.P.M., * $p < 0,05$ em relação ao sensibilizado, ANOVA *two way*, *Holm Sidak*

A resposta do exercício foi também avaliada em animais do grupo sensibilizado/exercitado (S/E) pré-desafio antigênico ($n=6$), que apresentou pD_2 de 1,38 [1,34 – 1,42] (TABELA 4). Valor esse não diferente em relação ao pD_2 do grupo sensibilizado (1,40 [1,31 – 1,50]) e do grupo S/D (1,42 [1,29 – 1,52]).

A magnitude da contração dos anéis de traquéia induzida pelo K^+ no grupo S/E pré-desafio alcançou, na concentração de 1×10^{-1} M, o valor máximo (Emax) de $115,05 \pm 1,96$ % (n=6) da contração induzida por 60mM de K^+ (FIGURA 19). A resposta do grupo S/E pré-desafio foi significativamente maior, nas concentrações 8×10^{-2} e 1×10^{-1} de K^+ , em relação ao grupo sensibilizado (Emax $93,11 \pm 3,58$ %) e S/D (Emax $105,50 \pm 2,37$ %, $p < 0,05$, ANOVA, *Holm-Sidak*, n=6).

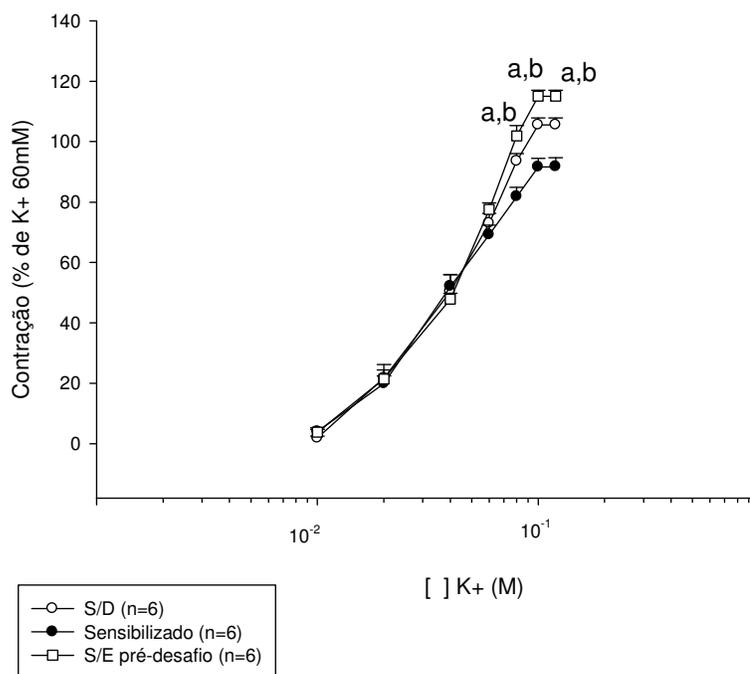


Figura 19 Análise do tecido muscular liso em curva concentração-efeito induzida pelo K^+ do grupo S/E pré-desafio em relação aos grupos sensibilizado e S/D
 Grupo sensibilizado - sensibilizado com OVA e desafiado com salina;
 Grupo S/D - sensibilizado com OVA e desafiado com OVA, sem qualquer treinamento;
 Grupo S/E - pré-desafio, sensibilizado com OVA, exercitado 1 hora por dia durante 5 dias e desafiado com OVA
 Dados expressos em média \pm E.P.M., ^a $p < 0,05$ em relação ao grupo sensibilizado, ^b $p < 0,05$ em relação ao grupo S/D

Tabela 4 Potência (pD_2) e valores de E_{max} das curvas concentração-efeito induzidas por potássio em traquéias obtidas de ratos sensibilizados com salina ou OVA e/ou desafiados com salina ou OVA, submetidos ou não a treinamento

K^+	pD_2 (n)	E_{max} [1×10^{-1}]
Controle	1,38 [1,20 – 1,54] (6)	93,11 ± 3,58
Sensibilizado	1,40 [1,31– 1,50] (6)	91,68 ± 2,99
S/D	1,42 [1,29 – 1,52] (6)	105,50 ± 2,37 ^c
S/E pré-desafio	1,38 [1,34 – 1,42] (6)	115,05 ± 1,96 ^{a,b}

pD_2 : expressa os valores do logaritmo negativo de 50% do efeito máximo da concentração máxima (EC_{50}), em mol/l;

E_{max} : valores da contração expressos em % da contração máxima inicial induzida por 60mM de K^+

Dados expressos em média ± E.P.M., ^a $p < 0,05$ significativo em relação ao grupo sensibilizado, ^b $p < 0,05$ significativo em relação ao grupo S/D, ^c $p < 0,05$ significativo em relação ao grupo sensibilizado

5.6 Efeito do Exercício nos Níveis de Nitrito em Lavado Broncoalveolar de Ratos Submetidos ou Não a Treinamento

A determinação dos níveis de nitrito é um marcador indireto do óxido nítrico, considerado como responsável pela homeostase das vias aéreas. Estes marcadores foram avaliados em lavado broncoalveolar de ratos submetidos ou não a exercício, conforme informado na metodologia, $n = 6-8$ animais.

Na análise do nitrito evidenciou-se que o grupo sedentário apresentou valor médio de $4,45 \pm 0,43 \mu M$. No grupo treinado 1 hora esse valor médio foi de $4,21 \pm 0,35 \mu M$. Já o grupo PT1 mostrou valor médio de $5,07 \pm 1,18 \mu M$. O grupo PT5 apresentou resultado médio de $2,02 \pm 0,72 \mu M$. E, no grupo PT10, os valores médios foram de $6,55 \pm 0,43 \mu M$.

O grupo PT5 apresentou valores médios de nitrito significativamente menores que os dos grupos sedentário e treinado, $p < 0,05$, ANOVA *one way*, teste *t de Student*. (FIGURA 20).

