

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

LUCIANA DIAS BELCHIOR

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES DO EXERCÍCIO FÍSICO A
CURTO PRAZO SOBRE A CONTRATILIDADE DO
MÚSCULO LISO TRAQUEAL DE RATOS SENSIBILIZADOS
OU NÃO COM OVALBUMINA**

FORTALEZA
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LUCIANA DIAS BELCHIOR

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES DO EXERCÍCIO FÍSICO A
CURTO PRAZO SOBRE A CONTRATILIDADE DO
MÚSCULO LISO TRAQUEAL DE RATOS SENSIBILIZADOS
OU NÃO COM OVALBUMINA**

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso 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

LUCIANA DIAS BELCHIOR

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES DO EXERCÍCIO FÍSICO A
CURTO PRAZO SOBRE A CONTRATILIDADE DO
MÚSCULO LISO TRAQUEAL DE RATOS SENSIBILIZADOS
OU NÃO COM OVALBUMINA**

**Dissertação submetida à
Coordenação do Curso 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

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

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

Dedicatória

*A 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.
À grande semeadora, Profa. Dra. Danielle Silveira Macêdo, meu tripé...
...com todo o meu carinho.*

"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)

SUMARIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE QUADROS	12
LISTA DE ABREVIATURAS	13
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1 Introdução	17
1.1 Anatomofisiologia das Vias Aéreas	17
1.2 Músculo Liso das Vias Aéreas	18
1.3 Exercício Físico	20
1.4 O Processo Asmático	24
1.4.1 Definição e Desenvolvimento	24
1.4.2 Base Inflamatória da Asma	25
1.5 Hiperreatividade Brônquica	28
1.6 Inflamação, Estresse Oxidativo e Asma	29
1.7 Asma Induzida pelo Exercício	32
1.8 Modelos Animais de Asma	39
2 Relevância e Justificativa	43
3 OBJETIVOS	46
4 METODOLOGIA	48
4.1 Materiais Utilizados nos Experimentos	48
4.2 Animais	49
4.3 Procedimento Experimental	49
4.3.1 Animais submetidos ao protocolo de exercícios a curto prazo	49
4.3.2 Sensibilização Antigênica dos Animais	49
4.3.3 Protocolo de exercícios para os animais sensibilizados e desafiados com OVA	50
4.3.4 Experimentos com Traquéias Isoladas	53
4.4 Protocolos Experimentais para a Avaliação da Contratilidade Traqueal	54
4.4.1 Obtenção das Curvas Concentração-Efeito	54
4.4.2 Efeitos do Carbacol na Musculatura Lisa Isolada da Traquéia de Ratos Asmáticos ou Não-asmáticos Sedentários ou Submetidos aos Diferentes Tempos de Exercício	54
4.4.3 Efeitos do Potássio na Musculatura Lisa Isolada da Traquéia de Ratos Asmáticos ou Não-asmáticos Sedentários ou Submetidos aos Diferentes Tempos de Exercício	55
4.5 Isolamento do Lavado Broncoalveolar (LBA)	55
4.5.1 Avaliação da Peroxidação Lipídica no Lavado Broncoalveolar (DRAPER et al., 1990).	55
4.5.2 Determinação da Atividade da Enzima Acetilcolinesterase	56
4.5.2.1 Método	56
4.5.2.2 Procedimento Experimental	56
4.5.2.3 Soluções Reagentes	57

4.5.3	Dosagem de Nitrito (Green et al., 1981).....	57
4.5.3.1	Método.....	57
4.5.3.2	Procedimento Experimental.....	57
4.5.3.3	Soluções Reagentes:.....	58
4.5.4	Dosagem de Proteína (Método Lowry):	58
4.5.4.1	Método.....	58
4.5.4.2	Soluções reagentes.....	59
4.6	Análise Estatística	59
5	Resultados	61
5.1	Análise da Resposta do K⁺ em Traquéias Isoladas de Ratos.....	61
5.2	Efeito do Carbacol em Traquéias Isoladas de Ratos.....	61
5.3	Efeitos do Potássio em Traquéias Isoladas de Ratos.....	67
5.4	Análise das Alterações do Exercício nas Curvas Concentração-efeito do Carbacol em Traquéias Isoladas de Ratos Sensibilizados e/ou Desafiados ao Antígeno Sensibilizante.....	72
5.5	Análise das Alterações do Exercício nas Curvas Concentração-efeito do Potássio em Traquéias Isoladas de Ratos Sensibilizados e/ou Desafiados ao Antígeno Sensibilizante.....	75
5.6	Análise dos Efeitos do Nitrito em Lavado Broncoalveolar de Ratos submetidos ou não a Treinamento	78
5.7	Análise dos Efeitos do Nitrito em Lavado Broncoalveolar de Ratos Sensibilizados e/ou Desafiados com OVA e submetidos ou não a Treinamento.....	79
5.8	Análise dos Efeitos da Peroxidação Lipídica (TBARS) em Lavado Broncoalveolar de Ratos submetidos ou não a Treinamento	80
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 ...	81
5.10	Análise dos Efeitos da Enzima Acetilcolinesterase (AChE) em Lavado Broncoalveolar de Ratos Submetidos ou não a Exercícios	82
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.....	83
6	Discussão.....	86
7	Considerações finais	97
8	Conclusão	100
	Referências	102

LISTA DE FIGURAS

Figure 1.1 Participação dos sistemas energéticos durante exercício máximo em diferentes durações (Fonte: McArdle et al, 1992).....	22
Figure 1.2 Representação clássica da resposta imunológica ao estímulo irritante ou antígeno na fase imediata da asma.	28
Figure 4.1. Sistema de cubas isoladas e captação dos dados (Fonte: Figura adaptada de Jucá, 2007, p. 33).....	53
Figure 5.1 Análise do tecido muscular liso traqueal isolado de ratos em curva concentração-efeito induzida pelo CCh do grupo treinado 1 hora em relação ao grupo sedentário.....	62
Figure 5.2 Análise do tecido muscular liso traqueal isolado de ratos em curva concentração-efeito induzida pelo CCh do grupo PT 1 em relação ao grupo sedentário.	63
Figure 5.3 Análise do tecido muscular liso traqueal isolado de ratos em curva concentração-efeito induzida pelo CCh do grupo PT 5 em relação ao grupo sedentário.	64
Figure 5.4 Análise do tecido muscular liso traqueal isolado de ratos em curva concentração-efeito induzida pelo CCh do grupo PT 10 em relação ao grupo sedentário.	65
Figure 5.5 Análise do tecido muscular liso traqueal isolado de ratos em curva concentração-efeito induzida pelo K^+ do grupo treinado 1 hora em relação ao grupo sedentário.....	67
Figure 5.6 Análise do tecido muscular liso traqueal isolado de ratos em curva concentração-efeito induzida pelo K^+ do grupo PT 1 em relação ao grupo sedentário.	68
Figure 5.7 Análise do tecido muscular liso traqueal isolado de ratos em curva concentração-efeito induzida pelo K^+ do grupo PT 5 em relação ao grupo sedentário.	69
Figure 5.8 Análise do tecido muscular liso traqueal isolado de ratos em curva concentração-efeito induzida pelo K^+ do grupo PT 10 em relação ao grupo sedentário.	70
Figure 5.9 Análise do tecido muscular liso em curva concentração-efeito induzida pelo CCh em traquéias isoladas de ratos sensibilizados e/ou desafiados com OVA ou solução salina.	73
Figure 5.10 Análise do tecido muscular liso em curva concentração-efeito induzida pelo CCh do grupo S/E pré-desafio em relação aos grupos naive e S/D.	74
Figure 5.11 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.....	76
Figure 5.12 Análise do tecido muscular liso em curva concentração-efeito induzida pelo K^+ do grupo S/E pré-desafio em relação aos grupos naive e S/D.....	77
Figure 5.13 Análise comparativa dos valores de nitrito em lavado broncoalveolar de ratos, submetidos ou não a treinamento (valores expressos em μM).	79

Figure 5.14 Análise comparativa dos valores de nitrito em lavado broncoalveolar de ratos <i>naive</i> e do grupo sensibilizado e/ou desafiado com OVA ou solução salina, treinados ou não (valores expressos em μM).	80
Figure 5.15 Análise comparativa dos valores da peroxidação lipídica em lavado broncoalveolar de ratos, submetidos ou não a treinamento (valores expressos em absorbância).	81
Figure 5.16 Análise comparativa dos valores da peroxidação lipídica em lavado broncoalveolar de ratos <i>naive</i> e do grupo sensibilizado e/ou desafiado com OVA ou solução salina, treinados ou não (valores expressos em absorbância).	82
Figure 5.17 Análise comparativa dos valores da acetilcolinesterase em lavado broncoalvelar de ratos submetidos ou não a treinamento (valores expressos em nmoles/mg de proteína/min.	83
Figure 5.18 Análise comparativa dos valores da acetilcolinesterase em lavado broncoalveolar de ratos <i>naive</i> e do grupo sensibilizado e/ou desafiado com OVA ou solução salina, treinados ou na (valores expressos em nmoles/mg de proteína/min).....	84

LISTA DE TABELAS

Table 5.1 Potência (pD_2) e valores de E_{max} no efeito pró-contrátil induzido por CCh em traquéia de ratos sedentários ou não.	66
Table 5.2 Potência (pD_2) e valores de E_{max} do efeito pró-contrátil induzido por K^+ em traquéia de ratos sedentários ou não.	71
Table 5.3 Potência (pD_2) e valores de E_{max} das curvas concentração-efeito induzidas por carbacol em traquéias obtidas de ratos sensibilizados com salina ou OVA e/ou desafiados com salina ou OVA, submetidos ou não a treinamento.....	75
Table 5.4 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.....	78

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1 -	Principais materiais utilizados nos experimentos.....	48
Quadro 4.2 -	Resumo dos grupos experimentais.....	52

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 desoxirribonucleico
DTNB	- Ácido ditiobisnitrobenzóico
EO	- Estresse oxidativo
EPM	- Erro padrão da média
ERO	- Espécies reativas do oxigênio
GMPC	- Guanosina 3',5'-monofosfato cíclico
GSH	- Glutationa reduzida
GSH-Px	- Glutationa peroxidase
GSH-Rd	- Glutationa reduzida
H⁺	- Íons hidrogênio
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
PT 1	- Pré-treindo 1 hora
PT 5	- Pré-treinado 5 horas
PT 10	- 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

RESUMO

Estudo das alterações do exercício físico a curto prazo sobre a contratilidade do músculo liso traqueal de ratos sensibilizados ou não com ovalbumina. 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.

O exercício físico é uma atividade multifatorial que afeta órgãos e tecidos. Modelos animais fornecem condições para o estudo de mecanismos envolvidos nas adaptações ao exercício. 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 h (PT1, PT5 e PT10, respectivamente), bem como de animais sensibilizados com OVA, submetidos ao exercício por 5 h 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 (250-300g) foram submetidos a diferentes protocolos de nado, por 1, 5 e 10 h, 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 15 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 nos grupos PT5 e PT10, ambos em relação ao grupo PT1. A resposta máxima apresentou valores significativos nos grupos PT1 ($107,62 \pm 3,57$), PT 5 ($116,35 \pm 0,54$) 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 ($105,19 \pm 1,12$), PT 5 ($112,02 \pm 1,44$) 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 *naive* ($82,69 \pm 5,90$) 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 *naive* ($93,11 \pm 3,58$). 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 reativa 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 1 h. 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 *naive*. A atividade da AChE apresentou redução significativa nos grupos PT1, PT5 e PT10 em relação aos grupos sedentário e treinado 1 hora. 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 em animais asmáticos e não-asmáticos; provavelmente com a participação do óxido nítrico, acetilcolina e peroxidação lipídica neste mecanismo pró-contrátil.

Palavras-chave: traquéia, exercício, asma.

ABSTRACT

Study of the changes of short-term exercise on tracheal smooth muscle contraction of ovalbumin-induced asthmatic and nonasthmatic rats. LUCIANA DIAS BELCHIOR. Supervisor: Profa. Dra. Danielle Silveira Macêdo. Master Dissertation. Program of Post-graduation in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, UFC, 2010.

Exercise is a multifactorial activity that affects organs and tissues. Animal models provide conditions for the study of the mechanisms involved in adaptations to exercise. 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 10 h (PT1, PT5 and PT10, respectively), as well as, animals sensitized with OVA, submitted to exercise for 5 h 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 (250-300g) were subjected to different protocols of swimming, by 1, 5 and 10 h, in addition to one group that was subjected to sensitization with OVA and 21 days later, challenged at intervals of 15 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 h 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 carbachol 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 significant in the groups PT1 (107.62 ± 3.57), PT5 (116.35 ± 0.54) and PT10 (123.50 ± 2.59) compared to the sedentary group (82.70 ± 5.90), when carbachol was used as the contractile stimulus. A similar situation occurred in the groups PT1 (105.19 ± 1.12), PT5 (112.02 ± 1.44) and PT10 (119.56 ± 0.95) as compared to the sedentary group (90.45 ± 2.22), for potassium and S/D (100.74 ± 4.79) and S/E pre-challenge groups (109.09 ± 3.68) as compared to the naive group (82.69 ± 5.90) for carbachol, as well as, S/D (105.50 ± 2.37) and S/E pre-challenge (115.05 ± 1.96) groups when compared to the naive one for potassium (93.11 ± 3.58). To verify the involvement of nitric oxide, acetylcholine, and oxidative stress in 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 1 h 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 naive 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 in asthmatic and non-asthmatics animals, probably with the participation of nitric oxide, acetylcholine, and lipid peroxidation in this pro- contractile mechanism.

Keywords: trachea, exercise, asthma.

I-INTRODUÇÃO



1 Introdução

1.1 Anatomofisiologia das Vias Aéreas

Podemos classificar as vias aéreas quanto a sua localização em superiores e inferiores. As primeiras se iniciam nas fossas nasais prolongando-se até a laringe e porção superior da traquéia. As vias aéreas inferiores compreendem as porções inferiores da traquéia e suas ramificações, brônquios e bronquíolos, indo até os alvéolos.

A traquéia inicia-se logo abaixo da laringe, possuindo, entre outras funções, aquela de tubo condutor de ar aos pulmões. Este tubo apresenta duas porções: uma cervical e outra torácica, apresentando como característica um número variável de anéis (16 a 20) ou semi-anéis cartilagosos sobrepostos e em forma de C, ligados pela membrana cricotraqueal. A região posterior da traquéia caracteriza-se por ser formada em sua maioria por músculo liso, o músculo liso traqueal, que tensiona as bordas da cartilagem e evita que elas se separem, uma vez que os semi-anéis cartilagosos não se fecham nesta região. Isso promove certa motilidade da porção posterior. A membrana cricotraqueal reveste externamente toda a traquéia e vai unindo os anéis até a carina, local onde a traquéia se divide em brônquio principal direito e esquerdo (Stephens, 1998, 2002).

As vias aéreas vão assim se subdividindo em vários ramos, tornando-se cada vez mais curtas, com diâmetro menor e mais numerosas à medida que penetram no pulmão. A traquéia é denominada de via respiratória de primeira geração, e os brônquios principais direito e esquerdo de segunda geração e assim por diante, nas 20 a 25 gerações seguintes até que o sistema tubular das vias aéreas alcance os alvéolos (Seow, 2001).

Os tecidos traqueal e bronquiolar são formados por quatro camadas (do meio interno para o externo): submucosa, muscular com peças cartilagosas e adventícia. Existem ainda três tipos comuns de células no epitélio traqueobrônquico: ciliadas, caliciformes e basais (Ross et al., 1993). As células ciliadas são encontradas em todo trato respiratório até os bronquíolos respiratórios e promovem o batimento ciliar, que visa eliminar a secreção e materiais estranhos à árvore brônquica. As células caliciformes estão localizadas entre as células ciliadas e têm a função de produzir muco, que vem a se somar com aquele produzido por glândulas submucosas das vias de

condução. Por fim, as células basais que funcionam como fonte de novas células, estando localizadas sobre a lâmina basal (Roger, 1992).

Toda a árvore respiratória se mantém úmida pela presença de uma camada de muco que reveste toda a superfície epitelial. O muco é produzido e secretado pelas células caliciformes isoladas, presentes no epitélio das vias aéreas, e por glândulas submucosas. Este muco é removido pelo epitélio ciliado presente nas fossas nasais e nas vias aéreas inferiores até a zona de condução. A traquéia é revestida por uma camada mucosa especial chamada mucosa respiratória que possui epitélio estratificado ciliado (Seow, 1998).

A cada ramificação, os brônquios vão perdendo gradativamente componentes de sua parede, com isso se observa a ausência de cartilagem e de glândulas submucosas nos bronquíolos da zona de condução. Nestes bronquíolos o epitélio e a musculatura são os principais constituintes. Já os bronquíolos respiratórios pertencentes à zona de respiração são formados por epitélio cilíndrico e cúbico. Nas porções de traquéia e brônquios não ocupados por lâminas de cartilagem, as paredes são predominantemente formadas por músculo liso, com exceção dos bronquíolos respiratórios que apresentam apenas algumas fibras musculares lisas. O saco alveolar, estrutura formada por um conjunto de alvéolos, localiza-se na extremidade distal das vias aéreas da zona respiratória e é responsável pelas trocas gasosas, sendo suas paredes extremamente delgadas e compostas por três tipos de células: pneumócitos tipo I, pneumócitos tipo II e células em escova (Morrison et al., 1991).

1.2 Músculo Liso das Vias Aéreas

O comportamento anormal do músculo liso, constituinte na maioria dos sistemas fisiológicos está relacionado a uma série de patologias, incluindo hipertensão, aterosclerose e asma. Assim sendo, há grande dedicação de pesquisadores em elucidar as características biofísicas e bioquímicas do músculo liso das vias aéreas visando uma melhor compreensão de como ocorrem as alterações na asma (Stephens, 2002; Webb, 2003).

A estrutura das células musculares lisas e sua organização diferem em cada órgão quanto às suas dimensões, feixes, camadas, respostas aos estímulos contráteis, características de inervação e função. O músculo liso pode ser classificado geralmente de duas formas, multiunitário e unitário, sendo esta última a classificação dada ao músculo das vias aéreas humanas. O músculo liso unitário se caracteriza pela presença

de uma massa única que se contrai como um sincício funcional, isto é, como uma só unidade. As fibras musculares lisas, em geral, apresentam-se agregadas em camadas ou feixes, estando aderidas por suas membranas celulares que contêm múltiplos pontos de adesão, estes pontos conferem a capacidade de transmitir a força contrátil de uma célula à seguinte. As membranas são acopladas por junções abertas (comunicantes), pelas quais pode ocorrer a livre passagem de íons, de modo que os potenciais de ação ou mesmo o fluxo iônico possa passar por fibras adjacentes. Devido à presença destas interconexões podemos definir o músculo liso unitário como sincicial, ou músculo liso visceral, por ser também encontrado na maior parte das vísceras do organismo (Stephens et al., 1993; Crimi et al., 2001; Stephens et al., 2003).

O músculo liso pode ser estimulado a contrair-se por múltiplos sinais, como a estimulação nervosa, hormonal, estiramento de fibras ou alterações do ambiente químico (Knot et al., 1996; Guyton, 2002). Nas vias aéreas, os nervos parassimpáticos são o principal sistema para o controle motor, mediando a broncoconstrição (Barnes, 1986; Pendry et al., 1993). Entretanto, no que diz respeito ao controle exercido pelo sistema nervoso simpático, existem esclarecimentos a serem ainda elucidados, embora não haja dúvida de que os receptores β -adrenérgicos estejam presentes nas vias aéreas e que seus agonistas sejam broncodilatadores potentes (Stephens, 2002).

O papel importante dos neurônios sensoriais aferentes não mielinizados (fibras C), na regulação das funções das vias aéreas tem sido grandemente observado em várias espécies, sobretudo a humana. A ativação desses neurônios por vários tipos de alérgenos pode resultar na broncoconstrição reflexa por mecanismo colinérgico mediado centralmente (Colridge & Coleridge, 1984; Anderson & Ficher, 1993).

O dano ao epitélio das vias aéreas afeta a responsividade destas. Assim, o epitélio atua como uma barreira fisiológica para a difusão, e, logo que se dá tal dano, alérgenos atingem com mais facilidade a célula muscular lisa. Também a camada epitelial possui função metabólica; acetilcolina, histamina e neuropeptídeos podem ser sintetizadas e/ou metabolizadas pelas células epiteliais, de forma que uma disfunção da camada epitelial pode resultar no aumento da concentração de vários agentes contráteis. E, finalmente, o epitélio das vias aéreas possui função secretora, sintetizando muco, citocinas e quimiocinas e liberando fatores relaxantes, como a prostaglandina E_1 e E_2 e o NO (óxido nítrico) (Boushey et al., 1980; Sterk & Bel, 1989; Folkerts & Nukamp, 1998).

A via neural não adrenérgica e não colinérgica citada pela primeira vez por Coburn & Tomita (1973), está também envolvida nos mecanismos broncoconstrictor e broncodilatador das vias aéreas, com a participação de mediadores incluindo substância P, neurocinina A, peptídeo intestinal vasoativo e óxido nítrico (NO). Além disso, embora as vias aéreas estejam sob forte controle colinérgico, outros mediadores também exercem seu controle, tais como leucotrienos, prostaglandinas, histamina e serotonina (Solway & Left, 1991; Belvise et al., 1993).

