

Uma Única Sessão de Exercício Resistido Melhora a Função Endotelial Aórtica em Ratos Hipertensos

A Single Resistance Exercise Session Improves Aortic Endothelial Function in Hypertensive Rats

Thaís de Oliveira Faria, Jhuli Keli Angeli, Luiz Guilherme Marchesi Mello, Gustavo Costa Pinto, Ivanita Stefanon, Dalton Valentim Vassallo, Juliana Hott de Fúcio Lizardo

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória, ES – Brasil

Resumo

Fundamento: O exercício físico é uma importante ferramenta para o aprimoramento da função endotelial.

Objetivo: Avaliar os efeitos do exercício dinâmico resistido agudo na função endotelial de ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

Métodos: Após 10 minutos de exercício, a aorta foi removida para avaliação da expressão de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), óxido nítrico sintase endotelial fosforilada (p-eNOS1177) e óxido nítrico sintase endotelial induzível (iNOS), e para a construção de curvas concentração-resposta de acetilcolina (ACT) e fenilefrina (FEN). O protocolo FEN foi também realizado com lesão endotelial e antes e depois da administração de N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) e indometacina. A resposta máxima (E_{max}) e a sensibilidade (EC_{50}) a esses fármacos foram avaliadas.

Resultados: Houve aumento do relaxamento induzido por ACT nos anéis aórticos dos ratos exercitados (Ex) ($E_{max} = -80 \pm 4,6\%$; $p < 0,05$) quando comparado àquele dos controles (Ct) ($E_{max} = -50 \pm 6,8\%$). A E_{max} à FEN diminuiu após exercício ($95 \pm 7,9\%$; $p < 0,05$) quando comparada àquela dos controles ($120 \pm 4,2\%$). Tal resposta foi abolida após administração de L-NAME ou lesão endotelial. Na presença de indometacina, a reatividade dos anéis aórticos à FEN diminuiu nos dois grupos ($EC_{50} = Ex -5,9 \pm 0,14$ vs. Ct $-6,6 \pm 0,33 \log \mu M$; $p < 0,05$; $E_{max} = Ex 9,5 \pm 2,9$ vs. Ct $17 \pm 6,2\%$; $p < 0,05$). O exercício não alterou a expressão de eNOS e de iNOS, mas aumentou o nível de p-eNOS.

Conclusão: Uma única sessão de exercício resistido melhora a função endotelial em ratos hipertensos. Essa resposta parece ser mediada por elevação da produção de NO através de ativação de eNOS. (Arq Bras Cardiol. 2017; 108(3):228-236)

Palavras-chave: Exercício; Ratos; Hipertensão; Óxido Nítrico; Endotélio Vascular.

Abstract

Background: Physical exercise is an important tool for the improvement of endothelial function.

Objective: to assess the effects of acute dynamic resistance exercise on the endothelial function of spontaneously hypertensive rats (SHR).

Methods: Ten minutes after exercise, the aorta was removed to evaluate the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (p-eNOS1177) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) and to generate concentration-response curves to acetylcholine (ACh) and to phenylephrine (PHE). The PHE protocol was also performed with damaged endothelium and before and after N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and indomethacin administration. The maximal response (E_{max}) and the sensitivity (EC_{50}) to these drugs were evaluated.

Results: ACh-induced relaxation increased in the aortic rings of exercised (Ex) rats ($E_{max} = -80 \pm 4.6\%$, $p < 0.05$) when compared to those of controls (Ct) ($E_{max} = -50 \pm 6.8\%$). The E_{max} to PHE was decreased following exercise conditions ($95 \pm 7.9\%$, $p < 0.05$) when compared to control conditions ($120 \pm 4.2\%$). This response was abolished after L-NAME administration or endothelial damage. In the presence of indomethacin, the aortic rings' reactivity to PHE was decreased in both groups ($EC_{50} = Ex -5.9 \pm 0.14$ vs. Ct $-6.6 \pm 0.33 \log \mu M$, $p < 0.05$ / $E_{max} = Ex 9.5 \pm 2.9$ vs. Ct $17 \pm 6.2\%$, $p < 0.05$). Exercise did not alter the expression of eNOS and iNOS, but increased the level of p-eNOS.