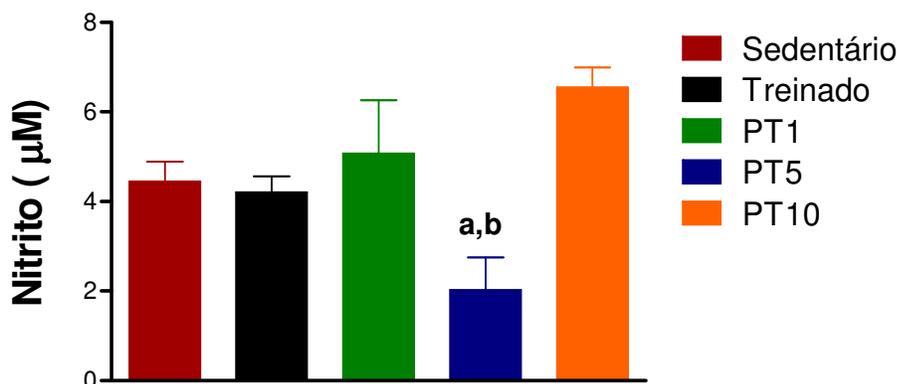


Figura 20 Análise comparativa dos valores de nitrito em lavado broncoalveolar de ratos, submetidos ou não a treinamento (valores expressos em μM)
Dados são expressos em média \pm E.P.M., ^{a,b} $p < 0,05$, ^a- significativo em relação ao grupo sedentário, ^b- significativo em relação ao grupo treinado, ANOVA *one way*, teste *t de Student*

5.7 Efeitos do Exercício nos Níveis de Nitrito em Lavado Broncoalveolar de Ratos Sensibilizados e/ou Desafiados com OVA e Submetidos ou não a Treinamento

Nitrito é um marcador indireto do óxido nítrico, considerado como responsável pela homeostase das vias aéreas. Este marcador foi avaliado em lavado broncoalveolar de ratos sensibilizados e/ou desafiados com OVA e submetidos ou não a treinamento, conforme procedimento descrito na metodologia, $n=6-8$ animais.

No grupo de animais controle, o valor médio do marcador nitrito foi de $10,39 \pm 1,42 \mu\text{M}$. No grupo sensibilizado, esse valor foi de $10,05 \pm 1,18 \mu\text{M}$. Já o grupo sensibilizado/desafiado (S/D) apresentou valor médio de $5,60 \pm 0,54 \mu\text{M}$, sendo esta diminuição significativa em relação ao grupo controle. O grupo sensibilizado/desafiado (S/E) pré-desafio, apresentou resultados de $7,00 \pm 0,43 \mu\text{M}$, sendo também significativo em relação ao grupo controle, $p < 0,05$, ANOVA *one way* teste *t de Student*. (FIGURA 21).

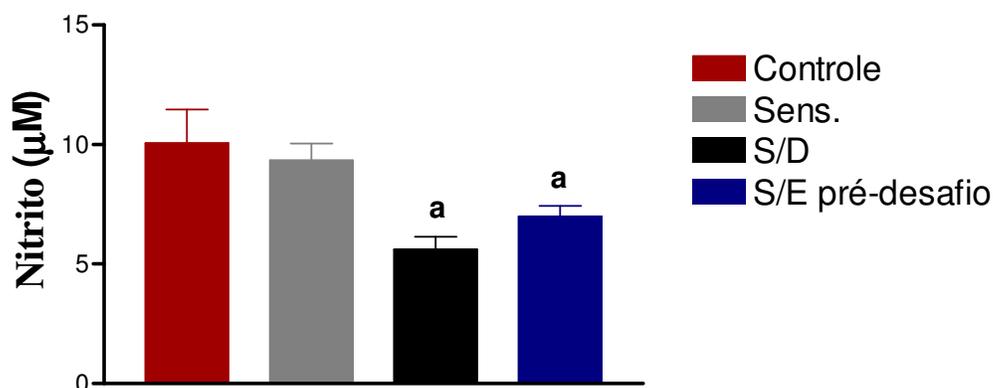


Figura 21 Análise comparativa dos valores de nitrito em lavado broncoalveolar de ratos controle e do grupo sensibilizado e/ou desafiado com OVA ou solução salina, treinados ou não (valores expressos em µM)

Dados são expressos em média ± E.P.M., ^a $p < 0,05$, significativo em relação ao grupo controle, ANOVA *one way*, teste *t de Student*

5.8 Análise dos Efeitos da Peroxidação Lipídica (TBARs) em Lavado Broncoalveolar de Ratos Submetidos ou Não a Treinamento

Na tentativa de se verificar lesão tecidual *in vitro* em diferentes tempos de exercício a curto prazo, retirou-se o lavado broncoalveolar dos animais, conforme procedimento já descrito na metodologia, n= 6-8 animais foram utilizados para a verificação dos níveis de TBARs.

No grupo de animais sedentários, o valor médio da absorbância foi de $0,06 \pm 0,01$. No grupo treinado por 1 hora, esse valor ficou em $0,07 \pm 0,004$. Já no grupo PT1, esses valores foram de $0,12 \pm 0,02$ de absorbância sendo estatisticamente significativo em relação ao grupo sedentário. No grupo PT5 e PT10 esses valores foram de $0,13 \pm 0,40$ e $0,10 \pm 0,01$ de absorbância, respectivamente, sendo significativos em relação ao sedentário (ANOVA *one way*, teste *t de Student*). (FIGURA 22).

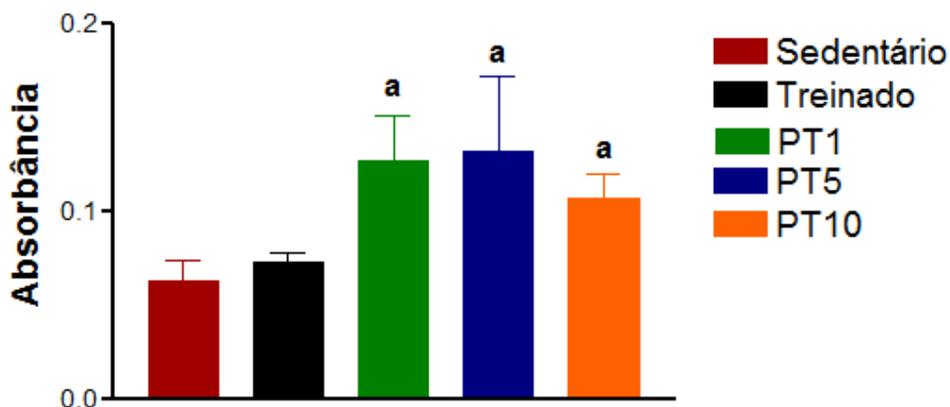


Figura 22 Análise comparativa dos valores da peroxidação lipídica em lavado broncoalveolar de ratos, submetidos ou não a treinamento (valores expressos em absorbância)

Dados expressos em média \pm E.P.M., ^a $p < 0,05$, significativo em relação ao grupo sedentário, ANOVA *one way*, teste *t de Student*

5.9 Análise dos Efeitos da Peroxidação Lipídica (TBARs) em Lavado Broncoalveolar de Ratos Sensibilizados e/ou Desafiados com OVA e Submetidos ou Não a Treinamento

Na tentativa de se verificar lesão tecidual *in vitro* em animais sensibilizados com salina ou OVA e desafiados com salina ou OVA, submetidos a exercícios de curto prazo e pré-desafiados antigênico, retirou-se o lavado broncoalveolar dos animais, conforme procedimento já descrito, $n = 6-8$ animais.