O cálcio (Ca^{+2}) é praticamente um mensageiro universal que controla a diversidade dos processos celulares, como a contração muscular (Bootman et al., 2001). Esse processo na musculatura lisa se dá pelo aumento na concentração intracelular dos íons Ca^{+2} , que pode ocorrer através de vários mensageiros e canais (Somlyo & Somlyo, 1968). Já os canais de potássio estão presentes no plasmalema de vários tipos celulares, contribuindo sobremaneira para a geração do potencial transmembrana e para a corrente de repolarização/hiperpolarização (Alexandre et al., 2000).

Os nucleotídeos cíclicos têm papel crucial na função celular de mamíferos. A concentração intracelular de nucleotídeos cíclicos é regulada por duas famílias de enzimas, adenilato e guanilato ciclases, as quais sintetizam adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) e guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc) respectivamente, dos seus correspondentes nucleotídeos trifosfatos, e as fosfodiesterases (PDE) que catalisam a hidrólise e inativação do AMPc e/ou GMPc. A elevação do AMPc nas vias aéreas tem implicações importantes para a resposta celular nas reações alérgicas.

1.3 Exercício Físico

Para o termo atividade física, encontramos na literatura diversas definições. A definição apresentada pelo Manifesto do Cirurgião Geral dos Estados Unidos, em 1969, considera como atividade física qualquer movimento corporal com gasto energético acima dos níveis de repouso, incluindo as atividades diárias, como se banhar, vestir-se; as atividades de trabalho, como andar, carregar; e as atividades de lazer, como se exercitar, praticar esportes, dançar, dentre outros.

Caspersen et al. (1985) e, posteriormente, Shephard & Balady (1999), definem atividade física como qualquer movimento corporal produzido pelos músculos esqueléticos que resultem em gasto energético, não se preocupando com a magnitude desse gasto de energia. Estes autores diferenciam atividade física e exercício físico a partir da intencionalidade do movimento, considerando que o exercício físico é um

subgrupo das atividades físicas, que é planejado, estruturado e repetitivo, tendo como propósito a manutenção ou a otimização do condicionamento físico. Ainda para Pate et al. (1995) e Caspersen et al. (1985) essas definições podem ser complementadas assinalando que o exercício tem como objetivo melhorar um ou mais componentes da aptidão: condição aeróbica, força e flexibilidade. Complementando essas definições temos as propostas por Fahey et al. (1999) nas quais a atividade física define-se como qualquer movimento do corpo realizado pelos músculos que requer energia para acontecer, podendo ser apresentado em um continuum, com base na quantidade de energia despendida. Exercício físico para eles se diferencia também pela intencionalidade e planejamento, enquanto a expressão aptidão física representaria a habilidade do corpo de adaptar-se às demandas do esforço físico que a atividade precisa para níveis moderados ou vigorosos, sem levar a completa exaustão.

A atividade física tem sido considerada um importante componente de um estilo de vida saudável devido particularmente a sua associação com diversos benefícios para a saúde física e mental (Pate et al., 1995). Esta associação e os conseqüentes benefícios de um estilo de vida mais ativo têm sido determinados em estudos epidemiológicos que procuram investigar diversos aspectos relacionados aos padrões de atividade física e a incidência de doenças em diferentes populações.

Os benefícios da prática de exercícios físicos para a saúde e qualidade de vida de pessoas de todas as idades estão bem documentados na literatura científica. Durante a adolescência, especificamente, há evidências de que a atividade física traz benefícios associados à saúde esquelética (conteúdo mineral e densidade óssea) e ao controle da pressão sangüínea e da obesidade. Além dos benefícios diretos, estudos que analisaram o *tracking* do exercício físico evidenciaram que a exposição à inatividade física, quando iniciada na infância ou adolescência, torna-se mais estável na vida adulta e, portanto, mais difícil de modificar.

Dentro das alterações metabólicas ocorridas durante o exercício físico contínuo, a intensidade no qual o treinamento é realizado, assume importância para a discussão. Uma medida quantitativa da capacidade individual de sustentar um exercício aeróbico é dada pelo consumo máximo de oxigênio (VO_2 máx). Assim, o VO_2 máx, tanto se refere à captação máxima de oxigênio quanto à potência máxima de oxigênio. Nos experimentos que investigam a fadiga proveniente de exercício físico, a intensidade no qual ele é realizado, se situa na faixa de 60-90% VO_2 máx, durante um período de tempo determinado (curto ou longo). Assim, tem-se que, de acordo com a duração e

intensidade do exercício, há ativação de sistemas energéticos e metabólicos específicos (Lancha Junior, 1996) (FIGURA 1.1). Durante exercício físico intenso e prolongado, a fadiga se relaciona, principalmente com a hipoglicemia, pois, tanto a glicose como a proporção da oxidação de carboidratos diminui.

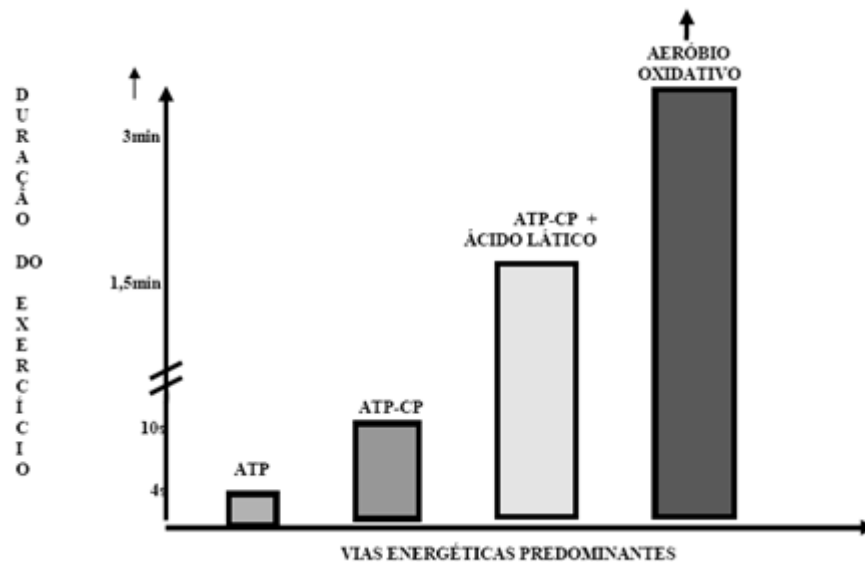


Figure 1.1 Participação dos sistemas energéticos durante exercício máximo em diferentes durações (Fonte: McArdle et al, 1992)

Em intensidades de exercício mais altas e de curta duração (90% do $VO_{2\text{máx}}$), parte da energia exigida para a atividade física destinar-se-á a produção de metabólitos (lactato, H^+ , P_i , ADP), cujo acúmulo no organismo irá gerar diminuição no rendimento. É importante, ainda, observar que nestas condições, há depleção de fosfatos de alta energia no músculo, com preservação do glicogênio (McLester Junior, 1997).

Diversos estudos da década de 80 apresentaram resultados nos quais repetidas cargas de exercício levavam a dano ou envelhecimento acelerado do músculo em indivíduos ou cobaias que se exercitavam regularmente. Entretanto Heath et al. (1981), depois de acompanhar atletas durante muitos anos, verificaram que seu potencial metabólico e sua capacidade funcional muscular não eram prejudicados. Além disso, Gutteridge et al. (1985) apontaram como possibilidade de mecanismo protetor o fato de terem encontrado incremento nos níveis de ferro e cobre no suor de atletas após o exercício, especulando que a excreção de tais metais no suor diminuiria a extensão do dano oxidativo mediado por tais metais. A partir destes estudos levantou-se a possibilidade de que o exercício regular pudesse promover um aumento adaptativo dos

mecanismos de defesa do músculo esquelético capaz de proteger contra as lesões produzidas pelas ERO.

Em 1982, Davies et al. propuseram que a formação de radicais livres induzida por exercício pudesse ser o estímulo inicial para a biogênese mitocondrial em uma situação de treinamento crônico. Nesta linha de trabalho, Ji (1992) demonstrou que em músculo esquelético uma carga isolada de trabalho exaustivo produzia um aumento de LPO e que a atividade das enzimas antioxidantes glutathione redutase, GPx, SOD e CAT estava significativamente aumentada. Da mesma forma, Alessio (1993) mostrou aumento de LPO em fibras musculares lentas e rápidas, de ratos submetidos a cargas de exercício, indicando aumento de estresse oxidativo induzido pela atividade física. Esse estresse era melhor tolerado por ratos treinados, sugerindo uma adaptação dos sistemas antioxidantes.

Ao estudar humanos, Nies et al. (1996) demonstraram a ocorrência de dano ao DNA nos leucócitos circulantes após exercício exaustivo em esteira. Pela primeira vez isto foi mostrado em indivíduos treinados, mas, como a extensão do dano foi pequena, os autores sugerem que a adaptação ao treinamento de resistência aeróbia pode reduzir os efeitos do EO, como o dano ao DNA. No mesmo ano, os resultados do trabalho de Mills et al. (1996), com cavalos de corrida, mostraram que o exercício pode induzir mudanças nos parâmetros bioquímicos que são indicativos de estresse oxidativo, e que estes são exacerbados na presença de altas temperaturas e umidade. Em interessante trabalho, envolvendo um modelo de sobrecarga de treinamento, Palazzetti et al. (2003) estudaram triatletas submetidos a um incremento de carga de trabalho da ordem de 21% na natação, 51% no ciclismo e 44% na corrida, por quatro semanas. O simples fato de o atleta ser submetido à sobrecarga de treinamento já provocava elevação significativa de adrenalina urinária e atividade da CK plasmática em repouso. No entanto, as maiores diferenças apareciam ao avaliar os efeitos de um duatlo (corrida e ciclismo) simulado.

Os atletas em condições de sobrecarga de treinamento apresentavam maiores índices de lipoperoxidação, avaliada pelo nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), CK-MB e mioglobina plasmáticos, marcadores de lesão muscular, além de queda da relação GSH:GSSG, indicando claramente que esta sobrecarga compromete os mecanismos de defesa antioxidantes relacionados à resposta induzida por exercício.

Foi proposto por Margaritis et al. (1997) que a magnitude da melhora do sistema de defesa antioxidante depende das cargas de treinamento. Os mesmos autores

demonstraram ainda que quanto mais alto o grau de exercício em triatletas, mais alta a atividade da enzima antioxidante GPX nos eritrócitos, protegendo o organismo do dano à membrana celular. Leeuwenburgh et al. (2003) acrescentam que o estresse oxidativo induzido pelo exercício pode disparar adaptações em resposta ao treinamento e que tais adaptações seriam tecido-específicas, sugerindo um mecanismo regulatório complexo. Além disso, Leaf et al. (1997) sugerem que em indivíduos saudáveis o exercício físico induz a peroxidação lipídica transitoriamente e que existe remoção dos produtos da LPO durante a fase de recuperação.

O trabalho de Venditti e Di Meo (1997) com ratos adultos submetidos a um programa de treinamento regular com duração de um ano comprovou a hipótese de que tal treinamento prolonga a capacidade de resistência aeróbia e aumenta as defesas antioxidantes, limitando assim o dano tecidual causado por RL. O estudo de Selamoglu et al. (2000) apresentou diferenças adaptativas entre os exercícios aeróbios e anaeróbios. A atividade da enzima GPx em eritrócitos estava aumentada nos corredores de longa distância comparados com levantadores de peso. Na mesma linha de trabalho, Inal et al. (2001), analisando o metabolismo anaeróbio em exercício agudo de natação, observaram que a produção de RL foi maior do que a capacidade antioxidante. Por outro lado, Subudhi et al. (2001), avaliando esquiadores alpinos de elite após treinamento intenso, não observaram mudança nos marcadores de estresse oxidativo, supondo então que estes atletas tiveram uma adaptação positiva em seus mecanismos antioxidantes com o treinamento.

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. O processo adaptativo do treinamento físico é capaz de proteger os indivíduos treinados na maioria das situações de exposição ao exercício. Uma falha em detectar qualquer mudança na lipoperoxidação ou outro alvo de dano pode sugerir que algumas mudanças compensatórias no sistema antioxidante podem ter ocorrido.

1.4 O Processo Asmático

1.4.1 Definição e Desenvolvimento

A asma é uma patologia determinada pela interação de fatores genéticos e ambientais, levando a um processo de inflamação crônica e complexa das vias aéreas. A

asma é caracterizada por obstrução variável e reversível espontaneamente, embora não completamente em todos os pacientes, ou através de tratamento farmacológico. A hiperreatividade, definida como resposta exacerbada das vias aéreas a estímulos não alérgicos, também é observada, e envolve diversos mediadores e células inflamatórias (Barnes et al., 1998).

De forma mais simples, a asma pode ser conceituada como uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, de causa não completamente elucidada, que se caracteriza por crises de tosse, sibilos, sensação de compressão torácica, dificuldade respiratória e dispnéia. O estreitamento das vias aéreas é geralmente reversível, porém em pacientes com quadro crônico, a inflamação pode determinar obstrução irreversível ao fluxo aéreo (Chung et al., 1990).

1.4.2 Base Inflamatória da Asma

A inflamação brônquica consiste no fator fisiopatogênico mais importante da asma (Figura 1.2). É resultante de interações complexas entre os mediadores liberados por células inflamatórias, como linfócitos T, mastócitos, macrófagos, eosinófilos, basófilos e neutrófilos. A resposta asmática possui duas fases, inicial e tardia. A resposta inicial ocorre usualmente dentro de uma hora após a exposição ao antígeno, devido a ligação do complexo alérgeno – IgE específica à receptores de alta afinidade nos mastócitos e subsequente degranulação e liberação de vários mediadores inflamatórios. A resposta tardia inicia-se entre 3 e 4 horas após a exposição ao antígeno, tendo seu pico em torno de 9 horas, enquanto a obstrução das vias aéreas dá-se entre 12 e 24 horas após a exposição. (Peters et al., 1998; Varner & Lemanske, 2000; Bharadwaj & Agrawal, 2004).

A hiperresponsividade brônquica ou hiperreatividade brônquica (HRB) caracteriza-se por uma resposta exacerbada a uma variedade de estímulos que levam à broncoconstrição. O mecanismo preciso que desencadeia a HRB não está elucidado completamente, mas, envolve espessamento da parede muscular, aumenta a contratilidade, altera o controle neural autonômico e o processo inflamatório agudo e crônico das vias aéreas que pode causar dano epitelial (Law et al., 2000). Na avaliação da HRB, além do teste de broncoprovocação com agentes broncoconstritores, têm sido empregados também testes não farmacológicos, como estímulos físicos.

A limitação do fluxo aéreo, que corresponde ao principal componente da asma brônquica, apresenta como principais características fisiopatológicas: hipertrofia e

contração do músculo liso, vasodilatação, hipersecreção e remodelamento brônquico. O edema é resultado da vasodilatação e congestão da microvascularização brônquica que promove o aumento na exsudação de plasma e macromoléculas para o interstício e luz das vias aéreas. Ocorre ainda infiltração de células inflamatórias nos brônquios, principalmente por eosinófilos, linfócitos, mastócitos e macrófagos com descamação do epitélio brônquico e espessamento da membrana basal reticular. A hipersecreção mucosa caracteriza-se por hipertrofia das glândulas mucosas, aumento das células caliciformes, com aumento de secreção intraluminal, e obstrução das vias aéreas por muco. Devido ao aumento da massa muscular que envolve as vias aéreas, por hipertrofia e hiperplasia muscular, temos o conseqüente encurtamento da musculatura lisa, facilitando o processo contrátil (Jiang et al., 1994).

A característica macroscópica mais importante é a hiperinsulflação pulmonar com áreas focais de atelectasias decorrentes de obstrução causada pela oclusão de brônquios e bronquíolos por muco espesso gelatinoso. A presença de muco indica deficiência crônica no sistema secretor de muco ou clearance mucociliar, ou em ambos. A mucina constitui-se, entretanto, no principal elemento formador do componente gel, sendo que em acometidos pelo mal asmático, a mucina é intrinsecamente anormal em seu perfil biofísico, apresentando-se com alta viscosidade.

A maioria dos asmáticos apresenta um comprometimento mais acentuado nas pequenas vias aéreas, entre 2 e 6 mm de diâmetro. Os brônquios apresentam, com freqüência, hiperplasia das células caliciformes, metaplasia e hipertrofia de glândulas mucosas, ectasia de ductos glandulares e desnudamento das células ciliadas resultando em perda da função ciliar, favorecendo a presença de muco intraluminal. Dados atuais apresentam evidências de que o pulmão distal que inclui as pequenas vias aéreas, menores de 2mm de diâmetro, e o parênquima pulmonar, contribui também para a patogênese da asma (Sanerkin, Evans et al., 1965).

De acordo com a definição de asma, os sintomas estão associados a uma variável limitação ao fluxo aéreo, que pode ser revertida espontaneamente ou sob efeito do tratamento. Todavia, é por demais conhecido que a asma determina uma inflamação crônica das vias aéreas, com remodelamento estrutural na parede das vias aéreas que pode ser irreversível mesmo com o tratamento, resultando em obstrução fixa irreversível (Seow et al., 1998).

O processo de lesão e reparo apresenta-se constantemente ativado, durante a inflamação crônica vista na asma. A incidência é maior em pacientes com asma não-

alérgica severa, onde as alterações estruturais da parede brônquica são mais intensas. O remodelamento brônquico parece ser devido a uma persistência dos mecanismos crônicos de reparação, que determina várias alterações estruturais, com a combinação de um aumento na ativação de fatores pró-fibrose de crescimento e um desequilíbrio entre a síntese e a degradação de matriz extracelular. Caracteriza-se por um processo de fibrogênese, com espessamento da membrana basal, edema, proliferação e congestão vascular da submucosa e lâmina própria com aumento da permeabilidade capilar.

Alguns casos de asma denotam quadro de perda parcial e irreversível da função respiratória ao longo do tempo. Postula-se que o processo inflamatório crônico nas vias aéreas pode, por meio da liberação de diversos mediadores inflamatórios, causar alterações estruturais irreversíveis nas vias aéreas e consequente piora da broncoconstrição, contribuindo, assim, para o fenômeno da perda de função pulmonar. A este processo creditou-se o nome de remodelamento brônquico (Mauad et al., 2000).

Enfim, a asma configura evidências (Holgate et al., 2003; Bharadwaj & Agrawal, 2004) de que a maquinaria muscular contrátil encontra-se rodeada e bombardeada por mediadores inflamatórios, que parecem se responsáveis pelo aumento na velocidade de contração e pela diminuição na plasticidade muscular. Desta forma, a disfunção muscular lisa das vias aéreas pode ser um dos primeiros mecanismos através do qual a inflamação induz a hiperresponsividade que, somada ao remodelamento, promove um comprometimento ainda maior na função muscular das vias aéreas no asmático (Fernades et al., 2003).

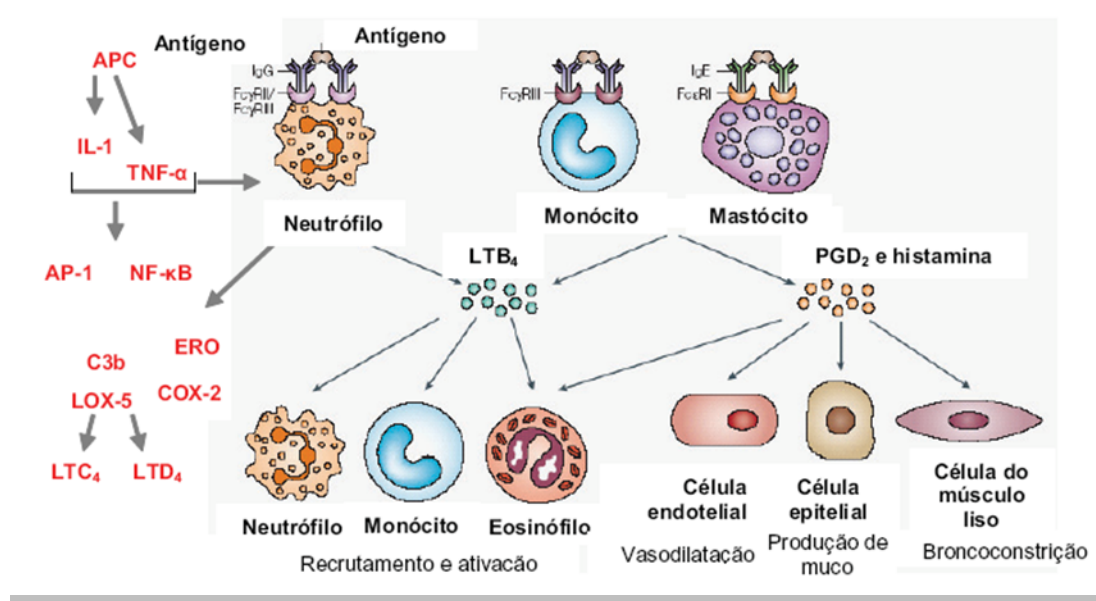


Figure 1.2 Representação clássica da resposta imunológica ao estímulo irritante ou antígeno na fase imediata da asma.