Conclusion: A single resistance exercise session improves endothelial function in hypertensive rats. This response seems to be mediated by increased NO production through eNOS activation. (Arq Bras Cardiol. 2017; 108(3):228-236)

Keywords: Exercise; Rats; Hypertension; Nitric Oxide; Endothelium Vascular.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Juliana Hott de Fúcio Lizardo •

Rua Luíza Grinalda. CEP 29100-240, Centro, Vila Velha, ES – Brasil

E-mail: julianahfl@gmail.com, julianahott@yahoo.com

Artigo recebido em 13/06/16; revisado em 26/08/16; aceito em 27/09/16.

DOI: 10.5935/abc.20170023

Introdução

O endotélio vascular é considerado um importante órgão-alvo na hipertensão arterial.¹ Há vários relatos sobre o envolvimento da disfunção endotelial na gênese ou no desenvolvimento de hipertensão arterial, podendo ser tanto a causa quanto a consequência do problema.^{2,3} Na hipertensão arterial, há um desequilíbrio na produção de fatores endoteliais, com maior produção de vasoconstritores do que de vasodilatadores. Isso explica o comprometimento do relaxamento dependente de endotélio em hipertensos, tanto animais quanto seres humanos.³⁻⁵

A principal causa dessa disfunção endotelial na hipertensão arterial parece ser a diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO).^{2,3,6} Sabe-se que, ao interagirem com o NO, os ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$) formam peroxinitrito, que reduz a disponibilidade de NO para o relaxamento de músculo liso.⁷ Os inibidores endógenos da NO sintase (NOS) são ainda encontrados no sangue de hipertensos, sendo o aumento de sua expressão associado com maior risco cardiovascular.³

O exercício físico é uma ferramenta importante para o aprimoramento da função endotelial, pois melhora o equilíbrio entre a liberação de vasodilatadores e de vasoconstritores. Já foi demonstrado que os protocolos de exercício crônico ou agudo têm importantes efeitos na liberação de substâncias vasoativas, resultando em melhor controle do tônus vascular endotélio-dependente.⁸⁻¹¹ Esses dados, entretanto, referem-se ao exercício aeróbio. Portanto, os efeitos de uma única sessão de exercício resistido na função endotelial são pouco conhecidos. Demonstramos anteriormente que uma única sessão de exercício resistido diminuía a reatividade à fenilefrina (FEN) e aumentava o relaxamento endotélio-dependente em resposta à acetilcolina (ACT) na artéria da cauda de ratos espontaneamente hipertensos (SHR).¹² Cheng et al.¹³ demonstraram resposta similar, entretanto, após exercício aeróbio.

O aprimoramento da função vascular após exercício aeróbio agudo parece ser mediado pela maior liberação de NO.^{8-11,13} Nossos resultados sugerem que o exercício resistido agudo também potencializa a produção daquele agente vasoativo, sendo a resposta associada com a liberação de prostanoídes vasodilatadores. Estudos adicionais são necessários para esclarecer os mecanismos subjacentes da função endotelial após exercício resistido agudo.

O presente estudo teve por objetivo investigar a função endotelial após uma única sessão de exercício resistido em SHR.

Métodos

Animais

Os experimentos foram conduzidos em 22 SHR machos, pesando 250-300 g e acomodados em ambiente com controle de temperatura e umidade e ciclos claro/escuro de 12 horas. Os animais tiveram livre acesso a água potável e receberam ração padrão *ad libitum*. O cuidado e o uso dos animais e todos os experimentos foram conduzidos conforme o Guia de Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, tendo os protocolos sido aprovados pelo Comitê de Ética

da instituição Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, Vitória, ES, Brasil (CEUA- EMESCAM).