No grupo de animais controle, o valor médio da absorbância na peroxidação lipídica foi de $0,07 \pm 0,01$. No grupo sensibilizado, esse valor foi de $0,10 \pm 0,01$. Já no grupo sensibilizado/desafiado (S/D), esse valor foi de $0,16 \pm 0,05$ de absorbância. O grupo sensibilizado/desafiado (S/E) pré-desafio apresentou valor de $0,13 \pm 0,02$ de absorbância. Os grupos S/D e S/E pré-desafio foram, portanto, significantes em relação ao grupo controle, $p < 0,05$, ANOVA *one way*, teste *t de Student*. (FIGURA 23).

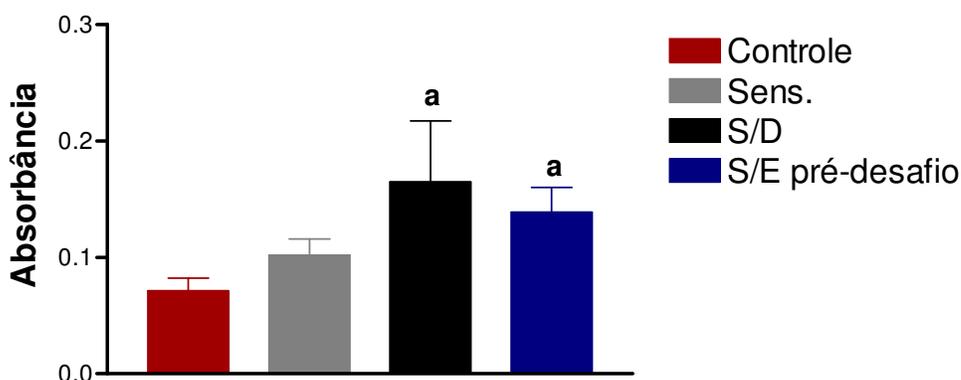


Figura 23 Análise comparativa dos valores da peroxidação lipídica em lavado broncoalveolar de ratos controle e do grupo sensibilizado e/ou desafiado com OVA ou solução salina, treinados ou não (valores expressos em absorbância) Dados expressos em média \pm E.P.M., ^a $p < 0,05$, significativo em relação ao grupo controle, ANOVA *one way*, teste *t de Student*

5.10 Análise dos Efeitos da Enzima Acetilcolinesterase (AChE) em Lavado Broncoalveolar de Ratos Submetidos ou não a Exercícios

A atividade da enzima acetilcolinesterase foi avaliada em diferentes tempos de exercício a curto prazo, mediante retirada do lavado broncoalveolar dos animais, conforme procedimento já descrito (n= 6-8 animais).

O grupo sedentário apresentou valor médio de $93,06 \pm 8,9$ nmoles/mg de proteína/min. No grupo treinado por 1 hora, o valor foi de $92,34 \pm 14,01$ nmoles/mg de proteína/min. Já os grupos PT1, PT5 e PT10 apresentaram redução da atividade desta enzima que foi significativa, ANOVA *one way*, teste *t de Student*, quando comparado ao grupo sedentário e treinado (PT1 $44,15 \pm 4,2$; PT5 $18,2 \pm 3,14$; PT10 $33,31 \pm 6,88$ nmoles/mg de proteína/min) (FIGURA 24).

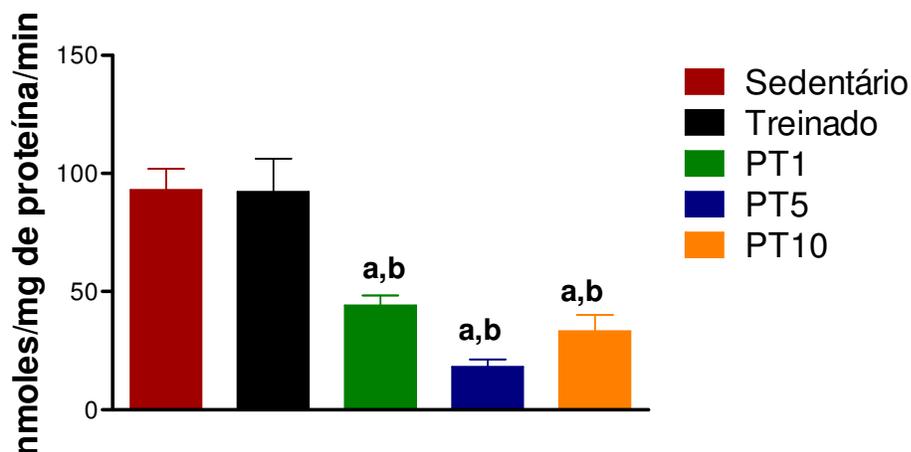


Figura 24 Análise comparativa dos valores da acetilcolinesterase em lavado broncoalveolar de ratos submetidos ou não a treinamento (valores expressos em nmoles/mg de proteína/min)

Dados expressos em média \pm E.P.M., ^{a,b} $p < 0,05$, ^a- significativo em relação ao grupo sedentário, ^b- significativo em relação ao grupo treinado, ANOVA *one way*, teste *t de Student*

5.11 Análise dos Efeitos da Enzima Acetilcolinesterase (AChE) em Lavado Broncoalveolar de Ratos Sensibilizados e/ou Desafiados com OVA e Submetidos ou não a Treinamento

A atividade da enzima acetilcolinesterase também foi avaliada em animais sensibilizados com salina ou OVA e desafiados com salina ou OVA, e submetidos a exercícios de curto prazo pré-desafio antigênico, $n = 6-8$ animais.

No grupo de animais controle, o valor médio da atividade da AChE em nmoles/mg de proteína/min foi de $96,75 \pm 8,9$. No grupo sensibilizado, esse valor foi de $96,55 \pm 7,03$ nmoles/mg de proteína/min em relação ao grupo anterior. Já no grupo sensibilizado/desafiado (S/D) e sensibilizado/exercitado (S/E) pré-desafio ocorreu redução significativa, ANOVA *one way*, teste *t de Student*, da atividade desta enzima para $49,3 \pm 7,86$ e $57,8 \pm 5,5$ nmoles/mg de proteína/min, respectivamente (FIGURA 25).