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; PGD₂: prostagladina do tipo D, potente espasmógeno (Fonte: Luster & Targer, 2004).

1.5 Hiperreatividade Brônquica

Uma explicação para a hiperreatividade bronquial das vias aéreas do processo asmático seria a existência de um “mecanismo nervoso anormal” até meados do século passado. Atualmente, foi demonstrado em experimentos laboratoriais e estudos clínicos que a hiperreatividade bronquial poderia ser consequência da resposta inflamatória das vias aéreas (Barnes, 1989). Este aumento da resposta contrátil da musculatura das vias aéreas para diversos estímulos é comumente descrito e definido como hiperreatividade (Marthan, 1994).

As principais características são consequências do aumento da expressão de múltiplas proteínas que estão envolvidas em uma complexa cascata inflamatória. Dentre as proteínas inflamatórias incluem citocinas, quimiocinas, enzimas que produzem mediadores inflamatórios, receptores para mediadores inflamatórios e adesão de moléculas (Fernandes *et al.*, 2003). Assim sendo, várias células são ativadas gerando

um processo caótico cíclico, com substâncias ativando e reativando outras células, mesmo quando a causa desencadeante já tenha sido removida (Chung *et al.*, 1990).

Fica claro que o aumento da expressão da maioria das proteínas inflamatórias é resultado de um aumento na transcrição genética, sendo que vários destes genes não são expressos em células normais sob condições habituais. Mudanças na transcrição de genes são reguladas por fatores de transcrição. Nas doenças inflamatórias, os fatores de transcrição ativados por estímulos inflamatórios (alérgenos, vírus, oxidantes e citocinas) acionam genes, determinando aumento da síntese de proteínas inflamatórias e outras proteínas e enzimas envolvidas na ativação celular.

Ainda, os mecanismos fisiopatológicos da hiperreatividade, assim como, a natureza dos fatores que alteram as respostas celulares envolvidas no processo asmático continua por se esclarecer. Desta forma, se torna válido o esforço em pesquisas nesta área, não só visando compreender o complexo emaranhado que envolve a rede bioquímica da hiperreatividade e fases tardia e inflamatória do processo asmático, como propor-se a desvendar mecanismos e alvos terapêuticos para o uso de agentes farmacológicos na terapêutica desta doença, ou ainda, sugerir outras ações farmacológicas a fármacos pré-existentes na prática clínica.

1.6 Inflamação, Estresse Oxidativo e Asma

A produção de oxidantes é parte do metabolismo normal de vários tipos celulares e possui um papel importante para manter a homeostase celular. Os tecidos são constantemente submetidos à presença de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e outros gerados durante numerosas reações metabólicas (Castillo *et al.*, 1992; Cabre *et al.*, 2000). Para se proteger contra os efeitos nocivos dos oxidantes, o organismo possui um sistema antioxidante. No entanto, quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidante e antioxidante em favor do primeiro, instala-se o chamado estresse oxidativo (Prior & Cao, 1999; Comhair & Erzurum, 2002).

O estresse oxidativo produz transtornos no metabolismo celular, incluindo aumento na concentração intracelular de cálcio, alteração no transporte iônico, alteração na permeabilidade da membrana e destruição celular por peroxidação lipídica (Reckmage *et al.*, 1989). As ROS têm sido implicadas como mediadores de várias patologias tais como, esclerose múltipla (Halliwell & Gutteridge, 1999), câncer hepático (Major & Collier, 1998), artrite reumatóide (Darlington & Stone, 2001), aterosclerose

(Salvemini *et al.*, 2001), além das doenças respiratórias incluindo asma (Henricks & Nukamp, 2001; Caramori & Papi, 2004).

Existem cada vez mais evidências que a típica inflamação crônica das vias aéreas observada na asma, resulta de um estresse oxidativo acentuado. Também muitos dos estímulos que exacerbam a asma, incluindo infecções virais e poluentes, podem ativar a produção de oxidantes, induzindo inflamação que produz os sintomas asmáticos (Caramori & Papi, 2004). As ROS causam a asma por oxidação ou nitração de proteínas, lipídios ou DNA levando à perda da função dessas moléculas (Fujisawa, 2005).

As células inflamatórias possuem uma capacidade excepcional para a produção de oxidantes. No foco inflamatório, eosinófilos, neutrófilos, monócitos e macrófagos ativados, além das células epiteliais bronquial podem gerar oxidantes (Barnes *et al.*, 1998); Henricks & Nijkamp, 2001; Bowler & Crapo, 2002). As fontes enzimáticas potenciais de ROS incluem a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, sistema xantina oxidase citosólico, NADPH oxidase associado à membrana, enzimas relacionadas ao metabolismo do ácido araquidônico (ciclooxigenase e lipooxigenase) e citocromo P450 (Caramori & Papi, 2004; Cai, 2005).

O sistema de defesa antioxidante inclui antioxidantes não enzimáticos, como a glutathiona, ácido úrico, bilirrubina, β -caroteno (vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e α -tocoferol (vitamina E) e enzimáticos, tais como, superóxido-dismutase (SOD), catalase e glutathiona-peroxidase (GSH-Px) (Reckmage *et al.*, 1989; Castillo *et al.*, 1992; Melin *et al.*, 2000). Nos sistemas eucariotos existem duas formas de SOD, a forma SOD-Cu-Zn encontrada no citosol, enquanto a SOD-Mn está localizada primariamente na mitocôndria. Esta enzima tem o papel antioxidante por catalisar a dismutação do O_2^- em H_2O e O_2 , na presença do próton H^+ (Michiels *et al.*, 1994; Simibe *et al.*, 2001; Acharya *et al.*, 1991). A catalase está localizada nos peroxissomos e no citosol da célula, e catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 (Shan *et al.*, 1990; Michiels *et al.*, 1994). Esta enzima é encontrada no sangue, medula óssea, rim e fígado (Mayes, 1990). Sua atividade é dependente da NADPH (Scott *et al.*, 1991). A GSH-Px remove o H_2O_2 convertendo a glutathiona reduzida (GSH) em oxidada (GSSG). A recuperação da GSH é feita pela enzima glutathiona-redutase (GSSG-RD) (Sing & Pathak, 1990; Coles *et al.*, 2003).

Os níveis de GSH/GSSG em resposta a estímulos oxidativos, modulam a expressão de genes pró-inflamatórios pela ativação de fatores de transcrição tais como Proteína Ativadora-1 (AP-1) e o NF- κ B, e também de genes antioxidantes tais como SOD-Mn, γ -GCS-HS, GPx. Assim, nas células pulmonares, por exemplo, o equilíbrio na expressão dos genes pró e antiinflamatório relacionados ao nível de GSH/GSSG é crítico para definir se o processo resultará em lesão celular ou proteção contra defeitos danosos da inflamação.

Dessa forma, o conhecimento do mecanismo molecular que sequencialmente regula a expressão desses genes nas células pode abrir um caminho novo na modulação da resposta inflamatória (Rahman & Macnee, 2000).

Níveis elevados de alguns marcadores diretos ou indiretos do estresse oxidativo, incluindo malonildialdeído (MDA) e H₂O₂, têm sido encontrados na urina, plasma, lavado broncoalveolar e pulmões de asmáticos. Seus níveis estão frequentemente relacionados à severidade da asma e são inversamente relacionados ao grau de equilíbrio dos sistemas pró e antioxidante (Barnes *et al.*, 1998; Henricks & Nijkamp, 2001; Bowler & Crapo, 2002). Outros marcadores incluem proteínas (nitrotirosina e 3-bromotirosina), lipídios (isoprostanos e etano) e DNA (hidroxideoxiguanosina) (Dweik *et al.*, 2001; Kharitonov & Barnes, 2001; 2002).

As ROS liberadas de eosinófilos e macrófagos alveolares possuem um papel importante na asma brônquica. Elas podem induzir a contração do músculo liso das vias aéreas, a liberação de histamina pelos mastócitos, a secreção de muco e ainda interagem com inibidor de protease (Pryor & Dooley, 1985; Alving *et al.*, 1993; Hatch, 1995).

Assim, as ROS estão sempre entre os inúmeros mediadores liberados em processos inflamatórios das vias aéreas e possuem um papel importante na patogênese de doenças como a asma, a doença pulmonar obstrutiva crônica e a síndrome da angústia respiratória aguda (Rahman & Macnee, 2000; Henricks & Nijkamp, 2001).

O estresse oxidativo é o resultado da excessiva produção de espécies químicas reativas, como os radicais livres. O termo radical livre faz referência a um átomo ou molécula altamente reativo, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica (Halliwell & Gutteridge, 1990; Halliwell, 1992). É este não-emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas. Na verdade, radical livre não é o termo ideal para designar os agentes reativos patogênicos, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada. Como em sua maioria estas substâncias são

derivadas do metabolismo do O_2 , o termo “espécies reativas do oxigênio” (ERO) torna-se mais apropriado. As ERO são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O . Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido (O_2^-), hidroperoxila (H_2O^*) e hidroxila (OH^*) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Normalmente a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria, e a reatividade da ERO é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons.

As espécies químicas reativas podem também serem produzidas como um subproduto de outras vias bioquímicas, incluindo a síntese de óxido nítrico (NO) e o metabolismo do ácido araquidônico (que estão implicados na excitotoxicidade), assim como o sistema de oxidase de função mista. Não controlados, os ERO atacam muitas moléculas importantes, incluindo enzimas, lipídios de membrana e DNA. Os mecanismos de defesa contra estas moléculas são fornecidos na forma de enzimas, como a superóxido dismutase (SOD), catalase, a glutathione peroxidase, glutathione reductase e outros antioxidantes como a albumina (Halliwell & Gutteridge, 1990), assim como em antioxidantes como o ácido ascórbico, glutathione e α -tocoferol (vitamina E) que normalmente mantêm essas espécies sob controle.

Clinicamente, o estresse oxidativo pode causar lesão tecidual relacionado com muitas desordens fisiopatológicas como a hipóxia, a inflamação e a isquemia tecidual e de reperfusão. Outras teorias afirmam que o estresse oxidativo pode estar relacionado com disfunção neurológica associada a doenças incluindo a doença de Parkinson, Alzheimer, epilepsias, dentre outras (Beyer *et al.*, 1998).

1.7 Asma Induzida pelo Exercício

Como informado anteriormente, a asma é uma doença crônica das vias aéreas inferiores, caracterizada por processo inflamatório e hiperreatividade brônquica representada pelo broncoespasmo, limitando o fluxo aéreo. Clinicamente, apresenta episódios recorrentes de sibilância, dispnéia, aperto no peito e tosse.

O mecanismo de desenvolvimento dessa obstrução ainda não está definido; no entanto, muitos estudos foram realizados para esclarecer os mecanismos de ação da asma induzida pelo exercício (AIE).

O exercício é um dos mais comuns precipitantes da asma brônquica, ocorrendo após esforços vigorosos, capazes de elevar a frequência cardíaca a 170-180bpm, a

ventilação acima de $200\text{l}/\text{min}^{-1}$, com um aumento no consumo de oxigênio (VO_2) de 6-85%. A prevalência de esforços em indivíduos com asma varia de 40 a 90%. A AIE pode ocorrer em qualquer idade, desde que o exercício seja contínuo. Em crianças e adolescentes de diferentes níveis de condicionamento físico, desde aqueles não engajados em esportes até atletas competitivos, tal síndrome ocorre com mais frequência (Godfrey, 1997).

Para que a crise se produza, torna-se necessário que a ventilação atinja 60% ou mais da ventilação máxima, e que o esforço se mantenha por 6 a 8 minutos. O exercício físico provoca broncoconstrição na maioria (cerca de 70%) das crianças e dos adolescentes que apresentam asma, porém, a AIE pode ocorrer naqueles que não apresentam o diagnóstico de asma. Tipicamente, a crise inicia de 2 a 4 minutos após o exercício, com picos de 5 a 10 minutos e desaparece espontaneamente em torno de 20 a 40 minutos. Algumas vezes, tal crise pode ser sustentada por mais de 1 hora. Uma resposta tardia pode aparecer de 4 a 10 horas após o exercício. A broncoconstrição esforço-induzida, relaciona-se ao tipo de atividade física, a sua duração e as condições ambientais. Um exercício curto, de 30 segundos ou 1-2 minutos, repetidos a curtos espaços, tende a impedir o aparecimento da asma pós-exercício. Além disso, exercícios com braços normalmente causam menos broncoconstrição do que os que utilizam as pernas, sendo menor a incidência de AIE nos esportes coletivos, onde o esforço é intermitente. A prevalência de AIE chega a 12% em crianças de idade escolar e varia em diferentes modalidades esportivas, sendo observada com maior prevalência em atletas que competem em climas frios (Becker, 2003).

A obstrução é um fenômeno agudo, ocorre imediatamente após o término do exercício, atinge o pico máximo entre 5 e 10 minutos, e regride espontaneamente, com restabelecimento total em 30 a 90 minutos. A recuperação geralmente é mais lenta nos adolescentes do que em crianças. Durante o exercício, o paciente está relativamente protegido, pelo aumento do *drive* de catecolaminas que ocorre durante o esforço e também pela redução do tônus brônquico. Esta curta proteção cessa tão logo termina o esforço, quando se inicia o broncoespasmo (Anderson, 2000).

Existem normalmente duas descrições utilizadas: AIE e broncoconstrição induzida pelo exercício (BIE). Esta última consiste na obstrução brônquica (espasmo) observada após exercício em pessoas que apresentam a função pulmonar normal em repouso; e a AIE é algumas vezes usada para descrever a acentuação dos sintomas após

exercício para indivíduos asmáticos; entretanto, as duas denominações são intercambiáveis, sendo que alguns autores as consideram como sinônimos.

A gravidade da AIE depende do grau de hiperresponsividade brônquica como um todo e como consequência de fatores que possam alterá-la, como estimulação alérgica e infecções virais. O exercício por si só, ao contrário da asma desencadeada por alérgenos, não aumenta a responsividade brônquica.

Uma clássica característica da AIE, e ainda não completamente compreendida, é o período refratário a novos estímulos, que ocorre por algumas horas após o exercício. Se um asmático desenvolve AIE e se recupera espontaneamente dentro de 1 hora, um novo exercício resulta em marcante redução da AIE em cerca de 50% dos pacientes. A broncoconstrição exercício-induzida é causada, em parte, pelo leucotrieno D liberado nas vias aéreas. Estudos sugerem que o LTD₄, liberado nas vias aéreas de pacientes com asma, em decorrência do exercício, estimula a lenta liberação de prostaglandinas broncodilatadoras, como a PGE₂ que relaxa o músculo liso brônquico e vascular.

O diagnóstico depende fundamentalmente dos sintomas relatados pelo paciente ou atleta. Existem protocolos de provocação ao estímulo de esforço, utilizando esteiras ergométricas e orientações com programação da duração, intensidade do esforço, frequência cardíaca máxima, níveis de lactato, medidas da temperatura e umidade do ar inspirado, dentre outros. A intensidade do esforço deve estar abaixo de 85% da frequência máxima cardíaca. Acima destes valores, ocorre maior liberação de catecolaminas que pode estimular a broncodilatação, resultando em diagnóstico falso negativo, e, fadiga em certos indivíduos, que não conseguem completar o exercício prescrito. Antes do teste, uma análise espirométrica é efetuada, com pelo menos 3 medidas da capacidade vital forçada (CVF), retendo-se a de maior valor como parâmetro para posterior comparação. A CVF é repetida após o esforço aos 3, 6, 10, 15 e 20 minutos. Entre os parâmetros que avaliam a obstrução através da CVF utiliza-se principalmente o volume expiratório no primeiro segundo (VEF₁), considerado o parâmetro mais confiável na determinação da obstrução, pela simplicidade de sua obtenção e pela fácil reprodutibilidade. Valores na queda do VEF₁ maior que 10-15% têm sido utilizados arbitrariamente para diagnosticar a AIE, porém sem justificativa estatística.

Testes de provocação farmacológica como os da metacolina ou histamina têm demonstrado menor sensibilidade do que a hiperventilação voluntária eucápnica (HVE) para a detecção da AIE em atletas de elite. Todavia, a HVE produz uma ventilação

maior do que a maioria dos indivíduos normalmente alcançaria durante o exercício e pode sobrediagnosticar a AIE em não-atletas.

O exercício físico envolve os sistemas respiratório, cardiovascular e músculo-esquelético. Em termos funcionais, após um esforço físico, pode haver redução na CVF, devido a um esforço limitado, por obstrução das vias aéreas, alteração na capacidade pulmonar total (CPT) e diminuição da fadiga dos músculos respiratórios.

O ar inspirado é aquecido à 37°C e umidificado com vapor d'água com pressão parcial de 47,07 mmH₂O. A área de superfície da mucosa nasal gira em torno de 160cm² suprindo o ar inspirado de calor e vapor d'água durante a inspiração. À medida que a ventilação aumenta durante o esforço, ocorre o aumento da resistência inspiratória, passando a respiração a ser oral quando a ventilação eleva-se acima de 30l/min, cabendo às vias aéreas intratorácicas a atribuição de aquecer e umidificar o ar inspirado.

Muitas hipóteses têm sido sugeridas para determinar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos em provocar obstrução das vias aéreas.

A primeira está relacionada à acelerada evaporação de água, determinando perda de calor pela mucosa, com a finalidade de aquecer o ar inspirado ao nível da árvore traqueobrônquica, quando de ventilação-minuto elevada. Quanto maior a quantidade de água e calor transferidos da mucosa brônquica, maior será a resposta obstrutiva. O ar a 37°C, totalmente saturado com vapor, contém 47mg de H₂O por litro de ar. Em um ambiente com temperatura de 22°C, com umidade relativa do ar de 50%, cada litro de ar contém 22 mmH₂O. A -10°C, com 50% de umidade relativa, cada litro de ar contém apenas 1 mg de H₂O. Desta forma, atletas com alta ventilação minuto (>280l.min⁻¹) perdem considerável quantidade de água durante o exercício, principalmente em ambientes secos e frios. Acredita-se que a respiração rápida cause evaporação de água e aumento transitório da osmolaridade na superfície líquida das grandes vias aéreas centrais, no chamado fluido periciliar. Admite-se que o aumento dos íons cloro na luz do epitélio brônquico seja o estímulo para a liberação de mediadores inflamatórios pelos mastócitos, eosinófilos e nervos sensoriais, como a histamina, as prostaglandinas, os cys-LTs (C₄, D₄ e E₄) e os neuropeptídeos, conduzindo a broncoconstrição, tosse, dispnéia e até a secreção de muco. Em alguns, o gradiente osmótico pode ser suficiente para causar edema e extravasamento de plasma pelos vasos brônquicos e das pequenas vias aéreas. O aumento extracelular da osmolaridade determina o fluxo de Na⁺ e Cl⁻

para o interior da célula. O Ca^{+2} segue o Cl^- passivamente e ativa a fosfolipase A_2 (PLA_2) das membranas celulares, elevando a produção de leucotrienos, determinando a liberação de mediadores inflamatórios.

A segunda hipótese relaciona-se a hiperperfusão reativa da microcirculação das vias aéreas, com formação de edema da mucosa brônquica. A circulação brônquica origina-se da aorta e irriga as vias aéreas extra e intrapulmonares. Em condições fisiológicas, o fluxo sanguíneo total da vias aéreas se situa em torno de 0,5-1% do débito cardíaco. A maior parte do fluxo sanguíneo encontra-se nos tecidos subepiteliais, onde a microvasculatura compreende 10-20% do volume tecidual. No homem, o fluxo subepitelial oscila entre 30 a 95ml/min por 100g de tecido seco. Em asmáticos, a rede capilar pode estar hipertrofiada e com hiperplasia. Em função de sua localização e capacidade pode alterar suas dimensões, a circulação brônquica pode exercer importante influência na geometria brônquica através da dilatação, exsudação e edema, determinando redução da luz das vias aéreas. Segundo a lei de Poiseuille, a resistência ao fluxo aéreo varia em função da quarta potência do raio de um tubo. O espessamento da mucosa das vias aéreas através da vasodilatação e exsudação de líquido proveniente da hiperemia brônquica determina obstrução mecânica, ampliando o efeito broncoconstrictor da musculatura lisa. McFadden (1995) propôs a hipótese de constricção da microcirculação brônquica pelo resfriamento da mucosa durante o exercício e o reaquecimento uma vez cessado o esforço, que se processaria por uma hiperemia reativa, determinando mudanças na permeabilidade e edema da submucosa, estabelecendo mudanças no calibre brônquico e aumento na resistência ao fluxo aéreo. Segundo Dunnill, asmáticos têm sua rede capilar brônquica hiperplasiada que parece ser mais permeável que a dos não-asmáticos. Para reafirmar a hipótese de McFadden (1995), há descrições de maior grau de obstrução quando da fase de reaquecimento, assim cessado o esforço, ao adicionar-se ao ar inspirado, ar úmido e quente. Este agravamento pela adição de ar aquecido ao ar inspirado não foi confirmado por outros autores. Ainda não está bem determinado até que ponto esta hiperperfusão das vias aéreas contribui para a broncoconstricção. Já Kanazawa *et al.*(2000), descreveram a possível contribuição do óxido nítrico (NO) endógeno na AIE. O NO é um potente vasodilatador da circulação brônquica e pode mediar a hiperemia encontrada nas vias aéreas dos asmáticos. Desta forma, o NO pode aumentar a exsudação de plasma pelo aumento do fluxo sanguíneo das vênulas pós-capilares, com conseqüente aumento do

edema, sugerindo que o NO endógeno possa ter participação importante na modulação da microcirculação brônquica de asmáticos. Em estudo recente, Kanazawa *et al.* obtiveram correlação entre o índice de permeabilidade vascular e a concentração de derivados de NO no escarro induzido; concluindo que há correlação entre a gravidade da AIE e o aumento da permeabilidade vascular decorrente da excessiva produção de NO (Anderson SD, 1998).