Desenho do experimento

Grupos experimentais

Os animais foram submetidos a cirurgia para medida direta da pressão arterial. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados com técnicas assépticas. A anestesia foi induzida com hidrato de cloral (400 mg/kg, i.p.), doses suplementares tendo sido administradas se o rato recuperasse o reflexo de piscar. A artéria carótida esquerda foi cuidadosamente isolada para evitar dano aos nervos adjacentes. Uma cânula afunilada de polietileno (PE 50) contendo solução salina heparinizada (100 unidades/ml) foi inserida na artéria carótida comum esquerda para medida da pressão arterial. A extremidade livre do cateter foi conectada a obturador de aço inoxidável e inserida por via subcutânea para sair da parte posterior do pescoço. Os animais foram colocados em gaiolas separadas e deixados para se recuperar por 24 horas antes de iniciar o procedimento experimental. Os ratos foram monitorados para sinais de infecção.

A pressão arterial e a frequência cardíaca foram continuamente registradas nos ratos conscientes antes da sessão de exercício resistido para confirmar a presença de hipertensão arterial. Determinou-se a pressão arterial conectando-se o cateter arterial ao transdutor de pressão, modelo TSD104A, que foi acoplado ao amplificador DA100C. Utilizou-se um sistema de aquisição (MP 100 Biopac Sistemas, Inc., CA, EUA) para registro em tempo real da pressão arterial e da frequência cardíaca e para análise subsequente.

No dia do experimento, os ratos foram deixados para se adaptar ao ambiente do laboratório por 1 hora antes da tomada de suas medidas hemodinâmicas. Após o período de adaptação, mediram-se os níveis basais de pressão arterial nos animais conscientes por 10 minutos antes do exercício. Subsequentemente, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: grupo de exercício (n = 11), cujos ratos foram submetidos a uma única sessão de exercício resistido; e grupo controle (n = 11), cujos animais foram submetidos a uma única simulação de sessão de exercício resistido. Após 10 minutos de exercício, os animais dos dois grupos foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg, i.p.) e submetidos a eutanásia por exsanguinação. A aorta torácica foi cuidadosamente dissecada para análise da reatividade vascular e expressão proteica.

Protocolo do exercício

Inicialmente, todos os animais foram adaptados ao aparelho de exercício por 4 – 5 dias. Para adaptação, os ratos foram colocados no aparelho de exercício sem peso na posição de repouso, e, portanto, os animais não se moveram, embora tivessem recebido o estímulo elétrico na cauda. Depois, realizou-se uma repetição do teste máximo. Determinou-se que a repetição máxima (RM) seria o peso máximo levantado por cada rato usando o aparelho de exercício. Após 2 dias de repouso, os animais foram submetidos ao protocolo de exercício. Os ratos

realizaram o exercício resistido conforme modelo adaptado de estudos prévios.¹²⁻¹⁵ Os ratos vestindo uma jaqueta de lona puderam regular a girada e a flexão de seus torsos, tendo sido fixados por um suporte na posição ereta em seus membros posteriores. Aplicou-se um estímulo elétrico (20 V por 0,3 segundos e em intervalos de 3 segundos) na cauda do rato através de um eletrodo de superfície. Como resultado, os animais estenderam suas pernas repetidamente, levantando a carga no aparelho, que foi escolhido por imitar os exercícios tradicionais de agachamento realizados pelo homem, sendo os resultados obtidos no músculo esquelético do rato similares àqueles observados no homem.¹⁵ Os ratos se exercitaram no aparelho por 20 séries de 15 repetições cada. As repetições foram realizadas em intervalos de 3 segundos com 1 minuto de descanso entre as séries. A intensidade do exercício foi de 50% de 1 RM. O grupo controle recebeu o mesmo estímulo com a mesma frequência e duração, na mesma intensidade e mesmos intervalos do grupo de exercício. Entretanto, o aparelho de exercício não teve peso e foi mantido na posição de repouso. Esses animais, portanto, não levantaram carga.