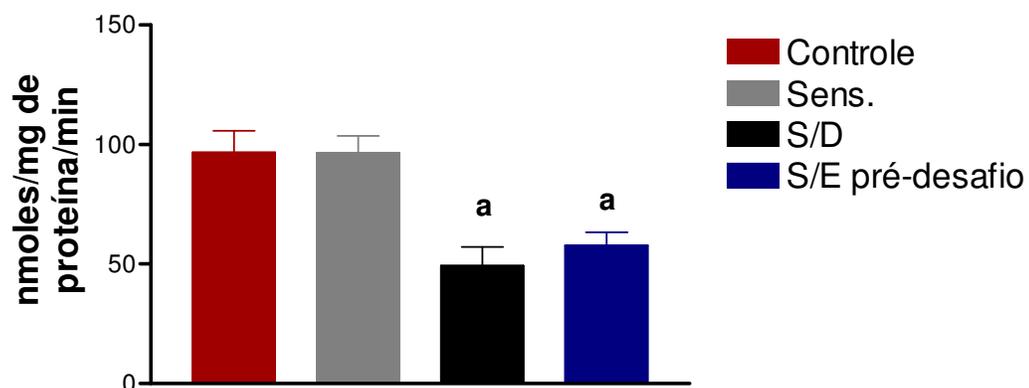


Figura 25 Análise comparativa dos valores da acetilcolinesterase em lavado broncoalveolar de ratos controle e do grupo sensibilizado e/ou desafiado com OVA ou solução salina, treinados ou não (valores expressos em nmoles/mg de proteína/min)

Dados expressos em média \pm E.P.M., ^a $p < 0,05$, significativo em relação ao grupo controle, ANOVA *one way*, teste *t de Student*

VI- *DISCUSSÃO*



6 DISCUSSÃO

Na primeira parte deste trabalho foi verificada a resposta *in vitro* do músculo liso traqueal de animais submetidos a exercício físico leve (sem acoplamento de peso ao corpo dos animais) e de curta duração utilizando-se como estímulos contráteis o carbacol e potássio. Duas contrações de mesma magnitude, com referência ao K^+ 60mM, foram obtidas no início e ao final de cada experimento, para ambos os agentes contráteis, com fins de se estabelecer a responsividade do tecido em estudo.

Os resultados mostraram que: 1) em animais pré-treinados, com exercício de 1h por 1 dia (PT1), o treinamento exacerba a contração da musculatura lisa traqueal isolada de ratos, em relação ao grupo sedentário, para carbacol e potássio; 2) em animais pré-treinados, com exercício de 1h por dia durante 5 dias (PT5), o treinamento exacerba ainda mais a contração (apresentando maior resposta máxima), da musculatura lisa traqueal de ratos, em relação ao grupo sedentário, especialmente nas maiores concentrações, para ambos os agentes contráteis testados; 3) em animais pré-treinados, com exercício de 1h por dia durante 10 dias (PT10), o treinamento promove a contração em maior intensidade da musculatura lisa traqueal isolada de ratos, em relação ao grupo sedentário, para ambos os agentes contráteis testados.

Para evitar um componente ansiogênico, que levaria a uma ativação do Sistema Nervoso Autônomo e, como resposta, uma descarga parassimpática com conseqüente contração da musculatura lisa, assim como, para adaptar os animais ao treino, resolveu-se utilizar também animais pré-treinados por três momentos antes do exercício propriamente dito. A contração observada nos grupos pré-treinados, pode ser explicada pelo fato de o exercício por si ser considerado um agente pró-contrátil. Apesar dos tempos de exercício variarem em 1, 5 e 10 dias, não ocorreu uma adaptação temporal da resposta contrátil ao treinamento, pelo contrário, a resposta máxima do tecido foi incrementando com o aumento do tempo de realização do exercício pelos animais.

Estudos acerca desse assunto ainda podem ser tidos como escassos na literatura, visto que as pesquisas em relação a alterações causadas pelo exercício

priorizam o estudo de alterações no músculo esquelético (Yaspelkis *et al.*, 2010; Bueno *et al.*, 2010).

Até 90% de asmáticos, 45% dos indivíduos com rinite alérgica, 50% dos atletas olímpicos, e 12% da população em geral têm broncoconstrição induzida pelo exercício (BIE) que é definida como um aumento transitório na resistência das vias aéreas e reflete, pelo menos, um declínio de 10% no VEF₁ após, pelo menos, 6-8 minutos de exercício extenuante (Randolph, 2010).

A BIE é uma condição aguda em que a atividade física vigorosa desencadeia obstrução aguda das vias aéreas em indivíduos asmáticos e não-asmáticos com hiperresponsividade das vias aéreas. Esta condição ocorre principalmente durante ou logo após exercícios físicos de maior intensidade (HURWITZ, ARGYROS e ROACH, 1995). No presente estudo foi evidenciado que as traquéias removidas de animais trinta minutos após a última sessão de treino apresentaram-se mais responsivas aos estímulos contráteis nos animais submetidos a um pré-treinamento.

O mecanismo preciso da BIE não está totalmente determinado, visto que grande parte dos trabalhos são realizados em atletas (ver revisão Anderson; Kippelen, 2008). De acordo com estes autores a perda de água que ocorre durante o exercício provoca resfriamento e desidratação da superfície das vias aéreas. Um dos efeitos agudos da desidratação é a liberação de mediadores, como prostaglandinas, leucotrienos e histamina, que podem estimular o músculo liso, causando a contração e a alteração na permeabilidade vascular. De fato, estudos mostraram que mediadores inflamatórios são componentes centrais na patogênese da BIE, e tem sido reconhecido que os leucotrienos e as prostaglandinas desempenham um papel importante na resposta da BIE (MICKLEBOROUGH, LINDLEY e MONTGOMERY, 2008).

Nos últimos 10 anos, a atenção centrou-se nas respostas celulares das vias aéreas, associadas à lesão destas, para explicar a broncoconstrição induzida pelo exercício. Foi visto que nadadores que treinam durante longas horas em ambientes irritantes podem também ter uma alta prevalência de BIE quando submetidos à broncoprovocação com metacolina, que age diretamente nos receptores de acetilcolina para causar a contração do músculo liso brônquico (POTTS, 1994 -

1996). Kippelen *et al.* (2005) sugerem que a BIE é freqüente em nadadores e mostram que a ativação dos mastócitos com liberação de mediadores broncoconstritores seguinte à hiperpnéia em atletas com e sem BIE. O grau de responsividade das vias aéreas para o mediador específico lançado provavelmente irá determinar se a broncoconstrição irá ou não irá ocorrer.

Trabalho recente avaliando função respiratória de ovelhas submetidas ao exercício extenuante na esteira sugere que a resposta primária das vias aéreas inferiores para o exercício extenuante é a broncoconstrição e que o sistema nervoso parassimpático (nervos colinérgicos) é o responsável, visto que as alterações nas dimensões dos brônquios foram revertidas por antagonistas dos colinoceptores (Quail *et al.*, 2007).

Baseado no fato de que a neurotransmissão colinérgica e os mediadores inflamatórios estão envolvidos na BIE resolveu-se determinar no lavado broncoalveolar de animais submetidos ao exercício e sedentários, a atividade da acetilcolinesterase (AChE) como uma maneira de prever alterações nos níveis de acetilcolina; níveis das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), para determinar a ocorrência de peroxidação lipídica; bem como nitrito, na tentativa de captar alterações nos níveis de NO, baseado no fato de que estes parâmetros interferem com a contração do músculo liso, não tendo sido avaliado ainda sua participação na BIE.