A participação de mediadores na patogênese da AIE é muito controversa, ainda não completamente esclarecida, com resultados conflitantes nas análises de lavados broncoalveolares (LBA). Venge, em 1991, relacionou o grau da broncoconstricção esforço-induzida aos níveis de ECP no soro de pacientes com asma, demonstrando que os níveis séricos de ECP antes do exercício se correlacionavam significativamente com a queda máxima do VEF₁ após o exercício. Yoshikawa em 1998, utilizando a técnica do escarro induzido, encontrou percentagens expressivamente elevadas de eosinófilos e ECP em asmáticos com broncoconstricção esforço-induzida, acreditando ser possível que a broncoconstricção estimulada por vários tipos de mediadores dos mastócitos possa ser potencializada em presença de inflamação eosinófilica. Em contrapartida, uma publicação de Gauvreau *et al.*, em 2000, sangue ou escarro, ao contrário do que ocorre quando de inalação de alérgenos pelo mesmo grupo de pacientes, que resultou em exacerbação na responsividade e aumento nos eosinófilos do escarro. Este estudo demonstrou que a broncoconstricção esforço-induzida não causa inflamação eosinofílica das vias aéreas em asmáticos que desenvolvem, entretanto, inflamação com o mesmo grau de broncoconstricção alérgeno-induzida. A broncoconstricção induzida por hiperpnéia em porquinhos-da-Índia é um dos modelos mais utilizados no estudo da AIE. Usando este modelo animal, Ray *et al.*, puderam evidenciar a participação dos neuropeptídeos na patogênese da AIE, decorrente da liberação de taquicinas pelos nervos sensoriais das vias aéreas. O pré-tratamento destes animais com capsaicina atenuava a broncoconstricção. O peptídeo relacionado ao gene-calcitonina (CGRP) encontrado em células neuroendócrinas brônquicas atenua a broncoconstricção induzida pela hiperpnéia nestes animais e parece modular as respostas mediadas pelo LTD₄. Gerland *et al.* demonstraram em porquinhos-da-Índia que os antagonistas de LTD₄ ou o inibidor da 5-lipoxigenase eram capazes de reduzir em 50-90% a broncoconstricção induzida pela hiperpnéia.

A terceira hipótese trata da acidose láctica (produto final do metabolismo anaeróbico). O ácido láctico tem livre acesso às vias aéreas e ao parênquima pulmonar,

através da circulação brônquica e pulmonar, e o aumento da concentração do íon hidrogênio pode criar condições necessárias à libertação de mediadores dos mastócitos e promover a geração e acúmulo de bradicininas. Também se tem sugerido que o excesso do íon hidrogênio pode estimular o corpo carotídeo e, portanto, levar à obstrução das vias aéreas.

A quarta hipótese versa sobre o desequilíbrio da descarga alfa e beta adrenérgicas. Outros argumentos explicativos da broncoconstrição após o exercício, em asmáticos, refere-se à ligação dos receptores de IgE da superfície celular de alta afinidade, na mucosa do mastócito, com alérgenos inalados, que poderá desencadear a libertação de mediadores pré-formados (histamina, triptase) e gerados de novo (prostaglandina D₄ e leucotrienos C₄ e D₄) que induzirão a contração do músculo liso, edema da mucosa brônquica e secreção de muco glandular. A inflamação eosinofílica das vias aéreas, considerada como um dos fatores preponderantes na patogênese da asma brônquica, também foi demonstrada em indivíduos com AIE.

A quinta hipótese refere-se a um estudo levado a cabo por uma equipe de cientistas norte-americanos da Universidade de Michigan, e sugere que o suor pode estar correlacionado com a AIE. A capacidade de suar pode fazer mais que manter o corpo fresco: pode representar um meio de contrair asma em menor escala, quando associada ao exercício físico. Os investigadores dizem que aqueles que libertam menos suor, saliva e lágrimas durante o exercício físico, nomeadamente os desportistas, podem ter mais problemas de respiração. Tal pesquisa também revela que é possível haver fluido a menos nas respectivas vias respiratórias.

A sexta hipótese esclarece segundo investigadores norte-americanos da Universidade de Indiana, que, se ingerirmos cafeína, os sintomas da AIE podem ser reduzidos. Num estudo multicêntrico, randomizado e duplamente cego foram incluídos 10 indivíduos com esta doença. Eles tiveram de consumir 3, 6 ou 9 miligramas de cafeína por quilo de peso ou placebo, 1 hora antes de fazerem exercício. Foram realizados testes de função pulmonar antes e depois do exercício. A conclusão a que chegou o estudo foi que um consumo de 9 miligramas de cafeína por quilo de peso era tão eficaz como um inalador (salbutamol) para prevenir ou tratar a asma induzida pelo exercício. Mas, quantidades mais baixas também são benéficas, permitindo a redução dos sintomas.

A sétima hipótese refere-se a um estudo epidemiológico proposto por Gotshall et al. (1975) e Mickleborough et al.(1994), o qual demonstrou que o elevado consumo de

sal pode representar um fator de risco, pois o sal potencializa a AIE. Burney também propôs que há uma associação entre a ingestão de sal e a asma, sugerindo que asmáticos apresentam uma tendência a ingerir mais sal do que sujeitos não asmáticos. O mecanismo pelo qual o sal potencializa a AIE ainda não está completamente esclarecido. Possivelmente, ocorre uma saturação da ATPase Na⁺/K⁺ na musculatura lisa das vias aéreas, sobrecarregando a Ca⁺⁺ATPase como reguladora do influxo/efluxo de eletrólitos na célula muscular lisa. Entretanto, o cálcio carreado nesta ATPase acentua a contratilidade da musculatura lisa, causando a broncoconstrição.

Outra hipótese, a sétima, seria a hipocapnia.

A resposta ao exercício pode estar ausente até mesmo em indivíduos com asma severa persistente, sugerindo que a resposta ao exercício, ou seja, a ocorrência de AIE, não está consistentemente relacionada com a severidade da asma (Fletcher *et al.*, 2001).

Os sintomas da asma induzida pelo exercício podem ser assim enumerados: tosse durante ou após o exercício, dores no estômago, sibilo, cefaléia, aperto no peito durante ou após o exercício e câimbras musculares.

O exercício é um dos estímulos não-farmacológicos que podem induzir hiperreatividade brônquica e, portanto, broncoespasmo. Inicialmente é importante que se faça uma distinção entre asma induzida por exercício e um quadro de asma leve com exacerbação pelo exercício. Esta diferenciação é fundamental para a programação terapêutica, já que quase todos os portadores de AIE têm função pulmonar basal normal, só requerendo terapêutica preventiva antes do exercício. Por outro lado, 40 a 90% dos indivíduos com asma apresentam broncoespasmo induzido por exercício.

A prova de esforço tem sido considerada como a mais sensível e com alta especificidade para o diagnóstico da AIE. A corrida ao ar livre, durante 6 a 8 minutos tem sido considerada como prova mais asmogênica.

Os benefícios do exercício físico têm sido estudados para mensurar os efeitos das respostas aos diferentes tipos de treinamento no condicionamento físico e na função pulmonar de indivíduos com AIE (Storms, 2003).

1.8 Modelos Animais de Asma

Modelos experimentais, em sua maioria, deram início aos estudos fisiopatológicos e mecanismos envolvidos no desenvolvimento do estudo da asma. É grande a diversidade de modelos animais utilizados visando mimetizar as alterações

observadas durante o processo asmático. A imunização a um dado antígeno e sua reapresentação constituem a base da maioria dos modelos (Jancar *et al.*, 1997). Assim, podemos estudar *in vivo* como *in vitro* a resposta das vias aéreas à reapresentação do antígeno. Em modelos animais a sensibilização a um alérgeno específico leva ao desenvolvimento de processo inflamatório similar ao encontrado em pulmões de asmáticos.

Inicialmente, a resposta asmática tardia foi descrita e estudada em um modelo desenvolvido em coelhos por Champain *et al.* (1982). Os coelhos eram, a princípio, sensibilizados através de injeções intraperitoniais de soluções contendo proteínas isoladas de *Alternaria tenius*, em dois grupos de animais. No primeiro grupo a aplicação realizava-se 24 horas após o nascimento dos animais. Neste momento dava-se a produção preferencial do anticorpo IgE para o antígeno utilizado. No segundo grupo, a aplicação era efetuada 7 dias após o nascimento, levando à produção de IgE e IgG. Com a broncoprovocação dos dois grupos através da inalação do antígeno, observava-se que os coelhos que produziram preferencialmente apenas IgE desenvolviam obstrução precoce e tardia das vias aéreas. Os resultados obtidos sugeriram que imunoglobulinas IgE antígeno-específicas seriam necessárias para iniciar o processo de desenvolvimento da asma tardia induzida pelo antígeno e que, contrariamente, a IgG antígeno-específica não estaria associada ao processo asmático tardio (Behrens *et al.*, 1984).

Novo estudo foi realizado para elucidar a resposta asmática tardia. Ratos Brown Norway foram ativamente sensibilizados através de injeção subcutânea de ovalbumina e, conseqüentemente, submetidos ao desafio antigênico por inalações. Os sintomas detectados foram, em alguns aspectos, semelhante àqueles observados para pacientes humanos. Assim, no modelo utilizado, a resposta broncoconstrictora tardia ocorrera mesmo na ausência da reação de resposta anafilática imediata. Entretanto, o desenvolvimento da resposta tardia não estaria associada a alterações na reatividade das vias aéreas (Eidelman *et al.*, 1988). Ratos Wistar ativamente sensibilizados com ovalbumina também constituem um modelo animal utilizado na investigação do processo asmático (Bellofiore & Marin, 1988; Watanabe & Mishima, 1990). A provocação das vias aéreas com ovalbumina, nesta situação, leva claramente ao aparecimento das duas fases aguda e tardia (Lissen *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1993; Viana & Garcia Leme, 1995).

Estudos histopatológicos revelaram que a imunização de camundongos através do implante de um pequeno fragmento de ovo de galinha no tecido subcutâneo produzia

infiltração de eosinófilos ao nível peribrônquico, perivascular e intraepitelial do tecido pulmonar desses animais (Carvalho *et al.*, 1999).

Um modelo animal que vem sendo utilizado há alguns anos pelo seu mimetismo da asma humana, é o desenvolvido em cobaias (*Cavia porcellus*, também conhecido com porquinho da Índia), principalmente devido à semelhança existente entre cobais e os seres humanos no que diz respeito às respostas contráteis e relaxantes a várias substâncias, ao desenvolvimento de mediadores químicos similares em respostas induzidas por antígenos (Collier & James, 1967) e as alterações histopatológicas observadas ao nível dos pulmões após o desafio antigênico (Kallos & Kallos, 1984). O modelo de indução imunológica das vias aéreas pela administração do alérgeno é frequentemente utilizado em cobaias (Capaz *et al.*, 1993). Cobaias ativamente sensibilizadas apresentam reação anafilática que pode ser letal quando desafiadas com o antígeno específico. Esta reação foi descrita pela primeira vez em 1910 por Auer e Lewis e estava associada a uma grave broncoconstrição (Hutson, 1989).

No modelo com cobaias descrito por Wieslander *et al.* (1985), a resposta asmática tardia foi relativamente pequena quando comparada com a magnitude da resposta asmática precoce. Neste modelo, os animais foram sistematicamente sensibilizados com ovalbumina para produzirem anticorpos dos tipos IgE e IgG, e desafiados com instilação de ovalbumina associada a grânulos de sefarose. O lavado broncoalveolar dos animais revelou aumento no número de neutrófilos e eosinófilos. Utilizando o mesmo procedimento, Anderson *et al.*, (1988), revelaram importante correlação entre os níveis de IgE no soro e a obstrução bronquial observada durante a resposta asmática tardia e também com o número de eosinófilos presentes no lavado broncoalveolar. A desvantagem desse modelo consiste no fato de a resposta tardia ocorrer apenas em menos da metade dos animais estudados.

II- RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA



2 Relevância e Justificativa

Exercício físico é qualquer atividade física que mantém ou aumenta a aptidão física geral e tem o objetivo de alcançar a saúde e também a recreação (Stampfer *et al.*, 2000).

A razão da prática de exercícios inclui: o reforço da musculatura esquelética e do sistema cardiovascular, o aperfeiçoamento das habilidades atléticas, a perda de peso e/ou a manutenção de alguma parte do corpo. Para muitos médicos e especialistas, exercícios físicos realizados de forma regular ou freqüente estimulam o sistema imunológico, ajudam a evitar doenças, moderam o colesterol, ajudam a prevenir a obesidade. Ademais, melhoram a saúde mental e ajudam a inibir a depressão. Todo exercício físico deve ser sempre realizado sob a orientação de um profissional ou centro esportivo qualificado, pois a prática de esportes somente nos permite atingir os objetivos esperados quando devidamente orientado (Mendes, 2000).

A literatura relata poucos estudos relacionando os efeitos do exercício físico sob 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 realizados 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 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 tem por objetivos:

Geral:

Avaliar a contratilidade de traquéias isoladas de animais submetidos ao exercício leve de curto prazo, sensibilizados ou não com ovalbumina (modelo experimental de asma) e 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 animais asmáticos e não-asmáticos.

Específicos:

Verificar se a pré-adaptação ao exercício influencia na resposta do músculo liso traqueal;

Observar 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 animais em estudo.

IV- MATERIAIS E MÉTODOS



4 METODOLOGIA

O percurso metodológico que foi seguido neste estudo compreendeu o desenvolvimento de diversos protocolos, aqui descritos na forma de materiais e métodos utilizados nesta pesquisa.

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 4.1 se refere a todos os materiais utilizados para a realização dos experimentos.

Quadro 4.1- Principais materiais utilizados nos experimentos

Material	Marca / Modelo
- Nebulizador ultrassônico	RespiraMax, a 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 do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina desta mesma Universidade. Os animais foram divididos em grupos de 6 por gaiola, e mantidos por aproximadamente uma semana no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia em períodos reversos de claro/escuro de 12 horas para ambientação e aclimatização. Aos animais foram fornecidos 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 1 h 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 intraperitoneais 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;

Undem (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 1mg.ml⁻¹ e, em segundo lugar com 5 mg.ml⁻¹ por 15 minutos cada) ou o veículo só (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. (Silveira et al. 2002). 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 animais asmáticos foram submetidos à natação, como descrito abaixo.

Os ratos asmáticos foram submetidos aos seguintes procedimentos: Grupo 1 - ratos controle (sensibilizados e desafiados com solução salina – chamado Grupo controle não-asmático ou naive), Grupo 2 – ratos sensibilizados com OVA e desafiados com solução salina (Grupo sensibilizado – chamado Grupo sens.), Grupo 3- ratos asmáticos (sensibilizados e desafiados com OVA – grupo sensibilizado e desafiado –

chamado grupo S/D) e grupo 4 - ratos asmáticos treinados 1 h ao dia durante cinco dias antes do desafio com OVA (Grupo sensibilizado 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 4.2 – Resumo dos grupos experimentais

Atividade Grupo	Pré- treinamento (20 min, 30 min e 1 dia de repouso)	Treinamento 1h/dia	Treinamento antes do desafio antigênico com Ovalbumina	Animais Sem Treinamento
Grupo Treinado - (Grupo - T)		X		
Grupo Pré-treinado 1 (Grupo - PT1)	X	X		
Grupo Pré-treinado 5 (Grupo - PT5)	X	X (5 dias)		
Grupo Pré-treinado 10 (Grupo - PT10)	X	X (10 dias)		
Grupo sedentário (Grupo S)				X
Grupo Controle Não- Asmático (Grupo Naive)				X
Grupo Sensibilizado (Grupo Sens.)				X
Grupo Sensibilizado e Desafiado (Grupo S/D)				X
Grupo Sensibilizado e desafiado com exercício pré-desafio (Grupo -S/E pré- desafio)			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 4.1). 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.

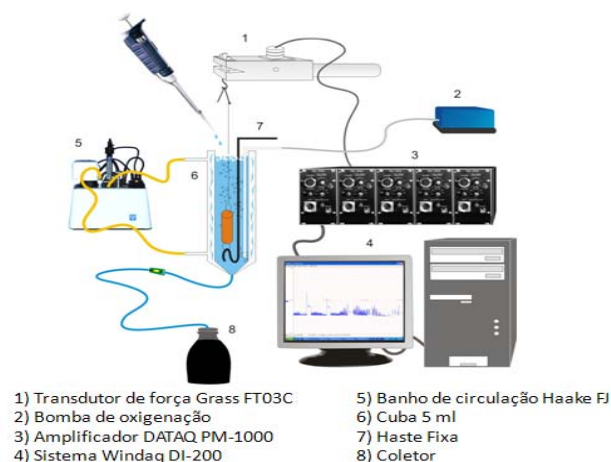


Figure 4.1. Sistema de cubas isoladas e capturação dos dados (Fonte: Figura adaptada de Jucá, 2007, p. 33)

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 (E_{max}) 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 Asmáticos ou Não-asmáticos Sedentários ou Submetidos aos Diferentes Tempos de Exercício

Anéis de traquéia com o epitélio íntegro obtidos de animais sedentários ou submetidos a diferentes tempos de exercícios asmáticos ou não asmáticos, conforme descritos no item 4.2.1 e 4.2.3 foram montados em câmaras para órgãos isolados conforme descrição no item 4.2.4. Para estudar as alterações do tônus basal 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 fisiológica 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 Asmáticos ou Não-asmáticos Sedentários ou Submetidos aos Diferentes Tempos de Exercício

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 4.2.1 e 4.2.3 foram montados em câmaras para órgãos isolados conforme descrição no item 4.2.4. Para estudar as alterações do tônus basal 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, indicando assim a recuperação do tecido.

4.5 Isolamento do Lavado Broncoalveolar (LBA)

Para investigar os efeitos do exercício no sistema respiratório, 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 centrifugada ($1000g \times 10$ minutos a $4^{\circ}C$) e o sobrenadante foi armazenado a $-20^{\circ}C$ 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 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 Determinação da Atividade da Enzima Acetilcolinesterase

4.5.2.1 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 absorvância, durante 3 minutos, sendo a reação linear durante pelo menos 10 minutos. As leituras das absorvâncias foram feitas em 412 nm. A atividade específica foi expressa em nmoles de ATC hidrolisado por miligrama de proteína por minuto.

4.5.2.2 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 500 μl do tampão, 895 μl de água destilada e 50 μl de ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB) 0,01M e a absorvância zerada. Após a absorvância ser deixada em zero, a cubeta foi retirada e acrescentado iodeto de acetiotiocolina 0,075M e a absorvância foi registrada por 3min em 412nm. A atividade da enzima foi calculada como modificações na absorvância 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 e onda de 412nm.

4.5.2.3 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: NA_2HPO_4 (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 μM

quantidade de tecido – determinação da proteína Lowry

volume final na cubeta – 1,5ml

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

4.5.3 Dosagem de Nitrito (Green et al., 1981)

4.5.3.1 Método

O reativo de Griess (N-1-naftiletilenodiamina 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 absorbância em 560nm.

4.5.3.2 Procedimento Experimental

Para a realização do ensaio foram usados 100 μL do reagente de Greiss e adicionados 100 μl 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 absorbância foi feita em 560nm em leitor de placa. As leituras da absorbância 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 .

4.5.3.3 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 NaNO_2 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).

4.5.4 Dosagem de Proteína (Método Lowry):

4.5.4.1 Método

A quantidade de proteína em homogenatos de cérebro 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-Ciocalteu 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.

4.5.4.2 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 - Ciocalteu - 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.

4.6 Análise Estatística

Os dados relativos à contração do músculo liso traqueal estão expressos como média \pm EPM de 6-8 experimentos. A significância foi determinada através da ANOVA *two-way*, seguido pelo teste de *Holm-Sidak* (usando Sigma Plot versão 11.0). Os dados das determinações bioquímicas em LBA são apresentados como média \pm EPM (6-8 animais) e comparadas por ANOVA seguida 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 da Resposta do K⁺ em Traquéias Isoladas de Ratos

A responsividade inicial do tecido traqueal foi avaliada por meio da obtenção de resposta contrátil ao K⁺. 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 (p= 0,06, teste de Mann-Whitney).