Medidas de reatividade vascular

A aorta torácica foi cuidadosamente dissecada, com eliminação da gordura e do tecido conjuntivo. Para os experimentos de reatividade, a aorta foi dividida em segmentos cilíndricos de 3-4 mm. O teste funcional dos anéis aórticos foi realizado como previamente descrito.¹⁶ Resumidamente, segmentos de aorta torácica de 4 mm de largura foram montados em câmara de tecido isolada contendo solução de Krebs-Henseleit (em mM: 118 NaCl; 4,7 KCl; 23 NaHCO₃; 2,5 CaCl₂; 1,2 KH₂PO₄; 1,2 MgSO₄; 11 glicose e 0,01 EDTA), gaseificados com mistura contendo 95% O₂ e 5% CO₂, e mantidos sob uma tensão de repouso de 1 g a 37°C. Registrou-se a tensão isométrica com um transdutor isométrico de força (TSD125C, CA, EUA) conectado a um sistema de aquisição (MP100 Biopac Sistemas, Inc., Santa Barbara, CA, EUA).

Após 45 minutos de estabilização, todos os anéis aórticos foram inicialmente expostos por duas vezes a 75 mM KCl, a primeira vez para checar sua integridade funcional, e a segunda para avaliar a tensão máxima desenvolvida. Depois, 10 μM de ACT foram usados para testar a integridade endotelial dos segmentos que haviam sido previamente contraídos com 1 μM de FEN. A resposta de relaxamento igual a 90% ou maior foi considerada como demonstrativa de integridade funcional endotelial. Após uma lavagem de 45 minutos, determinaram-se as curvas concentração-resposta para FEN. Curvas únicas foram geradas para cada segmento. Investigou-se o papel de certos vasoativadores locais sobre a resposta contrátil determinada pela FEN. Os efeitos dos seguintes fármacos foram avaliados: (1) inibidor não específico da NOS, N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (100 μM); e (2) inibidor não específico da ciclooxigenase (COX), indometacina (10 μM). Esses fármacos foram adicionados ao banho 30 minutos antes da produção das curvas concentração-resposta de FEN.

A influência do endotélio na resposta à FEN na ausência ou presença de exercício foi investigada após sua remoção mecânica obtida ao se friccionar a luz do vaso com uma agulha. Confirmou-se a ausência de endotélio pela inabilidade de 10 μM de ACT induzir relaxamento.

Em outro conjunto de experimentos, após estabilização de 45 minutos, os anéis aórticos dos grupos controle e de exercício foram pré-contraídos com 1 μM de FEN, determinando-se as curvas concentração-resposta para ACT (0,1 nM – 30 mM).

Análise Western blot

Após eutanásia conforme descrição anterior, obteve-se a aorta torácica, cujas amostras foram rapidamente congeladas e mantidas a -80°C para análise das seguintes expressões: da NOS endotelial (eNOS); da NOS endotelial fosforilada (p-eNOS); e da NOS induzível (iNOS). De cada artéria homogeneizada, 80 μg de proteína foram separados por 10% SDS-PAGE. A proteína foi transferida para membranas de nitrocelulose, que foram incubadas com tampão bloqueador, e então incubadas com anticorpos para eNOS, eNOS fosforilada na posição 1177 do aminoácido serina (p-eNOS1177) (1:250; BD Transduction Laboratories™, Lexington, UK), e iNOS (1:250; BD Transduction Laboratories™, Lexington, RU). Após lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-imunoglobulina de camundongo (1:5.000; StressGen, Victoria, Canadá) conjugado com peroxidase de rábano. Após lavagem exaustiva, os imunocomplexos foram detectados com um sistema peroxidase de rábano/quimiluminescência luminol realçada (ECL Plus, Amersham International, Little Chalfont, RU) e filme (Hyperfilm ECL International). Os sinais no 'immunoblot' foram quantificados com o programa ImageJ, sendo a mesma membrana usada para determinar a expressão da α-actina com anticorpo monoclonal de camundongo (1:5.000; Sigma, EUA).