A contração do músculo liso traqueal evidenciada no presente trabalho foi acompanhada por uma queda significativa nos níveis de nitrito nos animais pré-treinados e treinados por 5 dias (PT5). O NO induz o relaxamento da musculatura lisa das vias aéreas, mas o mecanismo não é bem compreendido. Recentemente foi determinado que o mesmo parece agir através da via GMPc-PKG, predominantemente inibindo a liberação de Ca^{+2} , através do receptor do IP_3 (PEREZ-ZOGHBI, BAI e SANDERSON, 2010). Corroborando com o efeito relaxante do NO, Strapkova, Antosova e Nosalova (2008) sugeriram que as isoformas da NO-sintase, bem como a arginase estão envolvidos na produção de NO e no controle do tônus broncomotor.

Maarsingh *et al.* (2006) usando anéis da traquéia de cobaias, demonstraram que a atividade da arginase endógena atenua o relaxamento da musculatura lisa mediado pelo sistema inibitório não-adrenérgico não-colinérgico (NANC) reduzindo o óxido nítrico (NO) - devido à concorrência com a NO-sintase neuronal (nNOS) pelo substrato comum, L-arginina. Interessantemente os resultados obtidos no presente trabalho mostraram uma redução nos níveis de nitrito apenas no PT5, fato este que merece ser melhor determinado.

Os dados sobre a relação entre a BIE e óxido nítrico exalado (eNO) em pacientes adultos com asma são controversos. Não está claro se NO endógeno pode atuar tanto como um fator de proteção ou estimulatório na resposta das vias aéreas ao exercício ou se as mudanças na exalação simplesmente refletem estreitamento agudo das vias aéreas. García-Río *et al.* (2006) mostraram que o eNO diminui transitoriamente durante a BIE em pacientes adultos com asma. Portanto, os níveis de eNO podem prever a obstrução respiratória em decorrência após o exercício.

Ocorreu aumento dos níveis de TBARs nos animais pré-treinados e treinados por 1, 5 e 10 dias (PT1, PT5 e PT10). A BIE na criança com asma é associada com inflamação persistente e pobre controle da doença. A BIE pode surgir em parte pelo estresse oxidativo (EO) das vias aéreas. O exercício físico aumenta os níveis de marcadores de estresse oxidativo no plasma e ar expirado (ASHTON, ROWLANDS e JONES, 1998; SUZUK, SATO e KIUKUCHI, 1996; ALESSIO, HAGERMAN e FULKERSON, 2000; LAAKSONEN, ATALAY e NISKANEN 1999; STEENSBERG, MORROW e TOFT, 2002).

Prada *et al.* (2004), desenvolveram um protocolo com ratos treinados por natação na intensidade correspondente ao limiar anaeróbio de treinamento. Tal protocolo mostrou-se eficaz em melhorar o condicionamento aeróbio dos animais, mas não desencadeou adaptações favoráveis nas atividades das enzimas antioxidantes. Também foi determinado que a administração de proteína do soro não desnaturada aumenta a capacidade antioxidante pulmonar podendo ser terapeuticamente benéfico em indivíduos exibindo BIE (Baumann *et al.*, 2005).

Foi determinado no presente estudo uma redução da atividade da enzima AChE nos grupos experimentais pré-treinados e treinados por 1, 5 e 10 dias (PT1,

PT5 e PT10). Como resultado da inibição da atividade da acetilcolinesterase (AChE), o neurotransmissor acetilcolina é menos hidrolisada nas sinapses, levando a uma quantidade anormal de ACh, e conseqüentemente causando uma ativação excessiva de receptores colinérgicos levando à broncoconstrição.

A acetilcolina é uma amina produzida no citoplasma das terminações nervosas. Sua precursora é uma vitamina pertencente ao complexo B, a colina, que é obtida a partir da alimentação ou da própria degradação da acetilcolina por uma enzima específica (AChE), sendo então seqüestrada para o interior do neurônio a partir do líquido extracelular. Para que exerça sua função corretamente, a acetilcolina, bem como os demais neurotransmissores, deve ser removida ou inativada de acordo com as demandas de tempo para cada resposta sináptica específica pretendida. Portanto, atua nesse processo a enzima AChE, que catalisa a hidrólise da acetilcolina, liberando colina no líquido extracelular, que pode ser reaproveitada para os processos de síntese neuronais. Dessa forma, essa enzima é capaz de modular a intensidade da resposta sináptica (GOODMAN; GILMAN, 1996).

Os receptores para a acetilcolina se dividem em duas classes principais: nicotínicos (que ainda se subdividem em neuronais e musculares) e muscarínicos (que apresentam cinco subtipos). Os receptores muscarínicos encontrados no Sistema Nervoso Central e em músculos lisos controlados pela divisão parassimpática do Sistema Nervoso Autônomo promoverão ação indireta da acetilcolina, excitatória, que culmina com potenciais de ação para a contração dos músculos lisos inervados (GOODMAN; GILMAN, 1996).

A AChE responde a insultos diversos, incluindo EO. Sua atividade pode ser inibida por radicais livres, mostrando que a produção destes radicais pode, pelo menos em parte, ser associado com diminuição da atividade da AChE. Assim, alterações na membrana lipídica pelo EO pode ser um determinante fator de modificação do estado conformacional da molécula de AChE, o que explicaria as alterações na sua atividade (SCHMATZ, MAZZANTI e SPANEVELLO, 2009; SHAW e PANIGRAHI, 1990; DAS, DIKSHIT e NATH, 2001).

Neste estudo ocorreu uma relação inversa entre os níveis de TBARs e atividade da acetilcolinesterase o que corrobora com os estudos prévios relatados

anteriormente de que o estado conformacional da AChE sofre alteração com o aumento do EO.

Shibata *et al.*, (1998) demonstraram que drogas anticolinesterásicas como neostigmina e piridostigmina foram capazes de induzir a contração do músculo liso traqueal, o que mostra a importante participação da AChE no mecanismo de contração do músculo liso.

Estes resultados mostram a participação da neurotransmissão colinérgica, óxido nítrico e EO no mecanismo da BIE.

A anafilaxia é uma das desordens imunológicas mais comuns e o modelo de sensibilização seguida de broncoprovocação aqui empregado é um dos mais frequentemente utilizados no estudo do comportamento contrátil das vias aéreas frente a reações que envolvam a participação do sistema imune (CAPAZ *et al.*, 1993; STEIL/LIMA, 1998). Esse método clássico de sensibilização provoca resposta anafilática evidente tanto *in vivo* como *in vitro*, esta também conhecida como reação de Schultz-Dale (CAPAZ *et al.*, 1993). O procedimento de broncoprovocação pela repetição da exposição ao antígeno por inalação ao animal sensibilizado, corresponde a um modelo de resposta asmática precoce, sendo assim classificada em razão do desencadeamento da resposta broncoconstritora após a reapresentação ao antígeno.