5.2 Efeito do Carbacol 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 pD₂ da curva do grupo sedentário foi de 6,84 [6,22 – 7,28] (n=6) (**Tabela 5.1**). A magnitude da contração dos anéis de traquéia, induzida pelo CCh nos animais sedentários alcançou 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 pD₂ foi de 7,06 [6,72 – 7,40], porém este valor não apresentou alteração significativa em relação ao grupo sedentário (pD₂: 6,84 [6,22 – 7,28]; n=6, p > 0,05, ANOVA *one way*) (**Tabela 5.1**).

A magnitude da contração dos anéis de traquéia, induzida pelo CCh nos animais treinados por 1 hora sem qualquer pré-treino alcançou o valor máximo (E_{max}) de $98,34 \pm 2,64$ % (n=6) da contração induzida por 60mM de K⁺ (**Figura 5.1**). Essa resposta máxima não apresentou diferenças estatísticas do grupo treinado 1h em relação ao grupo sedentário (p > 0,05, ANOVA *one way*).

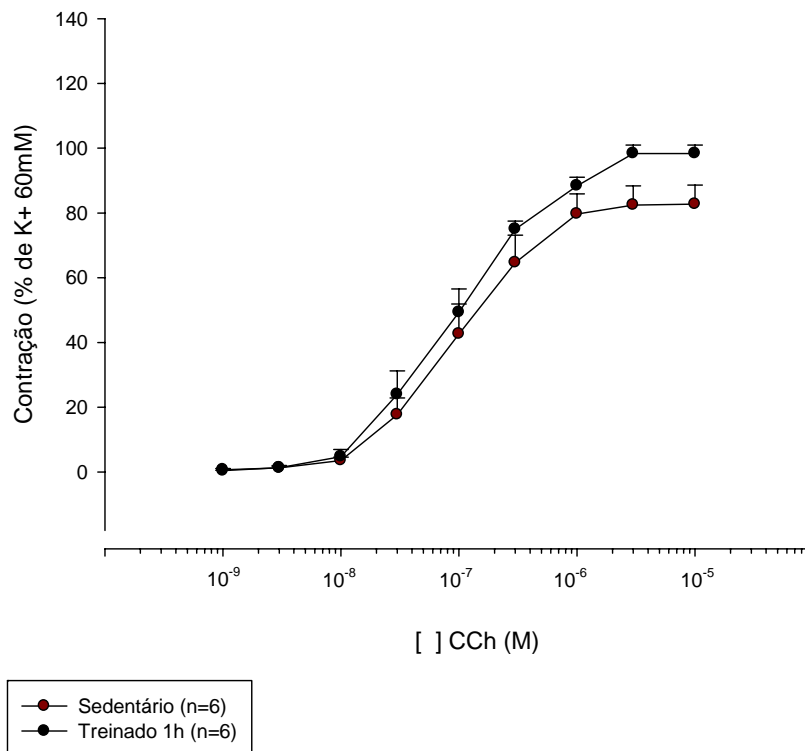


Figure 5.1 Análise do tecido muscular liso traqueal isolado de ratos em curva concentração-efeito induzida pelo CCh do grupo treinado 1 hora em relação ao grupo sedentário.

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 PT 1 ($n=6$), que apresentou pD_2 de 6,85 [6,64 – 7,08] (**Tabela 5.1**). 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 PT 1 alcançou o valor máximo (E_{max}) de $100,70 \pm 0,25$ % ($n=6$) da contração induzida por 60mM de K^+ (**Figura 5.2**). A resposta do grupo PT 1, 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).

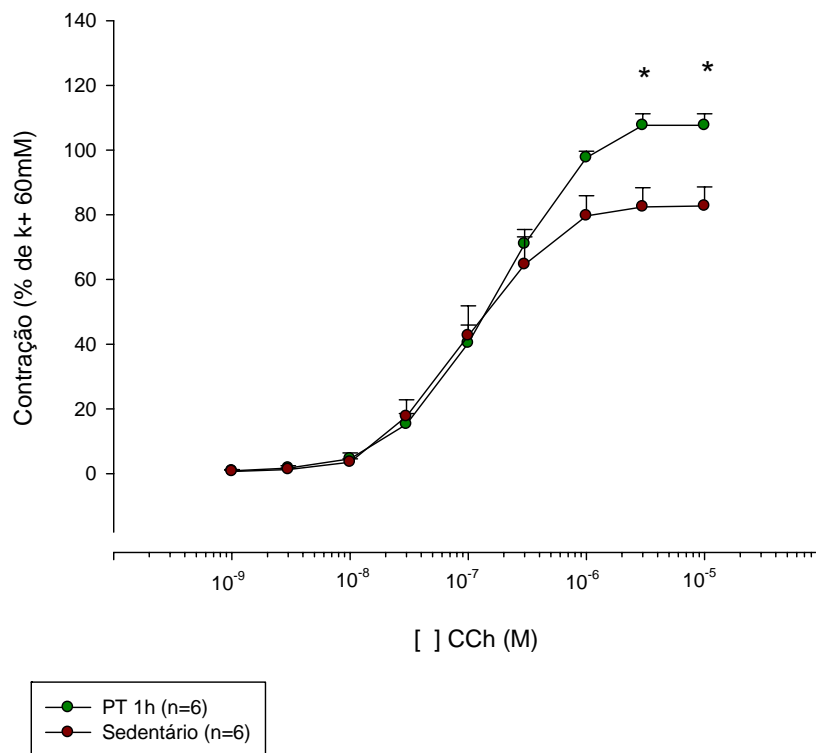


Figure 5.2 Análise do tecido muscular liso traqueal isolado de ratos em curva concentração-efeito induzida pelo CCh do grupo PT 1 em relação ao grupo sedentário.

Grupo sedentário, sem qualquer treinamento. Grupo PT 1, 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 PT 5 ($n=6$), que apresentou pD_2 dessa curva de 7,06 [6,91 – 7,22] (**Tabela 5.1**). 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 PT 5 alcançou o valor máximo (E_{max}) de $116,35 \pm 0,54$ % ($n=6$) da contração induzida por 60mM de K^+ (**Figura 5.3**). A resposta do grupo PT 5 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*).

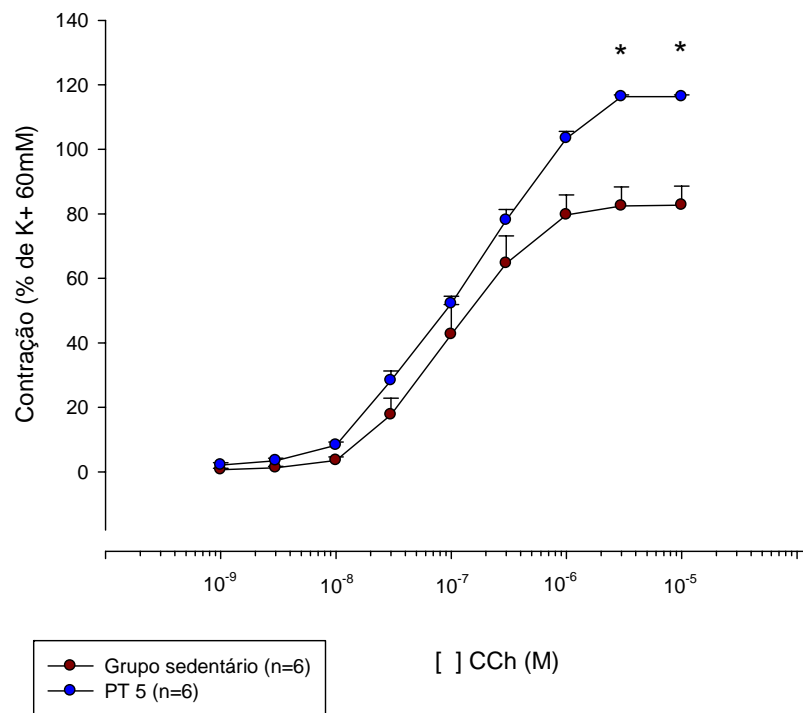


Figure 5.3 Análise do tecido muscular liso traqueal isolado de ratos em curva concentração-efeito induzida pelo CCh do grupo PT 5 em relação ao grupo sedentário.

Grupo sedentário, sem qualquer treinamento. Grupo PT 5, 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 o exercício no grupo PT 10 (n=6), que apresentou pD_2 dessa curva de 7,20 [6,67 – 7,51] (**Tabela 5.1**). 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 PT 10 alcançou o valor máximo (E_{max}) de $123,50 \pm 2,59$ % (n=6) da contração induzida por 60mM de K^+ (**Figura 5.4**). Em anéis isolados de traquéia, a resposta de animais do grupo PT 10 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*).

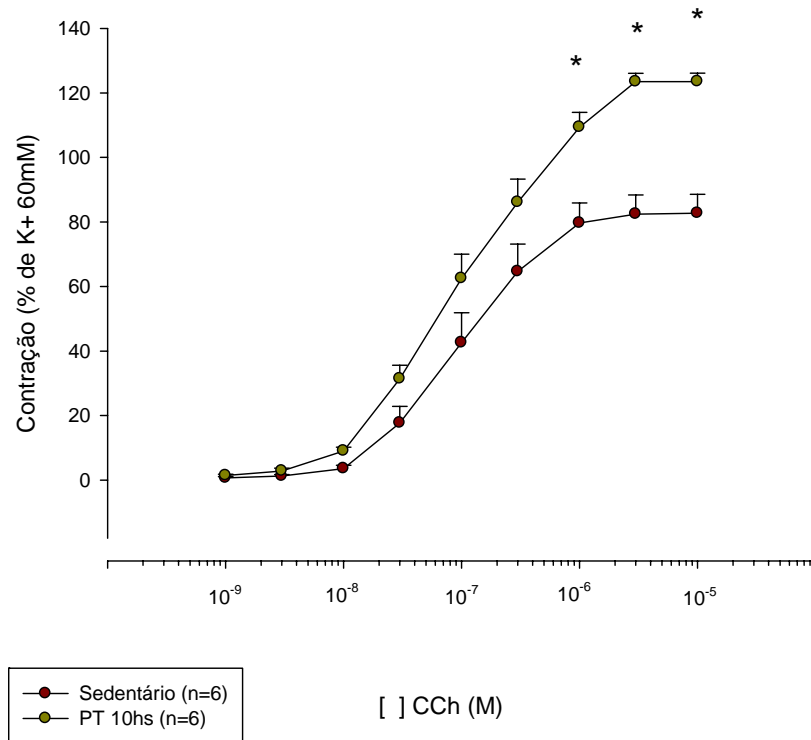


Figure 5.4 Análise do tecido muscular liso traqueal isolado de ratos em curva concentração-efeito induzida pelo CCh do grupo PT 10 em relação ao grupo sedentário.

Grupo sedentário, sem qualquer treinamento. Grupo PT 10 horas, 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.

Table 5.1 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
PT 1	6,85 [6,64 – 7,08] (6)	107,62 ± 3,57 ^b
PT 5	7,06 [6,91 – 7,22] ^a (6)	116,35 ± 0,54 ^b
PT 10	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 da concentração máxima (EC50), em mol/l;

E_{max} : valores da contração 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*; ^b $p < 0,05$ em relação ao grupo sedentário, ANOVA *two way*, *Holm Sidak*.

5.3 Efeitos do 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} a $1,2 \times 10^{-1}$ M) promovendo contração concentração-dependente. O pD_2 da curva do grupo sedentário foi de 1,38 [1,17 – 1,56] (n=6) (**Tabela 5.2**). A magnitude da contração dos anéis de traquéia, induzida pelo K^+ nos animais sedentários alcançou o valor máximo (E_{max}) de $90,45 \pm 2,22$ % (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 5.2**).

A magnitude da contração dos anéis de traquéia, induzida por K^+ nos animais treinados 1 hora sem qualquer pré-treino alcançou o valor máximo (E_{max}) de $98,89 \pm 1,12$ % (n=6) da contração induzida por 60mM de K^+ (**Figura 5.5**). Essa resposta máxima não apresentou diferença estatística do grupo treinado 1h em relação ao grupo sedentário ($p > 0,05$, ANOVA *one way*).

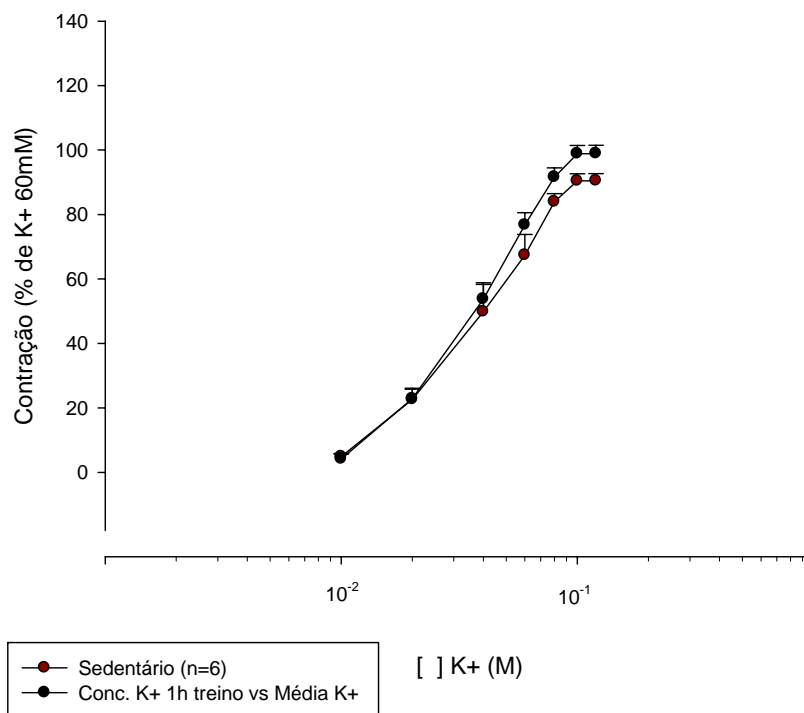


Figure 5.5 Análise do tecido muscular liso traqueal isolado de ratos em curva concentração-efeito induzida pelo K^+ do grupo treinado 1 hora em relação ao grupo sedentário.

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 PT 1 (n=6), que apresentou pD_2 de 1,46 [1,40 – 1,54] (**Tabela 5.2**). 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 PT 1 alcançou o valor máximo (E_{max}) de $105,19 \pm 1,22$ % (n=6) da contração induzida por 60mM de K^+ (**Figura 5.6**). A resposta do grupo PT 1, nas concentrações de 8×10^{-2} a $1,2 \times 10^{-1}$ M de K^+ , foi significativamente maior que a do grupo sedentário ($p < 0,05$, ANOVA *two way*, *Holm-Sidak*, n=6).

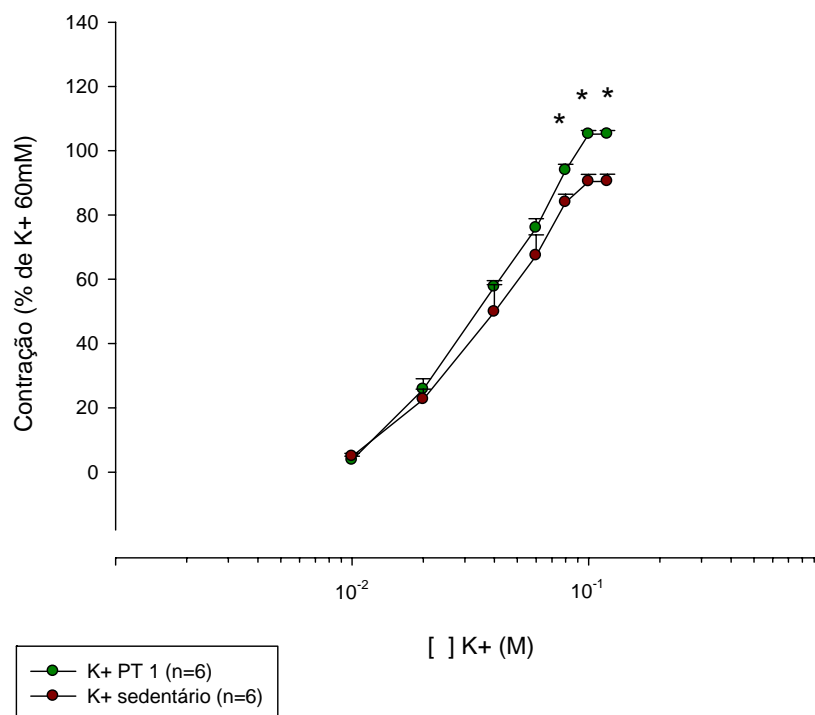


Figure 5.6 Análise do tecido muscular liso traqueal isolado de ratos em curva concentração-efeito induzida pelo K^+ do grupo PT 1 em relação ao grupo sedentário.

Grupo sedentário sem nenhum treinamento. Grupo PT 1, pré-treinado e treinado 1 hora por 1 dia. Dados expressos em média \pm E.P.M., * $p < 0,05$ em relação ao sedentário, ANOVA *two way*, *Holm Sidak*.

O exercício foi avaliado em animais do grupo PT 5 (n=6), que apresentou pD_2 de 1,48 [1,37-1,57] (**Tabela 5.2**). Valor esse que não apresentou diferenças estatísticas em relação ao pD_2 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 PT 5 alcançou o valor máximo (E_{max}) de $112,02 \pm 1,44 \%$ ($n=6$) da contração induzida por 60mM de K^+ (**Figura 5.7**). A resposta do grupo PT 5, nas concentrações de 8×10^{-2} à $1,2 \times 10^{-1} M$ de K^+ , foi significativamente maior que a do grupo sedentário ($p < 0,05$, ANOVA *two way*, *Holm-Sidak*, $n=6$).

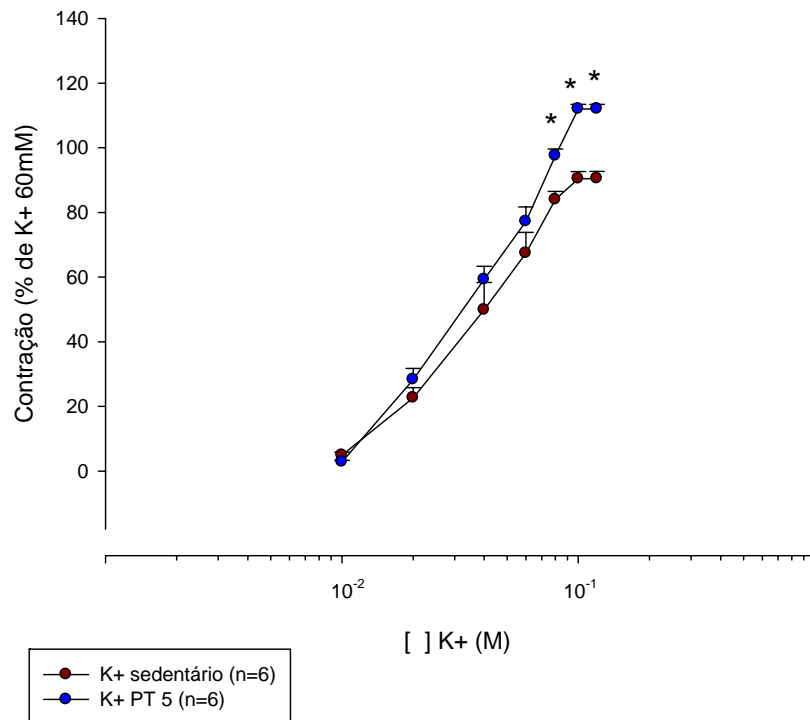


Figure 5.7 Análise do tecido muscular liso traqueal isolado de ratos em curva concentração-efeito induzida pelo K^+ do grupo PT 5 em relação ao grupo sedentário.

Grupo sedentário sem nenhum treinamento. Grupo PT 5 pré-treinado e treinado 1 hora por 5 dias. Dados expressos em média \pm E.P.M., * $p < 0,05$ em relação ao sedentário, ANOVA *two way*, *Holm Sidak*.

O presente trabalho analisou a resposta do exercício no grupo PT 10 ($n=6$), que apresentou pD_2 de 1,43 [1,38 – 1,52] (**Tabela 5.2**). Valor esse não diferente em relação ao pD_2 do grupo sedentário ($p > 0,05$, ANOVA *one way*).

A magnitude da contração traqueal induzida pelo K^+ alcançou o valor máximo (E_{max}) de $119,56 \pm 0,95$ ($n=6$) da contração induzida por 60mM de K^+ (**Figura 5.8**). A resposta do grupo PT 10 apresentou significância estatística, nas concentrações de 6×10^{-2} a $1,2 \times 10^{-1} M$ de K^+ , em relação ao grupo sedentário ($p < 0,05$, ANOVA *two way*, *Holm-Sidak*).