Análise de dados e estatística

A resposta contrátil foi expressa como porcentagem da resposta máxima induzida por 75 mM KCl. A resposta de relaxamento à ACT foi expressa como porcentagem do relaxamento da resposta contrátil máxima. Para cada curva concentração-resposta, calcularam-se, usando análise de regressão não linear, o efeito máximo (E_{max}) e a concentração do agonista que produziu 50% da resposta máxima (-log EC₅₀). Assim, a sensibilidade (50% da resposta máxima) do agonista foi expressa como EC₅₀ (-log EC₅₀), e a máxima resposta contrátil ao fármaco, como E_{max}. O teste *t* de Student não pareado foi usado para comparar essas variáveis (EC₅₀ e E_{max}) entre os grupos.

Para comparar os efeitos da desnudação endotelial ou do L-NAME na resposta contrátil à FEN, os resultados foram expressos como a diferença na área sob a curva concentração-resposta (dAUC) para os grupos controle e experimental.

Para a expressão proteica, os dados foram expressos como a razão entre os sinais no immunoblot correspondendo à proteína de interesse e à α-actina. As diferenças foram analisadas usando-se o teste *t* de Student não pareado. Todos os resultados foram expressos como média ± EP (erro

padrão). Adotou-se o nível de significância de $p < 0,05$. Para todas as análises, usou-se o programa GraphPad Prism Software (Inc., San Diego, CA, EUA).

Resultados

Efeito do exercício na reatividade aórtica

Para investigar a atenuação da reatividade aórtica após exercício, desencadeou-se relaxamento endotélio-dependente pela adição de ACT (Figura 1). Uma única sessão de exercício resistido aumentou o relaxamento endotélio-dependente como observado na curva concentração-resposta da ACT. Além disso, após o exercício, houve aumento da E_{max} à ACT ($p < 0,05$); entretanto, a EC_{50} não se alterou ($p > 0,05$) (Tabela 1).

A reatividade aórtica à FEN foi atenuada após exercício (Tabela 1). Na presença de L-NAME, a redução da reatividade vascular à FEN após exercício foi abolida, tendo havido um significativo aumento da resposta vascular nos dois grupos (Tabela 1). A Figura 2 mostra as curvas concentração-resposta de FEN, e a porcentagem da dAUC após administração de L-NAME ou indometacina e após lesão endotelial. A reatividade vascular elevou-se significativamente nos dois grupos após lesão endotelial ($p < 0,05$) (Figura 2; Tabela 1). Nessa condição, a mudança percentual da dAUC foi também maior nos ratos exercitados, sugerindo haver uma importante modulação endotelial na reatividade vascular à FEN (Figura 2). A reatividade aórtica à FEN mostrou-se significativamente diminuída nos dois grupos na presença de indometacina, sugerindo haver uma maior produção de prostanoide vasoconstritor mediado pela COX em ratos hipertensos. Tal resultado é reforçado pela mudança percentual da dAUC, que mostrou maior efeito no grupo de exercício (Figura 2, Tabela 1).

Expressão de iNOS, eNOS e p-eNOS

Como mostram as Figuras 3 e 4, o nível de expressão da proteína de iNOS e eNOS não se alterou após exercício agudo. Entretanto, o nível da proteína de p-eNOS foi 38% maior ($p < 0,05$) nos ratos exercitados se comparado ao dos

controles (Figura 5), sugerindo haver aumento da produção de NO após uma única sessão de exercício resistido.

Discussão

O presente estudo demonstrou que uma única sessão de exercício resistido conduzida a 50% de uma RM aumenta a vasodilatação endotélio-mediada e diminui a reatividade vascular à FEN. Tal resposta associou-se com aumento do nível de p-eNOS117, indicando que NO tem importante papel no aprimoramento da função endotelial após exercício agudo.

Usando um protocolo de exercício similar, demonstramos anteriormente que uma única sessão de exercício resistido reduz a pressão arterial em SHR conscientes,¹⁷ reduz a resposta à FEN e aumenta o relaxamento endotélio-dependente¹² na artéria da cauda de SHR. Tais respostas parecem ser primariamente mediadas por NO. Foi demonstrado que exercício crônico, assim como exercício aeróbio agudo, reduz a resposta vascular α -adrenérgica¹⁸⁻²³ e aumenta o relaxamento endotélio-dependente em seres humanos e animais normotensos e hipertensos.^{18,24,25} Acredita-se que tal resposta seja mediada pela produção de NO e outros vasodilatadores, como prostaciclina.^{18,24,26} Dados definitivos sobre os efeitos do exercício resistido agudo na função vascular são limitados. Dois estudos prévios investigaram os efeitos do exercício isométrico de 'pegada de mão'^{27,28} com o objetivo de avaliar a função da artéria braquial em pacientes com disfunção endotelial. Não há outro estudo sobre função vascular e exercício resistido agudo.