O desafio antigênico no presente trabalho mostrou-se eficaz do ponto de vista do processo asmático, já que se pôde verificar uma resposta broncoconstritora marcante, pelo desconforto respiratório apresentado pelos animais, no momento da broncoprovocação. Nas traquéias isoladas desses animais desafiados com o antígeno sensibilizante, o desenvolvimento de hiperreatividade demonstra eficácia do desenvolvimento do processo asmático, evidenciando a eficácia do modelo e a reprodutibilidade do método. Ainda assim, nos estudos *in vitro* aqui apresentados, verificaram-se outros efeitos do exercício, segundo protocolo em que se estabeleceu desafio antigênico, identificando-se que: 1 - em animais sensibilizados observou-se uma curva concentração dependente semelhante ao grupo controle, em que os animais não foram submetidos a qualquer treinamento; 2 - no grupo desafiado (S/D) evidenciou-se contração concentração dependente, significativa nas altas

concentrações de CCh e K^+ , em relação aos grupos controle e sensibilizado, neste caso com significância estatística; 3 - o grupo exercitado por 5 dias antes do desafio (S/E pré-desafio) apresentou contração dos anéis isolados de traquéia de ratos significativamente maior com contrações mais intensas desencadeadas pelo CCh e K^+ .

Na nossa condição experimental, animais controle e sensibilizados podem ser considerados semelhantes quanto ao protocolo estabelecido e, portanto, fica clara a resposta contrátil semelhante desses grupos. No caso de animais sensibilizados e desafiados com OVA, já que submetidos ao estímulo antigênico, é explicada a contração apresentada em relação aos grupos aqui utilizados como controle padrão para este protocolo, os grupos controle e sensibilizado. O grupo sensibilizado com OVA, em seguida pré-treinado e treinado 1 hora por dia durante 5 dias e logo após desafiado, mostrou contração ainda mais vigorosa em relação aos animais sensibilizados, fato este ocorrido provavelmente em virtude de agora os animais estarem sendo submetidos a dois agentes pró-contráteis, isto é, OVA e exercício. O período de 5 dias foi aqui escolhido em virtude de ter sido observado na primeira parte da pesquisa, em animais saudáveis, que, estes quando submetidos a 5 dias de exercício apresentaram uma resposta contrátil frente ao CCh e potássio, acompanhada de redução nos níveis de nitrito, da atividade da AChE e aumento nos níveis de TBARs, portanto um marcante efeito pró-contrátil e também lesivo para o brônquio. A literatura relata pesquisas em que seus autores ora consideram o exercício como um agente pró- ou antiinflamatório, não ficando clara ainda a participação do exercício físico e seu papel na asma, motivo este que levou também ao desenvolvimento do presente estudo.

Além do mais, em tecido de ratos desafiados com OVA por via inalatória, a resposta contrátil da traquéia isolada de ratos a agentes contráteis clássicos, como carbacol e potássio, foi significativamente maior em relação à resposta por esses agentes produzida em traquéias de animais sensibilizados e desafiados com salina. O que também configura desenvolvimento de hiperreatividade das vias aéreas, fator preponderante em modelos que buscam simular asma. Tal análise também se comprovou nos trabalhos de Bastos (2009).

Nos animais submetidos ao modelo de asma, evidenciou-se queda nos valores de nitrito tanto dos animais desafiados como nos submetidos ao exercício prévio ao desafio. Conforme mencionado anteriormente a queda dos níveis de nitrito expressa redução dos níveis de NO que por sua vez está relacionado ao mecanismo de contração/relaxamento das vias aéreas.

O papel do NO na asma ainda é controverso, visto que foram encontrados níveis elevados de eNO em grupos atópicos comparados aos não atópicos. Estes níveis, entretanto, são mais elevados em pacientes com asma, sugerindo que o eNO não é simplesmente um marcador de atopia. Apesar de existirem poucas evidências para apoiar o uso rotineiro de medição do eNO no tratamento de doentes com asma (PAYNE, 2003).

Os animais desafiados e os treinados antes do desafio, também apresentaram aumento nos níveis de TBARs. A asma por ser uma doença inflamatória está relacionada a uma ativação de células imunes com geração de EO. A atividade muscular exigida durante exercícios físicos, por sua vez, normalmente faz com que os tecidos envolvidos recebam maior aporte de oxigênio. Uma pequena parcela desse oxigênio, contudo, não fará parte dos ciclos energéticos das células, e será desviada para a produção de radicais livres. A produção de radicais livres durante exercícios está associada a auto-oxidação de catecolamidas, aumento do metabolismo de enzimas como NADPH oxidase e xantina oxidase, metabolismo aumentando de prostanóides, distúrbio de íons de cálcio e danos a proteínas que contenham ferro. O EO, nesses casos, contribui para a diminuição do desempenho físico, da fadiga muscular, síndrome do sub-treinamento e danos às fibras musculares (GUTTERIDGE *et al.*, 1985).

Estudo mostra que a broncoconstrição induzida por exercício é mais provável de se desenvolver em crianças e adolescentes asmáticos que apresentam concentrações elevadas de estresse oxidativo antes do exercício. Segundo este autor, a maior probabilidade do desenvolvimento de broncoconstrição induzida por exercício, nestes pacientes, sugere uma associação importante entre EO e hiperatividade brônquica (CABALLERO *et al.*, 2010).

No protocolo experimental usado também foi determinado uma redução da atividade da AChE nos grupos desafiado e pré-treinado antes do desafio. Conforme discutido anteriormente, pesquisas mostram que a atividade da AChE é vulnerável à ação de substâncias oxidantes, o que possivelmente determinou a queda dos níveis desta enzima, onde foi observado uma relação inversa entre a atividade da AChE e níveis de TBARS.

Estes resultados mostram a participação da neurotransmissão colinérgica, óxido nítrico e EO no mecanismo da asma induzida pelo exercício.

VII - CONCLUSÃO



7 CONCLUSÃO

O exercício leve a curto prazo causou efeito pró-contrátil sobre a musculatura lisa traqueal, tanto em circunstâncias fisiológicas quanto no modelo de asma. Este efeito parece estar relacionado a alterações nos níveis de nitrito, TBARs e acetilcolinesterase, demonstrando a participação do óxido nítrico, peroxidação lipídica e acetilcolina neste processo.

VIII-REFERÊNCIAS



Referências

ALESSIO, H.; HAGERMAN, A.E.; FULKERSON, B.K.; AMBROSE, J.; RICE, R. E.; WILEY, R. L. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 32, p. 1576–1581, 2000.

ALEXANDRE, J.; FARAKOS K.; KOUTSOUMBAS, G. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? Department of Physics, National Technical University of Athens, Zografou Campus, 157 80 Athens, Greece. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 72, p. 637-647, 2000.

ANDERSON, S.D.; KIPPELEN, P. Airway injury as a mechanism for exercise-induced bronchoconstriction in elite athletes. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 122, n. 2, p. 225-235, 2008.

ANDREADIS, A.A.; HAZEN, S.L.; COMHAIR, S.A.A.; ERZURUM, S.C.; Oxidative and nitrosative events in asthma. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 35, n. 3, p. 213–225, 2003.