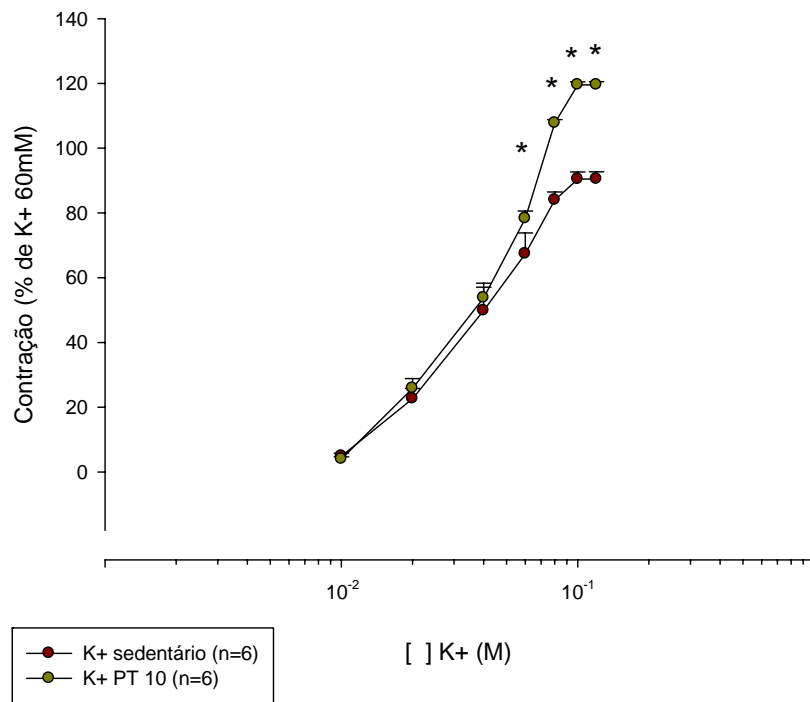


Figure 5.8 Análise do tecido muscular liso traqueal isolado de ratos em curva concentração-efeito induzida pelo K+ do grupo PT 10 em relação ao grupo sedentário.

Grupo sedentário, sem qualquer treinamento. Grupo PT 10, 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.

Table 5.2 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
PT 1	1,46 [1,40 – 1,54] (6)	105,19 ± 1,12 ^a
PT 5	1,48 [1,37 – 1,57] (6)	112,02 ± 1,44 ^a
PT 10	1,43 [1,38 – 1,52] (6)	119,56 ± 0,95 ^a

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

E_{max} : valores da contração 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 do Exercício nas Curvas Concentração-efeito do Carbacol em Traquéias Isoladas de Ratos Sensibilizados e/ou Desafiados ao Antígeno Sensibilizante*

Curva concentração-efeito foi construída para CCh (10^{-9} a 10^{-5} M) em anéis de traquéia isolada dos animais naive, sensibilizados e desafiados com OVA sem exercício. O pD_2 na curva do grupo naive foi de 6,84 [6,22 – 7,28] e a resposta máxima deste mesmo grupo foi de $82,69 \pm 5,90$ %; já no grupo sensibilizado, o pD_2 foi de 6,80 [6,05 – 7,29], e a resposta máxima desse grupo sensibilizado foi de $80,66 \pm 5,86$ %. Esses valores apresentaram ausência de significância verificada 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 em relação aos demais grupos em estudo.

O valor do pD_2 na curva para o grupo S/D foi de 7,02 [6,50 – 7,43]. Esse valor não evidenciaram diferenças significativas em relação aos grupos naive (pD_2 : 6,84 [6,22-7,28]) e sensibilizado (pD_2 : 6,80 [6,05 – 7,29]), ($n=6$) (**Tabela 5.3**).

A magnitude da contração induzida no grupo S/D alcançou o valor máximo (E_{max}) de $91,86 \pm 4,16$ %. A resposta do grupo S/D foi significativamente maior, nas concentrações de 3×10^{-6} e 1×10^{-5} do CCh, em relação aos grupos *naive* (E_{max} : $82,69 \pm 5,90$ %) e sensibilizado (E_{max} : $80,66 \pm 5,86$ %) ($p < 0,05$, ANOVA *two way*, *Holm-Sidak*) (**Figura 5.9 e Tabela 5.3**).

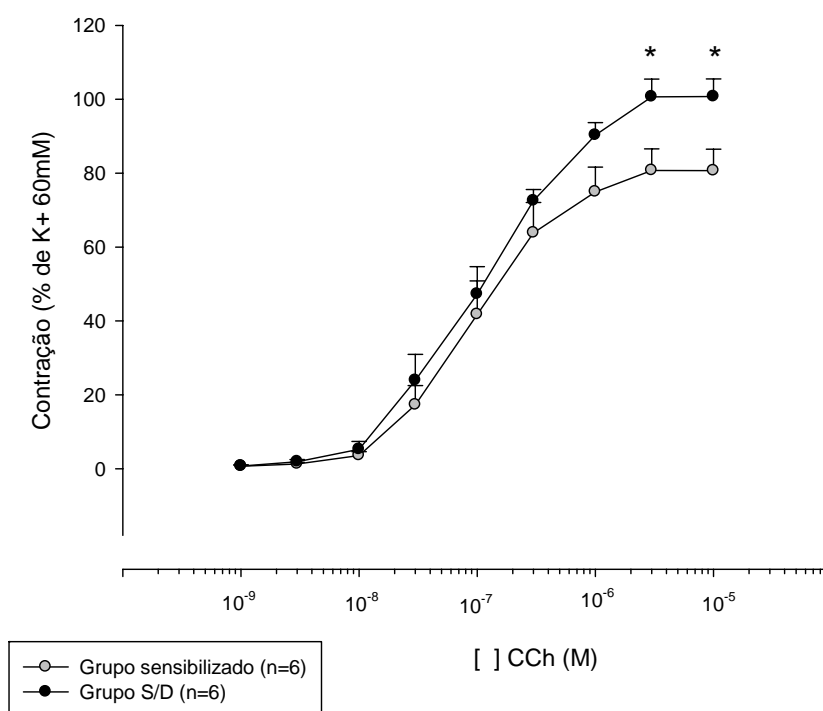


Figure 5.9 Análise do tecido muscular liso em curva concentração-efeito induzida pelo CCh em traquéias isoladas de ratos sensibilizados e/ou desafiados com OVA ou solução salina.

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 ao exercício foi avaliada em animais do grupo S/E pré-desafio antigênico (n=6), cujo pD_2 foi de 6,91 [6,33 - 7,43] (**Tabela 5.3**). Valor esse não diferente em relação ao pD_2 do grupo sensibilizado (6,84 [6,22 - 7,28]) 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 o valor máximo (E_{max}) de $109,09 \pm 3,68$ % (n=6) em relação à contração induzida por 60mM de K^+ (**Figura 5.10**). 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 ($E_{max} 80,66 \pm 5,86$ %) e S/D ($E_{max} 91,86 \pm 4,16$ %, $p < 0,05$, *Holm-Sidak*, n=6).

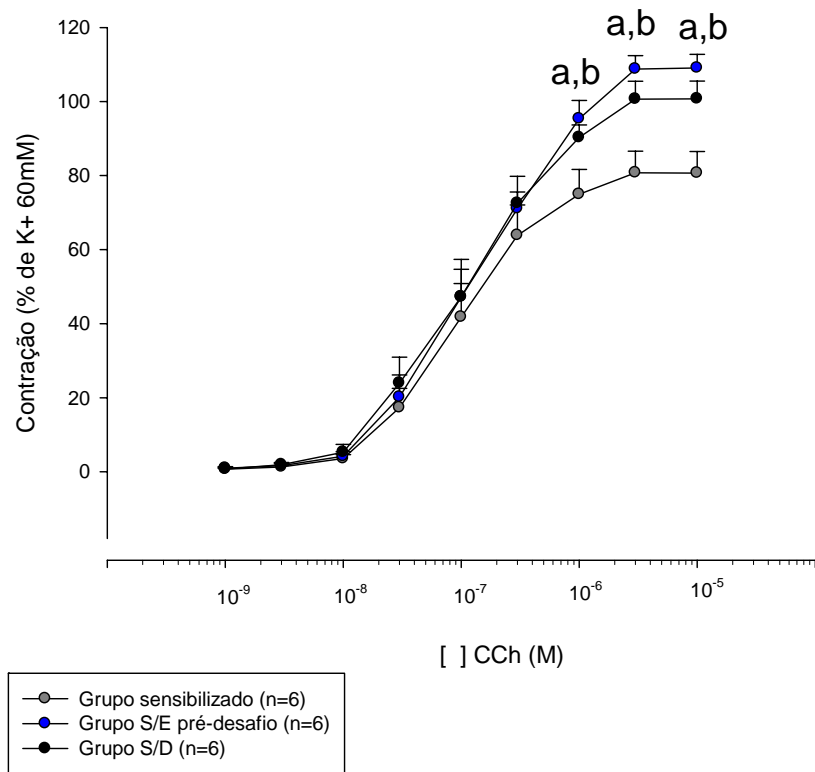


Figure 5.10 Análise do tecido muscular liso em curva concentração-efeito induzida pelo CCh do grupo S/E pré-desafio em relação aos grupos naive e S/D.

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.

Table 5.3 Potência (pD₂) e valores de Emax das curvas concentração-efeito induzidas por carbacol em traquéias obtidas de ratos sensibilizados com salina ou OVA e/ou desafiados com salina ou OVA, submetidos ou não a treinamento.

CCh	pD ₂ (n)	Emax
Naive	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)	91,86 ± 4,16 ^c
S/E pré-desafio	7,02 [6,50 – 7,43] (6)	109,09 ± 3,68 ^{a,b}

pD₂: expressa os valores do logaritmo negativo de 50% do efeito da concentração máxima (EC50), em mol/l;

Emax: valores de contração 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 Exercício nas Curvas Concentração-efeito do Potássio em Traquéias Isoladas de Ratos Sensibilizados e/ou Desafiados ao Antígeno Sensibilizante

Curva concentração-efeito foi construída para o K⁺ (10⁻³ a 1,2x10⁻² M) em anéis de traquéia isolada dos animais naive, sensibilizados e desafiados com OVA sem exercício.

O pD₂ do grupo naive 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 [1,29-1,50], e a resposta máxima foi de 91,68 ± 2,99 %. Esses valores apresentaram ausência de significância verificada tanto na potência quanto na Emax, respectivamente (n=6, p > 0,05, ANOVA one way) Tabela 5.3). Daqui em diante, o grupo sensibilizado será utilizado como controle em relação aos demais grupos em estudo.

O valor do pD_2 na curva para o grupo S/D foi de 1,42 [1,29 – 1,52]. Esse valor não evidenciou diferenças significativas em relação aos grupos naive (pD_2 : 1,38 [1,20 – 1,54]) e sensibilizado (pD_2 : 1,40 [1,29 – 1,50]), $n=6$ (Tabela 5.4).

A magnitude da contração induzida no grupo S/D alcançou 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 aos grupos naive (E_{max} : $93,11 \pm 3,58$ %) e sensibilizado (E_{max} : $91,68 \pm 2,99$ %) ($n=6$, $p < 0,05$, ANOVA *two way*, *Holm-Sidak*) (Figura 5.11) (Tabela 5.4).

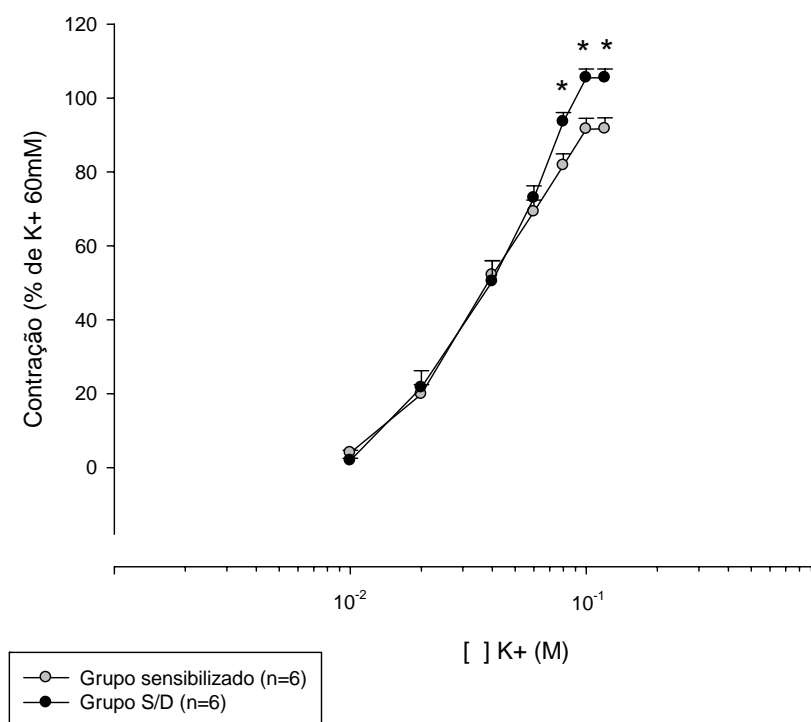


Figure 5.11 Análise do tecido muscular liso em curva concentração-efeito induzida por K^+ em traquéias isoladas de ratos sensibilizados e/ou desafiados com OVA ou solução salina.

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 S/E pré-desafio antigênico ($n=6$), que apresentou pD_2 de 1,38 [1,34 – 1,42] (Tabela 5.4). Valor esse não diferente em relação ao pD_2 do grupo naive (1,38 [1,20 – 1,54]) 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 o valor máximo (E_{max}) de $115,05 \pm 1,96$ % ($n=6$) da contração induzida por 60mM de K^+ (Figura 5.10). 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 ($E_{max} 93,11 \pm 3,58 \%$) e S/D ($E_{max} 105,50 \pm 2,37 \%$, $p < 0,05$, ANOVA, *Holm-Sidak*, $n=6$).

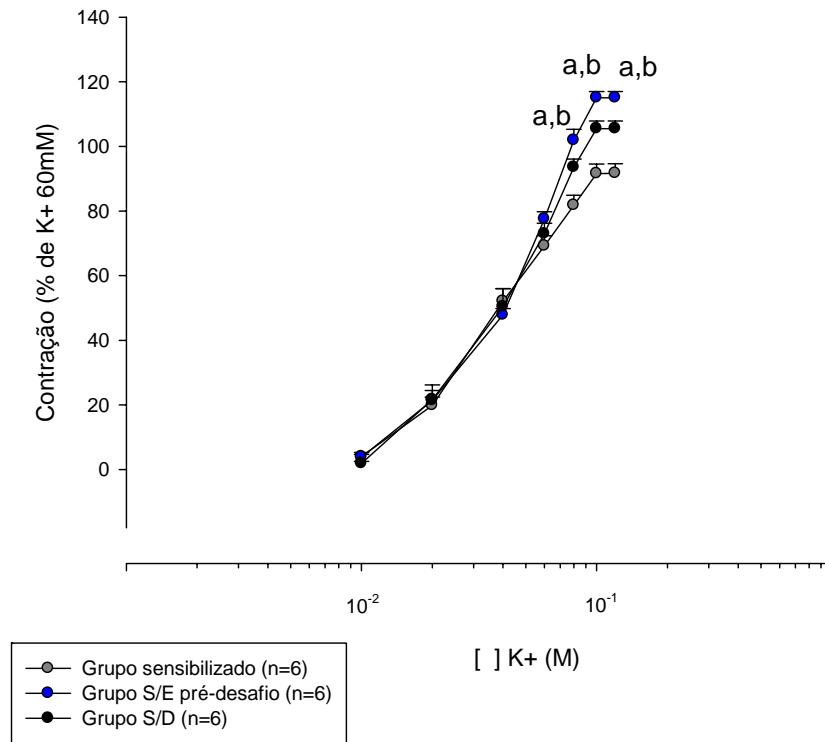


Figure 5.12 Análise do tecido muscular liso em curva concentração-efeito induzida pelo K^+ do grupo S/E pré-desafio em relação aos grupos naive e S/D.

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.

Table 5.4 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}
Naive	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 da concentração máxima (EC50), em mol/l;

E_{max} : valores da contração expressos 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

5.6 Análise dos Efeitos do 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 PT 1 mostrou valor médio de $5,07 \pm 1,18 \mu M$. O grupo PT 5 apresentou resultado médio de $2,02 \pm 0,72 \mu M$. E, no grupo PT 10, os valores médios foram de $6,55 \pm 0,43 \mu M$.

O grupo PT 5 apresentou valores médios de nitrito significativamente menor que os grupos sedentário e treinado, $p < 0,05$, ANOVA *one way* (**Figura 5.13**).

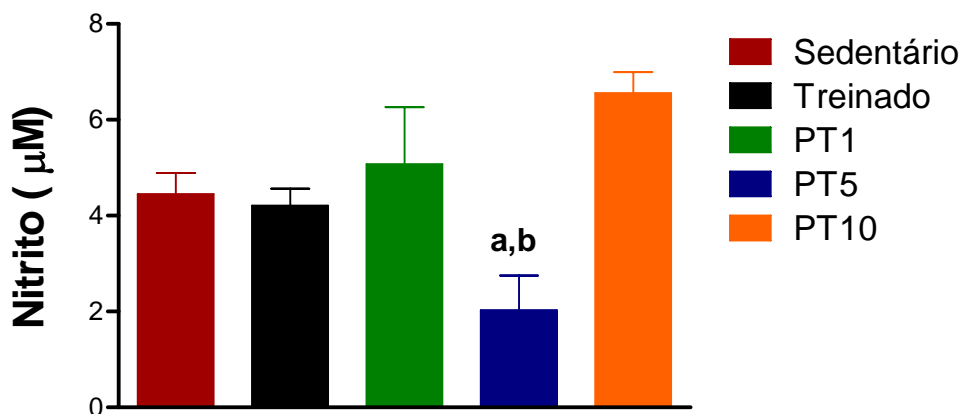


Figure 5.13 Análise comparativa dos valores de nitrito em lavado broncoalveolar de ratos, submetidos ou não a treinamento (valores expressos em μM).

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.

5.7 Análise dos Efeitos do 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 *naive*, 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 S/D apresentou valor médio de $5,60 \pm 0,54 \mu\text{M}$, sendo esta diminuição significativa em relação ao grupo *naive*. O grupo S/E pré-desafio, apresentou resultados de $7,00 \pm 0,43 \mu\text{M}$, sendo também significativo em relação ao grupo *naive*, $p < 0,05$, ANOVA *one way*. (Figura 5.14).

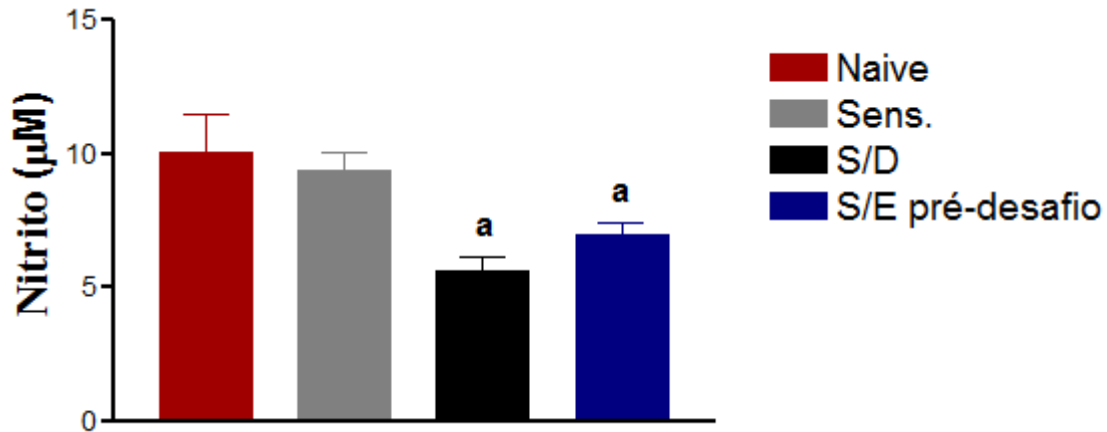


Figure 5.14 Análise comparativa dos valores de nitrito em lavado broncoalveolar de ratos naive e do grupo sensibilizado e/ou desafiado com OVA ou solução salina, treinados ou não (valores expressos em μM).

Dados são expressos em média \pm E.P.M., ^a $p < 0,05$, significativo em relação ao grupo naive, ANOVA *one way*.

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 PT 1, esses valores foram de $0,12 \pm 0,02$ de absorbância sendo estatisticamente significativo em relação ao grupo sedentário. No grupo PT 5 e PT10 esses valores foram de $0,13 \pm 0,40$ e $0,1070 \pm 0,0126$ de absorbância, respectivamente, sendo significativos em relação ao sedentário (Figura 5.15).

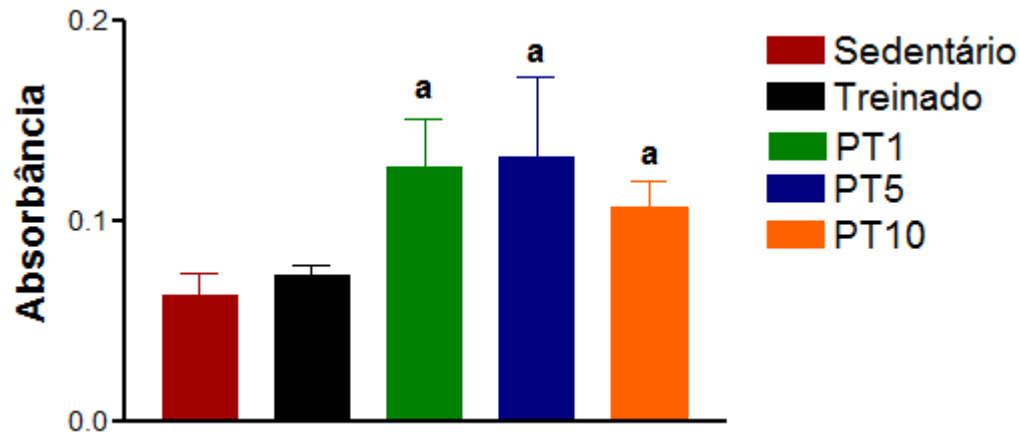


Figure 5.15 Análise comparativa dos valores da peroxidação lipídica em lavado broncoalveolar de ratos, submetidos ou não a treinamento (valores expressos em absorbância).