Inicialmente avaliamos a vasodilatação endotélio-dependente desencadeada pela ACT em anéis aórticos isolados e mostramos que uma única sessão de exercício resistido aumentou essa resposta (Figura 2). Tais resultados corroboram os achados prévios em ratos normotensos e hipertensos após exercício dinâmico agudo.¹⁸⁻²¹ Além disso, Maiorana et al.²⁹ investigaram a resposta da artéria braquial à ACT em pacientes com insuficiência cardíaca após 8 semanas de treinamento aeróbio e de resistência, tendo ainda demonstrado significativo aumento da resposta vasodilatadora à ACT.

Além disso, demonstramos que o exercício resistido agudo diminui a resposta vasoconstritora à FEN mediada pelo aumento da produção de NO endotelial (Figura 2).

Tabela 1 – Valores de EC_{50} e E_{max} para cada protocolo

	EC_{50}		E_{max}	
	Ct	Ex	Ct	Ex
ACT	8,9 ± 0,2	9,0 ± 0,1	50 ± 6,8	80 ± 4,6 [†]
E+	6,7 ± 0,09	6,7 ± 0,1	120 ± 4,2	95 ± 7,9 [†]
E-	7,6 ± 0,1	7,7 ± 0,2	159 ± 7,2 [†]	162 ± 7,1 [†]
LN	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2	149 ± 7,9 [†]	148 ± 5,1 [†]
Indo	6,6 ± 0,3	5,9 ± 0,1	17 ± 6,2 [†]	9,5 ± 2,9 [†]

EC_{50} : 50% do efeito máximo do fármaco; E_{max} : efeito máximo do fármaco; ACT: acetilcolina; E+: fenilefrina sem lesão endotelial; E-: fenilefrina com lesão endotelial; LN: L-NAME; Indo: indometacina. Em anéis aórticos isolados de ratos espontaneamente hipertensos controles (Ct, n = 11) e exercitados (Ex, n = 11). [†] $p < 0,05$ vs. E_{max} Ct e Ex.

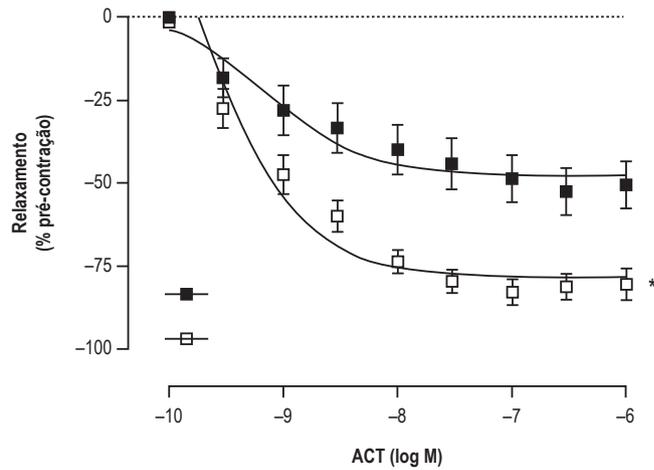


Figura 1 – Efeitos do exercício na curva concentração-resposta em anéis aórticos. Curva concentração-resposta da acetilcolina (ACT) obtida em anéis aórticos pré-contraindo com fenilefrina (FEN) em ratos controles (Ct, n = 17) e exercitados (Ex, n = 15). *p < 0,05 vs. Ct.