ASHTON, T.; ROWLANDS, C. C.; JONES, E., *et al.* Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-controlled radicals in human serum following exhaustive exercise. **Eur. J. Appl. Physiol.**, v. 77, p. 498–502, 1998.

BASTOS, P. **Os benefícios do exercício físico.** Lisboa, 2010.

BASTOS, V. P. D. **Ação Broncodilatadora e Anti-inflamatória do 1,8-cineol em modelo experimental de asma em cobaias.** 2009. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

BAUMANN, J. M.; RUNDELL, K.W.; EVANS, T.M.; LEVINE, A.M. Effects of cysteine donor supplementation on exercise-induced bronchoconstriction. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 37, n. 9, p.1468-1473, Sept. 2005.

BRAMAN, S.S.; HANANIA, N.A. Asthma in older adults. **Clin. Chest Med.**, v. 28, n. 4, p. 685-702, Dec. 2007.

BUENO Jr, C.R.; FERREIRA, J.C.; PEREIRA, M.G.; BACURAU, A.V.; BRUM, P.C. Aerobic exercise training improves skeletal muscle function and Ca⁺² handling related proteins expression in sympathetic hyperactivity-induced heart failure. **J. Appl. Physiol.**, July 2010. doi:10.1152/jappphysiol.00281.2010.

BUSSE, W.W.; LEMANSKE, R.F. Asthma. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, p. 350-362, 2001.

CABALLERO, B.S.; MARTORELL, A.A.; CERDÁ, M.J.C.; RAMÍREZ, J.B.; NAVARRO, I.R.; NAVARRO, S.A.; FÉLIX, T.R.; ESCRIBANO, M.A. Leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with episodic and

persistent asthma. **J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.**, v. 20, n. 3, p. 237-243, 2010.

CAMPOS, H.S. Asthma: its origins, inflammatory mechanisms and the role of the corticosteroid. **Rev. Bras. Pneumol. Sanit.**, 2006.

CAPAZ, F. R.; RUFFIÉ, C.; LEFORT, J.; MANZINI, S.; VARGOFTIG, B. B.; PRERTOLAI, M. Effect of activite sensibilization on the bronchopulmonary to tachykinins in the guinea pig. Modulation by peptidase inhibitors. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v. 266, n. 2, p. 812-819, 1993.

COOKSON, W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. **Nature**, v. 402, n. 6760, Suppl., p. B5-11, 1999.

CORRÊA, M.F.P.; MELO, G.O.; COSTA, S.S. SOUTO, D. Caracterização das fases imediata e tardia da resposta inflamatória de tecido pulmonar periférico de cobaias sensibilizados. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.18, suppl., Dec. 2008.

CORTIJO, J.; CERDÁ-NICOLÁS, M.; SERRANO-MOLLAR, A.; BIOQUE, G.; ESTRELAZ, J.M.; SANTANGELO, F.; ESTERAS, A.; LLOMBART-BOSCH, A.; MORCILLO, E.J. Attenuation by oral N-acetylcysteine of bleomycin-induced lung injury in rats. **Eur. Respir. J.**, v. 17, p. 1228-1235. 2001.

CRIMI, E.; MILANES, M.; PINGFANG, S.; BRUSASCO, V. Allergic inflammation and airway smooth muscle function. **Sci. Total Environ.**, v. 270, n. 1/3, p. 57-61, 2001.

DAS, A.; DIKSHIT, M.; NATH, C. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. **Life Sci.**, v. 68, n. 13, p. 1545– 1555, 2001.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186, p.421-431, 1990.

ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 82, p. 70-77, 1961.

FAGUNDES, D.J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cir. Bras.**, v.19, n.1, Jan./Fev. 2004.

GARCÍA-RÍO, F.; RAMÍREZ, M.; MEDIANO, O.; LORES, V.; ROJO, B.; VILLASANTE, C.; VILLAMOR, J. Exhaled nitric oxide and airway caliber during exercise-induced bronchoconstriction. **Int. J. Sports Med.**, v. 27, n. 11, p. 905-910, Nov. 2006.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996.

GREEN, L.C.; TANNENBAUM, S.R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, p.56-58, 1981.

GUTTERIDGE, J.M.C.; ROWLE, Y.D.A; HALLIWELL, B.; COOPER, D.F.; HEELEY, D.M. Cooper and iron complexes catalytic for oxygen radical reactions in sweat from human athletes. **Clin. Chim. Acta.**, v. 145, p. 267-273, 1985.

GUYTON, A.C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HURWITZ, K.M.; ARGYROS, G.J.; ROACH, J.M.; ELIASSON, A. H.; PHILLIPS, Y. Y. Interpretation of eucapnic voluntary hyperventilation in the diagnosis of asthma. **Chest**, v. 108, n. 5, p. 1240-1245, 1995.

JUCÁ, D. M. **Propriedades Farmacológicas dos Monoterpenos alfa- e beta-pineno no Músculo Liso GastrintestinaL de Ratos: Efeito Miorrelaxante e Pró-Cinético**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Fortaleza, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

KIPPELEN, P.; CAILLAUD, C.; ROBERT, E.; CONNES, P.; GODARD, P.; PREFAUT, C. Effect of endurance training on lung function: a one year study. **Br. J. Sports Med.**, v. 39, p. 617, 2005.

KUMAR, R.K. Understanding airway wall remodeling in asthma: a basis for improvements in therapy. **Pharmacol. Ther.**, v. 91, p. 93-104, 2001.

LAAKSONEN, D.E.; ATALAY, M.; NISKANEN, L.; UUSITUPA, M.; HÄNNINEN, O.; SEN, C. K. Blood glutathione homeostasis as a determinant of resting and exercise-induced oxidative stress in young men. **Redox Rep.**, v. 4, n. 1/2, p. 53–59, 1999.

LAITANO, O.; MEYER, F. Asma induzida pelo exercício: aspectos atuais e recomendações. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v. 13, n. 1, jan./fev. 2007.

LOUIS, R.; LAU, L.C.; BRON, A.O.; ROLDAAN, A.C.; RADERNECKER, M.; DJUKONOVIC, R. The relationship between airways inflammation and asthma severity. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 161, p. 9-16, 2000.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with foun phenol reagent. **Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-271, 1951.

MAARSINGH, H.; LEUSINK, J.; BOS, I. S.; ZAAGSMA, J.; MEURS, H. Arginase strongly impairs neuronal nitric oxide-mediated airway smooth muscle relaxation in allergic asthma. **Respir. Res.**, v. 7, p. 6, Jan. 2006.

MICKLEBOROUGH, T.D.; LINDLEY, M.R.; MONTGOMERY, G.S. Effect of fish oil-derived omega-3 polyunsaturated Fatty Acid supplementation on exercise-induced bronchoconstriction and immune function in athletes. **Phys. Sportsmed.**, v. 36, n. 1, p. 11-17, Dec. 2008.