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

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 *naive*, o valor médio da absorbância na peroxidação lipídica foi de $0,071 \pm 0,01$. No grupo sensibilizado, esse valor foi de $0,1017 \pm 0,01$. Já no grupo S/D, esse valor foi de $0,165 \pm 0,05$ de absorbância. O grupo S/E pré-desafio apresentou valor de $0,139 \pm 0,02$ de absorbância. Os grupos S/D e S/E pré-desafiado foram, portanto, significantes em relação ao grupo *naive*, $p < 0,05$, ANOVA *one way*. (Figura 5.16).

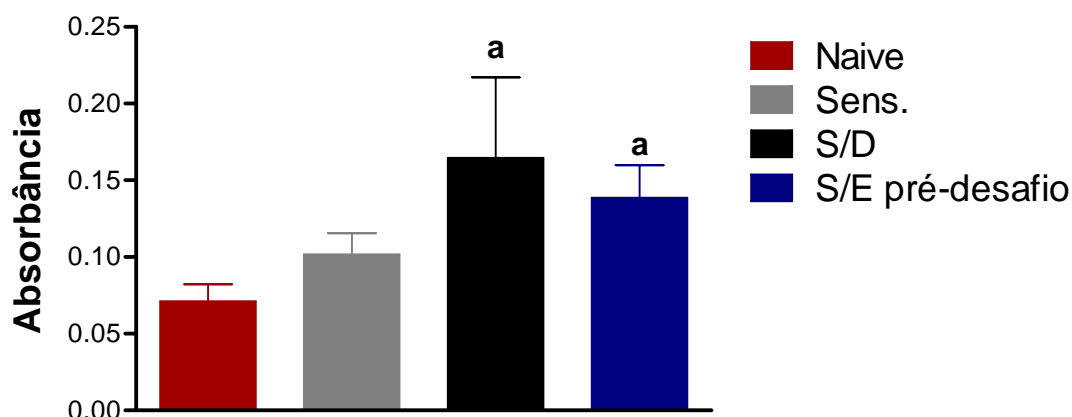


Figure 5.16 Análise comparativa dos valores da peroxidação lipídica em lavado broncoalveolar de ratos naive e do grupo sensibilizado e/ou desafiado com OVA ou solução salina, treinados ou não (valores expressos em absorbância).

Dados expressos em média \pm E.P.M., a $p < 0,05$, significativo em relação ao grupo naive, ANOVA one way.

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 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 5.17**).

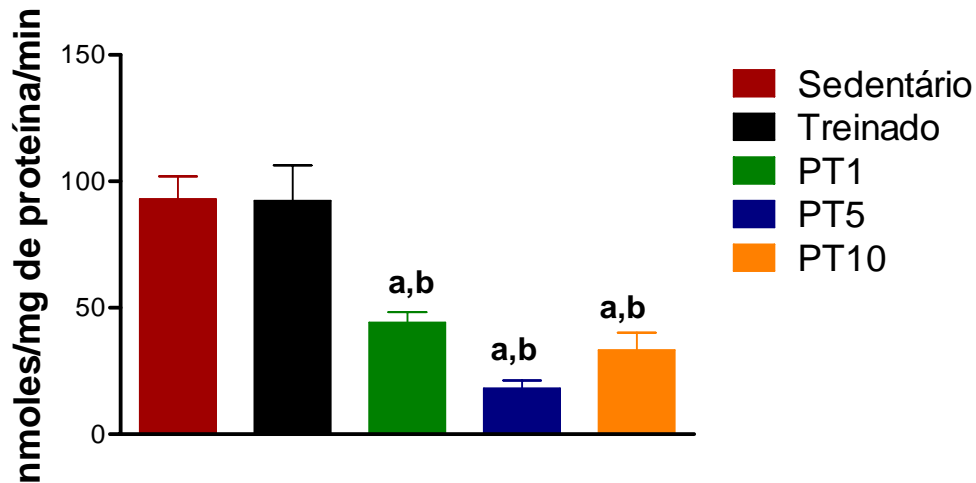


Figure 5.17 Análise comparativa dos valores da acetilcolinesterase em lavado broncoalveolar de ratos submetidos ou não a treinamento (valores expressos em nmoles/mg de proteína/min. Dados expressos em média \pm E.P.M., ^{a,b} $p < 0,05$, a- significativo em relação ao grupo sedentário, b- significativo em relação ao grupo treinado, ANOVA *one way*.

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 naive, 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 S/D e S/E pré-desafio ocorreu redução significativa da atividade desta enzima para $49,3 \pm 7,86$ e $57,8 \pm 5,5$ nmoles/mg de proteína/min, respectivamente (**Figura 5.18**).

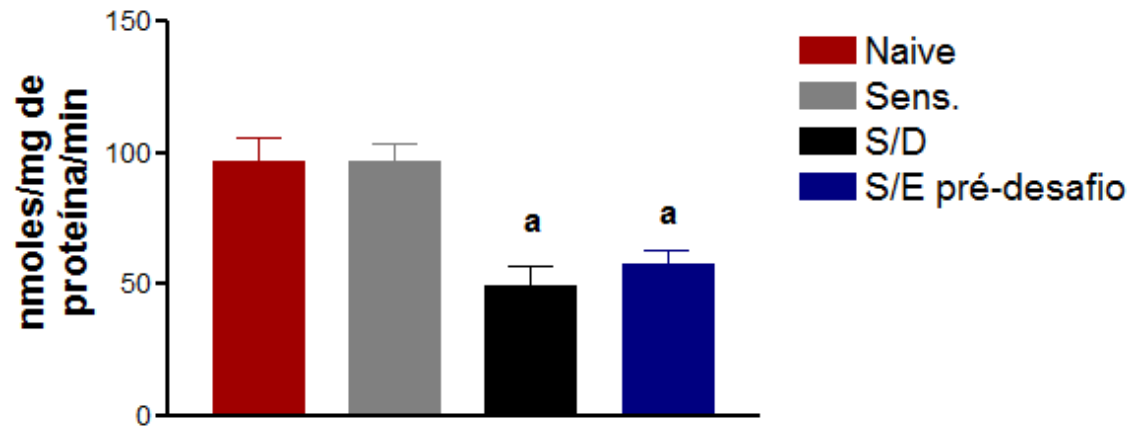


Figure 5.18 Análise comparativa dos valores da acetilcolinesterase em lavado broncoalveolar de ratos *naive* e do grupo sensibilizado e/ou desafiado com OVA ou solução salina, treinados ou na (valores expressos em nmoles/mg de proteína/min).

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

VI-DISCUSSÃO

6 Discussão

Neste trabalho, utilizou-se diferentes metodologias para a análise das respostas de alterações no sistema respiratório (músculo liso) desencadeadas pelo exercício leve a curto prazo em animais saudáveis e naqueles submetidos ao desafio antigênico, ou seja, em animais asmáticos, considerando-se que 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). O protocolo de exercícios desenvolvido neste estudo é considerado leve, pois não foram acoplados pesos ao corpo dos animais.

Nos estudos abordando a atividade contrátil do músculo liso traqueal *in vitro* aqui apresentados, verificou-se vários efeitos do exercício, segundo cada protocolo estabelecido, identificando-se que: 1 - em animais treinados durante 1 hora, o exercício promove a contração, embora sem significância estatística, da musculatura lisa traqueal isolada de ratos, mantida sob tônus basal, em relação ao grupo sedentário, para carbacol e potássio; 2- em animais pré-treinados, com exercício por 1 h (PT1), o exercício promove uma contração significativa da musculatura lisa traqueal isolada de ratos, mantida sob tônus basal, em relação ao grupo sedentário, para carbacol e potássio; 3 - em animais pré-treinados durante 5 horas (PT5), o exercício promove a contração ainda mais intensa (apresentando maior resposta máxima), da musculatura lisa traqueal de ratos, mantida sob tônus basal, em relação ao grupo sedentário, especialmente nas maiores concentrações, para ambos os agentes contráteis testados; 4 - em animais pré-treinados durante 10 horas (PT10), o exercício promove a contração em maior intensidade da musculatura lisa traqueal isolada de ratos, mantida sob tônus basal, em relação ao grupo sedentário, para ambos os agentes contráteis testados.

A contração dos anéis isolados da traquéia dos animais do grupo treinado 1 hora, pode ser explicada pelo fato de que, além de submetidos a um agente contrátil que é o exercício, embora a muito curto prazo, estes animais apresentam um comportamento ansiogênico, frente a um novo ambiente. Para evitar este componente ansiogênico resolvemos utilizar animais pré-treinados por 3 momentos antes do exercício propriamente dito. A contração observada nos grupos pré-treinados, pode ser explicada pelo fato de o exercício em si ser considerado um agente contrátil. Apesar dos tempos de exercício variarem em 1, 5 e 10 dias de treinamento, não ocorreu uma adaptação

temporal a este, visto que a resposta máxima do tecido foi aumentando com o aumento do tempo de realização do exercício pelos animais.

Shibata et al. (1995), mostraram que carbacol, norepinefrina e hipocapnia estimulam o turnover de fosfatidilinositol no músculo liso das vias aéreas, o que pode causar broncoconstrição, e que a hipocapnia também aumenta o *turnover* de fosfoinositol induzido por norepinefrina e carbacol no músculo liso das vias aéreas, o que pode causar piora da asma induzida por exercício e asma vagotônica, respectivamente.

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.

Estudo recente sugere que a BIE é freqüente em nadadores. Kippelen et al. (2005), mostram que a ativação dos mastócitos com liberação de mediadores broncoconstritores seguiu a 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 ocorrer.

A contração do músculo liso traqueal foi acompanhada por uma queda significativa nos níveis de nitrito nos animais PT5, aumento dos níveis de TBARS nos animais PT1, PT5 e PT10, bem como redução da atividade da AChE nos mesmos animais. Estes resultados mostram uma possível participação destes mediadores neste mecanismo contrátil.

É provável que o NO esteja envolvido nas adaptações ao exercício nesta condição específica. Várias pesquisas afirmam que o exercício físico está associado à estimulação de NO (Higashi, Yoshizumi, 2004; Jungersten et al., 1997; Croix et al., 1999). O óxido nítrico é uma molécula importante para o controle metabólico durante o exercício, pois uma deficiência na sua produção, particularmente pelo sistema vascular endotelial, contribui para as limitações no treinamento físico associadas às doenças cardiovasculares (Kingwell, 2000).

O exercício físico é uma condição que exerce influência sobre o balanço entre ataque oxidativo e os mecanismos de defesa antioxidante. O estresse oxidativo ocorre quando há um significativo aumento na produção de radicais livres ocasionando danos celulares- define-se como uma sobrecarga de espécies reativas de oxigênio que causam

prejuízos à estrutura da biomolécula de DNA, carboidratos, lipídios, proteínas, além de outros componentes celulares. Durante os exercícios físicos, ocorrem várias reações químicas que levam à formação de espécies reativas do oxigênio (ROS). Para proteger os tecidos contra os danos causados pelas ROS produzidos durante o exercício físico as enzimas antioxidantes como SOD, catalase e GPX/GR parecem responder de maneira adaptativa, elevando suas atividades nos tecidos e órgãos de indivíduos treinados. Isso ocorre principalmente em treinamentos do tipo de endurance (Silveira, 2001).

Parte do oxigênio utilizado na respiração é transformada em espécies reativas de oxigênio (EROs) (URSO; CLARKSON, 2003). A alta produção dessas espécies é responsável por várias ações deletérias em nosso organismo, e há evidências de que a produção de EROs está aumentada, como resultado do exercício físico intenso (VANCINI et al., 2005). Escape ou colisão de elétrons na cadeia mitocondrial, possibilidade de ocorrência de isquemia-reperfusão e auto-oxidação de catecolaminas são algumas vias de formação de espécies reativas induzidas pelo exercício (PARKER, 1997; MASTALOUDIS et al., 2001; URSO; CLARKSON, 2003; RAMEL et al., 2004; McANULTY et al., 2005). Considera-se que algumas das defesas antioxidantes se adequam ao treinamento (GARCIA; DAOUD, 2002). Entretanto, a concentração normal de EROs não é determinada, nem as doses de antioxidantes necessárias para manter um nível de oxidantes endógenos adequados nos processos fisiológicos normais, como no envelhecimento, na inflamação e em infecções. Quando um estímulo, como o exercício físico, provoca a produção elevada de EROs ou a diminuição do sistema de defesa, ocorre desequilíbrio entre a produção e a remoção destas (DROGE, 2002; URSO; CLARKSON, 2003). Essa situação é responsável por várias ações deletérias em nosso organismo, como peroxidação de lipídeos, carbonilação de proteínas e até danos ao DNA da célula (ZOPPI et al., 2003), ou seja, causa danos moleculares às estruturas celulares, com conseqüente alteração funcional e prejuízo das funções vitais em diversos tecidos e órgãos. Seu efeito deletério varia de um indivíduo para outro, de acordo com a idade, o estado fisiológico e a dieta (NIESS et al., 1999). Quando se pratica atividade física, uma maior demanda de energia é imposta e fatores como intensidade e duração do exercício, bem como aptidão do participante, determinam as contribuições relativas dos vários compartimentos corporais para a transferência de energia no exercício (LOTUFO et al., 1996). A indução da produção de EROs pelo exercício está classificada como sendo uma fonte exógena de estímulo (PARKER, 1997) e existem diversos caminhos de produção durante o exercício. Essas vias podem

ser: - por meio de escape ou colisão de elétrons na cadeia mitocondrial: considerando que durante o exercício o consumo total de O₂ aumenta de 10 a 20 vezes (RAMEL et al., 2004), que o nível de fluxo sanguíneo no músculo é cerca de 10 vezes maior e que 2 a 5% do O₂ utilizado pela mitocôndria é convertido em EROs (PARKER, 1997; URSO; CLARKSON, 2003), é razoável supor que a produção mitocondrial de O₂ - se encontre igualmente aumentada. Há muitas controvérsias no tocante ao fato de o estresse oxidativo causar danos ao organismo pelo exercício. Pesquisas têm variado na intensidade, na duração e no modelo de atividade escolhida para o estudo. Além disso, variações no nível de aptidão dos sujeitos e análises utilizadas para avaliar os danos oxidativos têm contribuído para achados inconsistentes. Hipoteticamente, a grande proporção do fluxo de elétrons na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial causada pelo aumento no consumo de O₂ durante o exercício aeróbico pode aumentar a produção de EROs (MASTALLOUDIS et al., 2001). Durante o exercício, o fluxo sanguíneo é restrito em diversos órgãos e tecidos, a fim de aumentar o aporte para os músculos ativos. Assim, as regiões privadas temporariamente do fluxo entram num estado de hipóxia, que é maior quanto mais intenso o exercício e quando se supera a capacidade aeróbia máxima (VO₂ max). Inclusive, o próprio músculo ativo entra em estado de hipóxia por insuficiência do aporte energético. Ao finalizar a atividade intensa, todas as áreas afetadas são reoxigenadas, compreendendo o fenômeno de isquemia-reperusão, com a conhecida produção de EROs (PARKER, 1997; RAMEL et al., 2004). As células endoteliais reoxigenadas são potenciais geradores de O₂ - e OH, e a enzima xantina oxidase parece ser uma importante fonte de geração de espécies reativas (ZWEIER et al., 1988; SILVA, 2003); também ocorre a auto-oxidação de catecolaminas, cujos níveis aumentam durante o esforço (PARKER, 1997; URSO; CLARKSON, 2003; MCANULTY ET al., 2005). Além dessas, há outras fontes secundárias, como, por exemplo, a liberação de macrófagos pelo sistema imunológico para reparo de tecidos danificados (MASTALLOUDIS et al., 2004). O organismo adulto é mais suscetível ao estresse oxidativo durante o exercício por causa de mudanças ultra-estruturais e bioquímicas relacionadas à idade, que facilitam a formação de EROS (JI, 2001). Ratos mais velhos demonstraram aumento nos produtos oxidantes, comparados aos ratos jovens, diante de estímulo de exercício agudo (BEJMA; JI, 1999). O estresse oxidativo induz também a respostas diferentes, dependendo do tipo de tecido do órgão avaliado e de seu nível de antioxidantes endógenos (LIU et al., 2000).

Prada et al. (2004), desenvolveram um protocolo com ratos treinados por natação na intensidade correspondente ao limiar anaeróbico de treinamento. Tal protocolo mostrou-se eficaz em melhorar o condicionamento aeróbico dos animais, mas não desencadeou adaptações favoráveis nas atividades das enzimas antioxidantes.

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 (acetilcolinesterase), sendo então sequestrada para o interior do neurônio a partir do líquido extracelular. A colina participará de uma reação de acetilação com Acetil-CoA, por ação da enzima colina acetiltransferase. As terminações nervosas, onde se processam essas sínteses, são ricas em mitocôndrias que disponibilizam o Acetil-CoA necessário para a reação. Como etapa final da síntese, ocorre a captação da acetilcolina pelas vesículas sinápticas, cujo transportador conta com o gradiente de prótons para dirigir essa coleta. 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 acetilcolinesterase, 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. Os receptores para a acetilcolina se dividem em duas classes principais: nicotínicos (que ainda se subdividem em neuronais e musculares) e muscarínicos (que apresenta cinco subtipos). Os receptores muscarínicos encontrados no Sistema Nervoso Central e em músculos 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).

De acordo com os resultados obtidos no experimento, verificamos algumas propriedades fisiológicas da musculatura lisa traqueal. Redução significativa nos valores obtidos quando da análise da acetilcolinesterase dos grupos PT 1, 5 e 10 horas, assim como no grupo de animais desafiados e pré-treinados antes do desafio antigênico podem estar relacionadas com o acúmulo do neurotransmissor acetilcolina, já que se evidenciou aumento da contratilidade do músculo liso traqueal nesses mesmos grupos.

A anafilaxia é uma das desordens imunológicas mais comuns e o modelo de sensibilização seguida de broncoprovocação aqui empregado é um dos mais

freqüentemente utilizados no estudo do comportamento contrátil das vias aéreas frente a reações que envolvam a participação do sistema imune (Capaz et al., 1993; Jancar et al., 1997; Steil et al., 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; Tavares de Lima & da Silva, 1998). O procedimento de brocoprovocação pela repetição da exposição ao antígeno por inalação ao animal sensibilizado (Manzoli et al., 1999), 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 mostrou-se eficaz do ponto de vista do processo asmático, já que se pôde verificar uma resposta broncoconstrictora marcante, pelo desconforto respiratório apresentado pelos animais, no momento da brocoprovocação. 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 contração dependente semelhante ao grupo naïve, em que os animais não foram submetidos a qualquer treinamento; 2 - no grupo S/D evidenciou-se contração dependente, mais clara nas altas concentrações de CCh e K^+ , em relação aos grupos naïve e sensibilizado, porém, neste caso com significância estatística; 3 - o grupo S/E pré-desafio apresentou contração dos anéis isolados de traquéia de ratos significativamente maior em contrações mais intensa desencadeadas pelo CCh e K^+ .

Animais naïve 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 a um agente contrátil, é explicada a contração apresentada em relação aos grupos aqui utilizados como controle para este protocolo, os grupos naïve e sensibilizado. O grupo sensibilizado com OVA, em seguida treinado 5 dias e logo após desafiado mostrou contração ainda mais vigorosa em relação aos animais naïve, 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 sadios que os

animais 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 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.

Na fase inflamatória do processo asmático, aqui padronizada em 24 horas após o desafio antigênico, há migração de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos (Quetayba et al., 2000; Barnes e al., 1988). Estas células, por sua vez, juntamente com outras células do próprio tecido lesionado promovem a liberação de citocinas, quimiocinas e outros fatores inflamatórios que, por atuarem em receptores ligados à tirosina quinase, levam a alterações intracelulares de indução ou inibição da síntese protéica, que culminam em alterar as respostas celulares a diferentes estímulos. Farmacologicamente, o aumento dessa responsividade a um dado agonista pode ser caracterizada através de uma resposta máxima aumentada (hiperreatividade), uma menor EC50 (hipersensibilidade) ou uma combinação desses dois parâmetros.

Os resultados obtidos com esta pesquisa demonstram o desenvolvimento de hiperreatividade inespecífica aos estímulos contráteis aqui empregados (CCh e K⁺), uma vez que, na maior parte dos casos houve um aumento significativo apenas da resposta máxima sem o desvio à esquerda na curva concentração-efeito, indicativo do desenvolvimento de hipersensibilidade.

No presente estudo, a eficácia do processo de sensibilização antigênica por via intraperitoneal foi ratificada mediante experimentos com anéis de traquéia oriundos de animais previamente sensibilizados. Estudos anteriores demonstram que a resposta contrátil obtida pela apresentação *in vitro* do antígeno, de acordo com a reação de Schultz-Dale, é semelhante à mediada pela histamina, leucotrienos e prostanoídes (Narahashi; Moore; Scott, 1964). Além do mais, em tecido de ratos desafiados à 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.

Para avaliar os efeitos da atividade física, uma equipe de pesquisadores dirigidas pelo cirurgião Ricardo Kalaf, do Departamento de Cirurgia da Unicamp, submetem um grupo de ratos à prática regular de exercícios aeróbicos durante quatro semanas – o que equivaleria a um período de seis meses para os humanos. Após uma interrupção de dois dias nas atividades, a equipe induziu nos animais – bem como em um grupo de ratos que não havia praticado exercícios – um processo inflamatório agudo, caracterizado pela parada e pelo restabelecimento da circulação pulmonar. Os testes mostraram que o exercício físico regular modula a resposta inflamatória aguda pulmonar. O objetivo do estudo de Kalaf era descobrir se o condicionamento físico atuaria como antiinflamatório natural no caso das inflamações agudas e, especificamente, das que atacam os pulmões. Ele explica que as inflamações agudas se manifestam imediatamente quando há agressões de origens diferentes (física, química, alérgica ou microbiana) em um período curto de tempo. O desenvolvimento de processo inflamatório no grupo que praticou exercícios foi 30% menor do que no outro grupo. Kalaf explica que a resposta inflamatória a uma agressão é uma manifestação de proteção do organismo. No entanto, quando ela é muito intensa, pode ser mais nociva do que o fator que provocou a inflamação.

A realização de sessões com curtos intervalos de exercícios tem mostrado reduzir a severidade da resposta a asma induzida pelo exercício (AIE). Esse fenômeno é conhecido como período refratário (Storms, 2003-2005; Rundell et al.; Stearns, 1981) e tem sido utilizado como manobra para reduzir os efeitos da AIE. Mesmo com uma variabilidade intra-sujeito, essa manobra possui boa efetividade na prevenção da AIE (Storms, 2003). A forma pela qual o período refratário reduz a magnitude da AIE também não está bem definida. Entretanto, é possível que os mediadores inflamatórios sofram depleção durante esse período, necessitando de tempo para a sua ressíntese (Stearns, 1981) e, dessa forma, reduzindo a crise de AIE.

Autores já relataram que a hiperreatividade ao músculo liso das vias aéreas ao K^+ ocorre tanto em tecidos de cobaias quanto em ratos (Perpina et al., 1990; Piercy et al., 1993). Observou-se que o padrão de resposta se apresenta diferenciado, embora a hiperreatividade tenha sido inespecífica para agonistas analisados.

Um relatório do Dr. Mário Barreto, da Universidade La Sapienza, em Roma, apóia a teoria de 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 estresse oxidativo e hiperatividade brônquica. Mesmo assim, ele observou que os resultados de seus estudos foram, de fato, sugestivos de um papel do estresse oxidativo sobre a broncoconstrição induzida por exercício e de uma associação importante entre o estresse oxidativo e a hiperatividade brônquica.

A hipótese de que, durante o exercício, o fluxo sanguíneo brônquico poderia falhar e as vias aéreas com calibre reduzido poderiam dilatar não obteve suporte nos trabalhos de Quail et al. (2003). Segundo ele, o exercício normal não promove a broncoconstrição durante ou após o treinamento, e, o grau de constrição está diretamente relacionado com a intensidade do exercício. O mecanismo dominante deste processo é o colinérgico, no entanto, a participação do sistema α -adrenérgico também foi evidenciada.

Na pesquisa em questão, evidenciou-se queda nos valores da acetilcolinesterase e do nitrito, assim como aumento de valores na peroxidação lipídica nos grupos desafiado e pré-treinado. Isto demonstra relação com o aumento da contratilidade muscular lisa traqueal nesses grupos, frente aos fatores determinantes, quais sejam, desafio antigênico e o exercício. Uma das formas de defesa do organismo envolve o uso de radicais livres. Em um processo inflamatório, grande número de células de defesa são translocadas para o local de inflamação. Essas células, com o intuito de destruir os microorganismos invasores, lançam mão de espécies extremamente reativas (tais como superóxidos e óxidos nítricos), que acabarão por destruir os elementos patógenos. A baixa especificidade do processo tem lados positivo e negativo: ao mesmo tempo em que passa por cima de adaptações genéticas dos elementos invasores, também acaba por danificar as células do próprio organismo hospedeiro. A atividade muscular exigida durante exercícios físicos 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 estresse oxidativo, 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).

O óxido nítrico pode ser um oxidante ou um redutor dependendo do meio em que ele está e é rapidamente destruído pelo oxigênio, sendo que sua oxidação produz nitrito e nitrato. O NO tem o menor peso molecular de qualquer produto de secreção celular de mamíferos; sua meia-vida é curta e a especificidade de suas reações é mínima. O NO é citotóxico e vasodilatador e modula reações inflamatórias ou antiinflamatórias, dependendo do tipo celular e do estímulo. A molécula do NO tem um elétron não pareado e reage facilmente com oxigênio, radical superóxido, ou metais de transição, como ferro, cobalto, manganês ou cobre. O NO tem alta afinidade com o heme, encontrado em proteínas intracelulares (óxido nítrico-sintase, cicloxigenase e guanilato ciclase). São os NO resultantes da ativação da i-NOS que possuem ação citotóxicas. Parece que o NO exerce maior efeito na imunidade inespecífica do que na específica, exibindo atividade citostática contra uma notável amplitude de microorganismos patogênicos (GUTTERIDGE et al., 1985).

O treinamento supervisionado pode estar associado a efeitos benéficos no controle da doença e qualidade de vida em crianças asmáticas. Estes dados sugerem um papel acessório de condicionamento físico no manejo clínico de pacientes com doença mais avançada (Fanelli et al., 2007).

VII-CONSIDERAÇÕES FINAIS



7 Considerações finais

Nos estudos *in vitro* com traquéias de animais submetidos a exercício leve a curto prazo aqui apresentados verificou-se que: 1- em animais treinados durante 1 hora, a contração da musculatura lisa traqueal isolada de ratos tanto quando o carbacol quanto como o potássio são utilizados como agentes contráteis; 2- em animais pré-treinados, com treinamento de 1 hora, contração, significativa estatisticamente, da musculatura lisa traqueal isolada de ratos para carbacol e potássio; 3- em animais pré-treinados durante 5 horas, contração, também significativa, ainda mais intensa, da musculatura lisa traqueal isolada de ratos, para ambos agentes contráteis testados; 4- em animais pré-treinados durante 10 horas, contração, igualmente significativa, que neste grupo se dá com a maior intensidade, da musculatura lisa traqueal isolada de ratos em carbacol e potássio.

Ainda, nos estudos *in vitro*, segundo protocolo em que se estabeleceu desafio antigênico, identificou-se: 1- em animais naive e sensibilizados, contração dependente semelhante da musculatura lisa traqueal isolada de ratos, identificando a validação do protocolo aqui estabelecido, quando da ausência do desafio antigênico; no grupo S/D, contração, significativa estatisticamente, da musculatura lisa traqueal isolada de ratos, na presença dos agentes contráteis CCh e K^+ ; no grupo S/E pré-desafio, contração, igualmente significativa, que neste grupo se dá com a maior intensidade, dos anéis isolados de traquéia de ratos, de CCh e K^+ .

Além disso, o exercício a curto prazo reduz significativamente os níveis de nitrito no grupo treinado 5 horas, em relação aos grupos sedentários e treinado 1 hora, demonstrando que o óxido nítrico pode estar envolvido neste processo, já que há contração significativa da musculatura lisa traqueal neste grupo de animais quando submetidos aos agentes contráteis CCh e K^+ . Nos animais submetidos ao desafio antigênico, também ocorreu redução dos níveis de nitrito nos animais S/D e S/E pré-desafio.

Na peroxidação lipídica, os grupos pré-treinados 1, 5 e 10 horas apresentaram valores significativamente maiores em relação aos grupos sedentário e treinado 1 hora, levando a se pensar em morte celular nestes grupos, assim como demonstrando que, nestes casos, o exercício a curto prazo, conforme protocolo aqui estabelecido, não funcionou como agente protetor. No grupo asmático, os animais desafiados e pré-treinados antes do desafio antigênico apresentaram valores significativamente maiores em relação ao grupo naive, o que sugere também a presença de peroxidação lipídica

nestes dois casos, o que seria esperado diante de agentes contráteis, quais sejam o desafio antigênico e o exercício.

A análise da atividade da acetilcolinesterase mostrou redução, nos grupos pré-treinados 1, 5 e 10 horas em relação ao grupo naïve. Isto sugere o acúmulo do neurotransmissor acetilcolina que apresenta ação pró-contrátil. A mesma queda na atividade da AChE e possível aumento nos níveis de ACh ocorreu nos animais S/D e S/E pré-desafio.

VIII - CONCLUSÃO



8 Conclusão

O exercício leve a curto prazo causou efeito pró-contrátil sobre a musculatura lisa traqueal, tanto em circunstâncias fisiológicas quanto no processo asmático. 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.

IX-REFERÊNCIAS



Referências

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.**, 2000; 72:637-47.

ALESSIO, H.M. Exercise-induced oxidative stress. **Med Sci Sports Exerc.**, 1993;25: 218-24.

ANDERSON, S.D.; DAVISKAS, E. The mechanism of exercise-induced asthma. **Allergy Clin Immunol.**, 2000; 106: 453.

BARNES, P. J. Airway neuropeptides and asthma: IN: Vane *et al.* Asthma: basic mechanisms and therapeutic perspectives. **Roma: Pythagora Press**, cap. 7, p. 127-139, 1989.

BARNES, P. J. Chronic obstructive pulmonary disease. **N Engl J Méd.**, v. 343, p. 269–80, 2000.

BECKER, A. Controversies and challenges of exercise-induced bronchoconstriction and their implications for children. **Pediatr Pulmonol suppl.**, 2001; 21:38.

BEZERRA M.A.; LEAL-CARDOSO, J.H.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; CRIDDLE, D.N.; FONTELES, M.C. Myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Alpinia speciosa* on rat ileum. **Phytother Res.**, v.14, p. 549-51, 2000.

BUENO, C.R. Jr.; 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.**, 2010.

CABRAL, A.L.B.; CONCEIÇÃO, G.M.; FONSECA-GUEDES, C.H.F.; MARTINS, M.A. Exercise-induced bronchospasm in children. **Am J Respir Crit Care Med.**, 1999; 159: 1819.

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. **The Jornal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 266, n. 2, p. 812-819, 1993.

CASPERSEN, C.J.; POWELL, K.F.; CHRISTENSON, G.M. Physical activity, exercise and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. **Public Health Rep.**, 1985;100:126-31.

CORRIGAN, C.J.; KAY, A.B. T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma. **Immunol Today**, 1992;13:501-6.

CRIMI, E.; MILANES, M.; PINGFANG, S.; BRUSASCO, V. Allergic inflammation and airway smooth muscle function. **Sei. Total Environ.**, V. 270, p. 57-61, 2001.

DAVIES, K.J.A.; QUINTANILHA, A.T.; BROOKS, G.A.; PACKER, L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. **Biochem Biophys Res Commun**, 1982;107:1198-205.

DE BISSCHOP, C.; GUERNAD, H.; DESNOT, P.; VERGERE, T.J. Reduction of exercise-induced asthma in children by short, repeated warm-ups. **Br J Sports Med.**, 1999; 33(2): 100-4.

DOUWES, J.; GIBSON, P.; PEKKANEN, J.; PEARCE, N. Noneosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. **Thorax.**, 2002;57:643-8.

FAHEY, T.; INSEL, P.M.; ROTH, W.T. Fit & Well – Core Concepts and Labs in Physical Fitness and Wellness. **Mountain View**: Mayfield, 3rd. Edition, 1999.

FANELLI, A.; CABRAL, A. L. B.; NEDER, J. A.; MARTINS, M. A.; CARVALHO, C. R. F. Exercise Training on Disease Control and Quality of Life in Asthmatic Children. **Medicine & Science in Sports & Exercise**: September 2007 - Volume 39 - Issue 9 - pp 1481-1486.

FARIA, Junior A.G. Exercício e promoção da saúde. Oeiras: **Câmara Municipal de Oeiras**, 1991.

FINK, G.; KAIE, C.; BLAU, H.; SPITZER, S.A. Assessment of exercise capacity in asthmatic children with various degrees of activity. **Pediatr Pulmonol.**, 1993; 15:41.

FLETCHER, G.F., BALADY, G.J.; AMSTERDAM, E.A.; CHAITMAN, B.; ECKEL, R., FLEG, J. Exercise standards for testing and training: a statement for healthcare professionals from the **American Heart Association**. **Circulation**, 2001; 104: 1694-740.

GOODMAN, L. S. & GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 9a edição, 1996.

GODFREY, S.; BARNES, P.J.; GRUNSTEIN, M.M.; LEFT, A.R.; WOOLCOCK, A.J. Exercise-induced asthma. In Asthma. **Lippincott-Raven Publishers**, Philadelphia, 1997.

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.**, 1985;145:267-73.

HEATH, G.W.; HAGBERG, J.M.; EHSANI, A.A.; HOLLOSZY, J.O. A physiological comparison of young and older endurance athletes. **J Appl Physiol.**, 1981;51:634-40.

INAL, M.; AKYÜZ, F., TURGUT, A., GETSFRID, W.M. Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. **Med Sci Sports Exerc.**, 2001;33:564-7.

JILL, F.U.R. Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. **J Appl Physiol.**, 1992;72:549-54.

KANAZAWA, H.; HIRATA, K.; YOSHIWA, J. Role of endogenous nitric oxide in exercise-induced airway narrowing in patients with bronchial asthma. **J. Allergy Clin Immunol.**, 106:1081, 2000.

LANCHA JUNIOR, A.H. Atividade física, suplementação nutricional de aminoácidos e resistência periférica à insulina. **Revista Paulista de Educação Física**, v.10, n.1, p.68-75, 1996.

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

LARA, M.; ROSENBAUM, S.; RACHELEFSKY, G.; *et al.* Improving childhood asthma outcomes in the United States: a blueprint for policy action. **Pediatrics.**, v. 109, p. 919–30, 2002.

LEAF, D.A.; KLEINMAN, M.T.; HAMILTON, M.; BARSTOW, T.J. The effect of exercise intensity on lipid peroxidation. **Med Sci Sports Exerc.**, 1997;29:1036-9.

LEEUWENBURGH, C.; HOLLANDER, J.; LEICHTWEIS, S.; GRIFFITH, S. M.; GORE, M.; JI, L.L. Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. **Am J Physiol.**, 1997;272:R363-9.

LEHMANN, M.; FOSTER, C.; DICKHUTH, H.H.; GASTMANN, U. Autonomic imbalance hypothesis and overtraining syndrome. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.30, n.7, p.1140-5, 1998.

LEHMANN, M.; FOSTER, C.; KEUL, J. Overtraining in endurance athletes: a brief review. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.25, n.7, p.854- 62, 1993.

MARGARITIS, I.; TESSIER, F.; M-J RICHARD, M.P. No evidence of oxidative stress after a triathlon race in highly trained competitors. **Int J Sports Med.**, 1997;18: 186-90.

MCFADDEN Jr, E.R. Exercise-induced airway obstruction. **Clin Chest Med.**, 1995; 16:671.

MILLS, P.C., SMITH, N.C.; CASAS, I.; HARRIS, P.; HARRIS, R.C.; MARLIN, D.J. Effects of exercise intensity and environmental stress on indices of oxidative stress and iron homeostasis during exercise in the horse. **Eur J Appl Physiol.**, 1996;74:60-6.

NIES, A.M.; HARTMANN, A.; GRUNERT-FUCHS, M.; POCH, B.; SPEIT, G. DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. **Int J Sports Med.**, 1996; 17:397-403.

PALAZZETTI, S.; RICHARD, M.J.; FAVIER, A.; MARGARITIS, I. Overloaded training increases exercise-induced oxidative stress and damage. **Can J Appl Physiol.**, 2003;28:588-604.

PATE, R.R.; PRATT, M.; BLAIR, S.N.; HASKELL, W.L.; MACERA, C.A.; BOUCHARD, C.; et al. Physical activity and public health - a recommendation from the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine. **JAMA**, 1995;273:402-7.

PATE, R.R. Health and fitness through Physical Education: research direction for the 1990s. In: American Academy of Physical Education Papers: New Possibilities, New Paradigms? **Champaign: Human Kinetics**, 1990:62-9.

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. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, p. 190–199, 2007.

RUNDELL, K.W.; SPIERING, B.A.; JUDELSON, D.A.; WILSON, M.H. Bronchoconstriction during cross-country skiing: is there really a refractory period? **Med Sci Sports Exerc.**, 2003;35(1):18-26.

RUPP, N.T.; GUILL, M.F.; BRUDNO, S. Unrecognized exercise induced bronchospasm in adolescent athletes. **Am J Dis Child**, 1992; 146:941.

SANTANA, C.F. & Pinto, K.V. *et al.* Estudos farmacológicos de antiinflamatórios de alguns vegetais. **Revista do Instituto de Antibióticos**, 6(12), Recife, 1966.

SELAMOGLU, S.; TURGAY, F.; KAYATEKIN, B.M.; GÜNENC, S.; YSLEGEN, C. Aerobic and anaerobic training effects on the antioxidant enzymes of the blood. **Acta Physiol Hung**, 2000;87:267-73.

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.

SEOW, C. Y.; SCHELLENBERG, R. R.; Pare, P. D. Structural and functional changes in the airway smooth muscle of asthmatic subjects. **Am. J. Respr. Crit. Care Med.**, V. 158, p. 179-186, 1998.

SHEPHARD, R.J.; BALADY, G. Exercise as cardiovascular therapy. **Circulation**, 1999;99: 963-72.

SHIBATA, O.; MAKITA, T.; TSUJITA, T.; TOMIYASU, S.; FUJIGAKI T.; NAKAMURA, H.; SUMIKAWA, K. Carbachol, norepinephrine, and hypocapnia stimulate phosphatidylinositol turnover in rat tracheal slices. **Anesthesiology.**, 1995 Jan;82(1):102-7.

STEARNS, D.R.; MCFADDEN, E.R.; BRESLIN, F.J.; INGRAM, R.H. Reanalysis of the refractory period in exertional asthma. **J Appl Physiol.**, 1981;50(3):503-8.

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.; JIANG, H.; UNRUH, H.; MA, X. The brophyns of asthmatic airwy smooth muscle, v. 137, pg 125-140, 2003.

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.

STEPHENS, N. L. Airway smooth muscle. **Lung.**, v. 179, p. 333-373, 2001.

SOEJARTO, D. D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. **J. Ethnopharmacol.**, v. 51, p. 1-15, 1996.

STEPHENS, N. L.; JIANG, H.; HALAYKO, A. Role of airway smooth muscle in asthma: possible relation to the neuriendocrine system. **Anat Rec.**, v. 236, p. 152-163, 1993.

STORM, W.W.; JOYNER, D.M. Update on exercise-induced asthma: a report of the olympic exercise asthma summit conference. **Phys Sportsmed.**, 1997; 25.

STORMS, W.W. Review of exercise-induced asthma. **Med Sci Sports Exerc.**, 2003; 35(9): 1464-70.

SUBUDHI, A.W.; DAVIS, S.L.; KIPP, R.W.; ASKEW, E.W. Antioxidant status and oxidative stress in elite alpine ski racers. **Int J Sport Nutr Exerc Metab.**, 2001;11:32-41.

TENG, C.M.; HSU, S.Y; LIN, Ch., ;YU, S.M.; WANG, K.J.; LIN, M.H.; CHEN, C.F. Antiplatelet action of dehydrokawain derivatives isolated from *Alpinia speciosa* rhizoma. **Chin J Physiol.**, v. 33, p. 41-8, 1990.

TERADA, A.; FUJISAWA, T.; TOGASHI, K.; MIYAZAKI, T.; KATSUMATA, H.; ATSUTA, J.; IGUCHI, K.; KAMIYA, H.; TOGARI, H. Exhaled nitric oxide decreases during exercise-induced bronchoconstriction in children with asthma. **Am J Respir Crit Care Med.**, 2001; 164: 1879.

VANDERLINDE, F. A. & CADEN, S. *et al.* Atividade farmacológica do extrato de *Alpinia speciosa* Schum. In: **Anais do IX Simpósio de plantas medicinais do Brasil**, 1 a 3 de setembro, Rio de Janeiro – RJ, 1986.

VENDITTI, P.; DI MEO, S. Effect of training on antioxidant capacity, tissue damage, and endurance of adult male rats. **Int J Sports Med.**, 1997;18:497-502.

WEISS, S. J.; TEST, S. T.; ECKMANN, C. M.; ROODS, D.; REGIANI, S. Brominating oxidants generated by human eosinophils. **Science.**, v. 234, p. 200-203, 1986.

WENZEL, S.E.; SCHWARTZ, L.B.; LANGMACK, E.L.; HALLIDAYJL, T.J.B.; GIBBS R.L., *et al.* Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. **Am J Respir Crit Care Med.**, 1999;160:1001-8.

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.**, 2010, IN PRESS.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)