MOREIRA, A. L.; SOARES, S.; LOURENÇO, A. **Fisiologia pulmonar**. Porto: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 2003.

MOURA, C.T.M. **Participação dos canais de cálcio na hiperreatividade induzida por ovalbumina em traqueias isoladas de ratos**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

NISHIDA, K.; NAKAI, A.; YAMAGUCHI, O.; TAKEDA, T.; Higuchi, Y.; Shungo HIKOSO, S.; TANIKE, M.; OMIYA, S.; MIZOTE, I.; MATSUMURA, Y.; ASAH, M.; HORI, M.; MIZUSHIMA, N.; Otsu, K. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. **Nat. Med.**, v. 13, p. 619 – 624, 2007.

PAYNE, D.N. Nitric oxide in allergic airway inflammation. **Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.**, v. 3, n. 2, p. 133-137, Apr. 2003.

PEREZ-ZOGHBI, J. F.; BAI, Y.; SANDERSON, M. J. Nitric oxide induces airway smooth muscle cell relaxation by decreasing the frequency of agonist-induced Ca²⁺ oscillations. **J. Gen. Physiol.**, v. 135, n. 3, p. 247-259, Mar. 2010.

PORTO, F.A. **O produto atividade física**. Brasília: UCB – DF, 2004.

POTTS, J. **Adverse respiratory health effects of competitive swimming**: the prevalence of symptoms, illnesses and bronchial responsiveness to methacholine and exercise. (MD thesis) - University of British Columbia, Vancouver, 1994.

POTTS, J. Factors associated with respiratory problems in swimmers. **Sports Med.**, v. 21, n. 4, p. 256–261, 1996.

PRADA, F. J. A.; MACEDO, D. V.; MELLO, M. A. R. Indicadores metabólicos e estresse oxidativo em ratos submetidos ao treinamento por corrida em esteira rolante em velocidade equivalente à máxima fase estável de lactato. **R. Bras. Ci. Mov.**, Brasília, n. esp., p. 240-240, 2003.

PROUSKY, J. The treatment of pulmonary diseases and respiratory-related conditions with inhaled (nebulized or aerosolized) glutathione. **eCAM**, v. 5, n. 1, p. 27-35, Mar. 2008.

QUAIL, S.; MCILVEENA, R.; BISHOP, D.; MCLEOD, R.; GUNTHERC, J.; DAVIS, L.; TALKENC, D.; COTTEE, G.; PARSONSD, S. White. Autonomic control of bronchial blood flow and airway dimensions during strenuous exercise in sheep. **Pulm. Pharmacol. Ther.**, v. 20, n. 2, p. 190–199, 2007.

RANDOLPH, C. The challenge of asthma in adolescent athletes: exercise induced bronchoconstriction (EIB) with and without known asthma. **Adolesc. Med. State Art Rev.**, v. 21, n. 1, p. 44-56, Apr. 2010.

ROGATTO, G.P. **Perfil metabólico durante o exercício físico**: influência da intensidade e da duração do esforço sobre a utilização de substratos energéticos. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2002.

SANTOS, R.S.; GUEDES, M.H. Antioxidantes na terapia nutricional da asma. **Rev. Bras. Nutr. Clin.**, v. 2, n. 12, p. 21-33, 2009.

SARTORELLI, C.F.; REHDER, J.; NETO, A. C.; VILELA, M.M. Avaliação da inflamação com base na liberação de radicais oxidantes por granulócitos na asma crônica não-controlada. **J. Pediatr.**, v. 85, n. 2, p. 19-24, mar./abr. 2009.

SCHMATZ, R.; MAZZANTI, C.M.; SPANEVELLO, R.; STEFANELLO, N.; GUTIERRES, J.; Corrêa, M.; ROSA, M.M.; RUBIN, M.A.; SCHETINGER, M.C.R.; MORSCH, V.M. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats, **Eur. J. Pharmacol.**, v. 610, p. 42–48, 2009.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, de A.R. Radicais livres e oxigênio: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v. 10, n. 4, p. 78-86, Niterói, jul./aug. 2004.

SEOW, C. Y.; FREDBERG, J. J. Historical perspective on airway smooth muscle: the saga of frustrated cell. **J. Appl. Physiol.**, v. 92, p. 938-952, 2001.

SHAW, B.P.; PANIGRAHI, A.K. Brain AChE activity studies in some fish species collected from a mercury contaminated estuary. **Water Air Soil Pollut.**, v. 53, p. 327–334, 1990.

SHIBATA, O.; TSUDA, A.; MAKITA, T.; IWANAGA, S.; HARA, T.; SHIBATA, S.; SUMIKAWA, K. Contractile and phosphatidylinositol responses of rat trachea to anticholinesterase drugs. **Can. J. Anaesth.**, v. 45, n. 12, p. 1190-1195, 1998.

SILVA, E. C. **Avaliação do estresse oxidativo em adolescentes com asma e rinite**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2008.

STEIL, A. A.; DE Lima, W. T.; Jancar. Modulation by lipid mediators of immune complex- induced lung inflammation in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 361, n. 1, p. 93-98, 1998.

STEPHENS, N. L.; LI, W.; WANG, Y.; MA, Y. The contractile apparatus of airways smooth muscle. Biophysics and biochemistry. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 158, p. 80-94, 1998.

STEENSBERG, A.; MORROW, J.; TOFT, A. D.; BRUUNSGAARD, H.; PEDERSEN, B. K. Prolonged exercise, lymphocyte apoptosis and F2-isoprostanes. **Eur. J. Appl. Physiol.**, v. 87, n. 1, p. 38–42, 2002.

STRAPKOVA, A.; ANTOSOVA, M.; NOSALOVA G. Effect of NO-synthase and arginase inhibition in airway hyperreactivity. **Bratisl. Lek. Listy.**, v. 109, n. 5, p. 191-197, 2008.

SUZUKI, K.; SATO, H.; KIUKUCHI, T.; ABE, T.; NAKAJI, S.; SUGAWARA, K.; TOTSUKA, M.; SATO, K.; YAMAYA, K. Capacity of circulating neutrophils to produce

reactive oxygen species after exhaustive exercise. **J. Appl. Physiol.**, v. 81, n. 3, p. 1213–1222, 1996.

TELLES FILHO, P.A. **Asma brônquica**. São Paulo, 2010.

VANCINI, R.L.; LIRA, C.A.B.; ABOULAFIA, J.; NOUAILHETAS, V. L. A. **Radical livre, estresse oxidativo e exercício**. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 2005.

YASPELKIS, I.B.B.; KVASHA, I.A.; LESSARD, S.J.; RIVAS, D.A.; HAWLEY, J.A. Aerobic training reverses high-fat diet-induced pro-inflammatory signalling in rat skeletal muscle. **Eur. J. Appl. Physiol.**, July 2010. *in press*. DOI: 10.1007/s00421-010-1559-7.