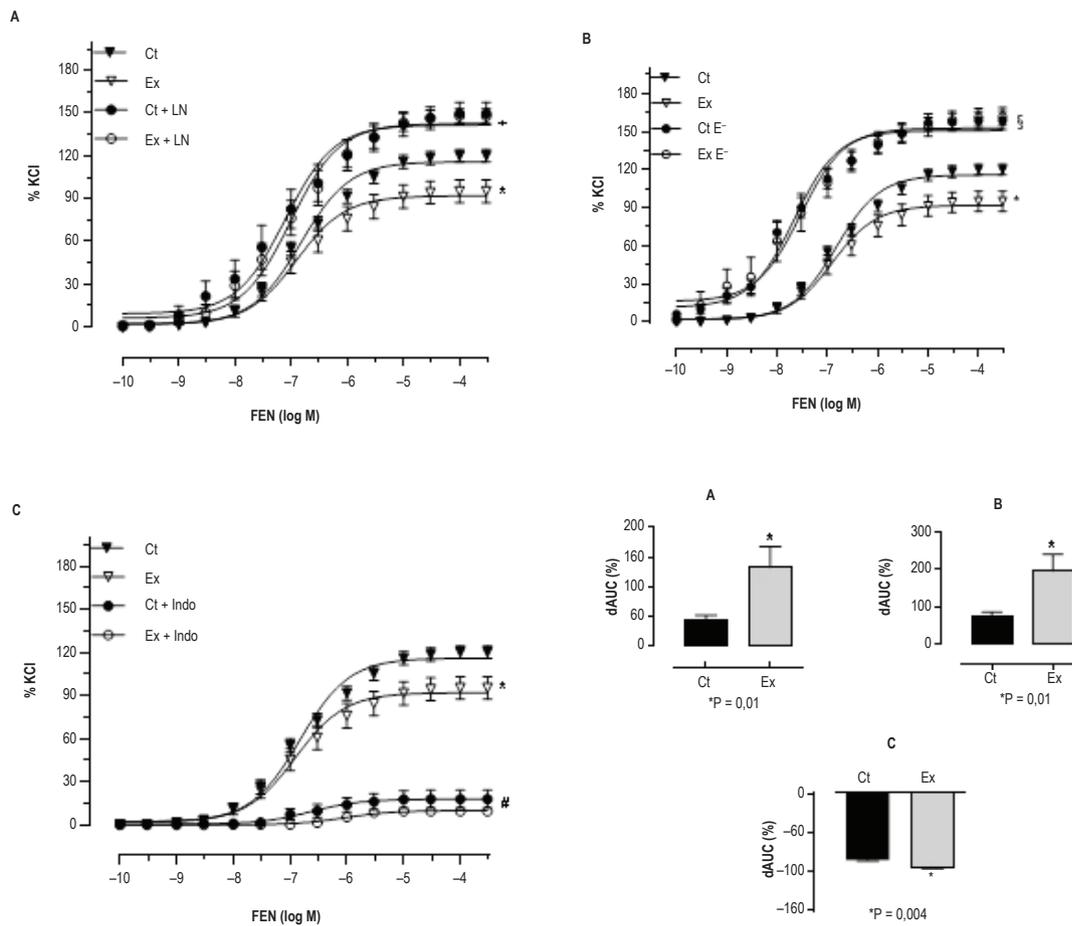


Figura 2 – Efeitos do exercício na curva concentração-resposta em anéis aórticos. Curva concentração-resposta da fenilefrina (FEN) obtida em anéis aórticos em ratos controles (Ct, n = 22) e exercitados (Ex, n = 22) (A) antes e depois da administração de L-NAME (Ct+LN, n = 11; Ex+LN, n = 12); (B) após lesão endotelial (Ct E-, n = 7; Ex E-, n = 6); e (C) após administração de indometacina (Ct+Indo, n = 7; Ex+Indo, n = 7). dAUC, diferença na área sob a curva. *p < 0,05 Ex vs. outras condições. +p < 0,05 Ct+LN e Ex+LN vs. outras condições. §p < 0,05 Ct E- e Ex E- vs. outras condições. #p < 0,05 Ct+Indo e Ex+Indo vs. outras condições. Valores expressos como porcentagem de resposta máxima ao KCl.

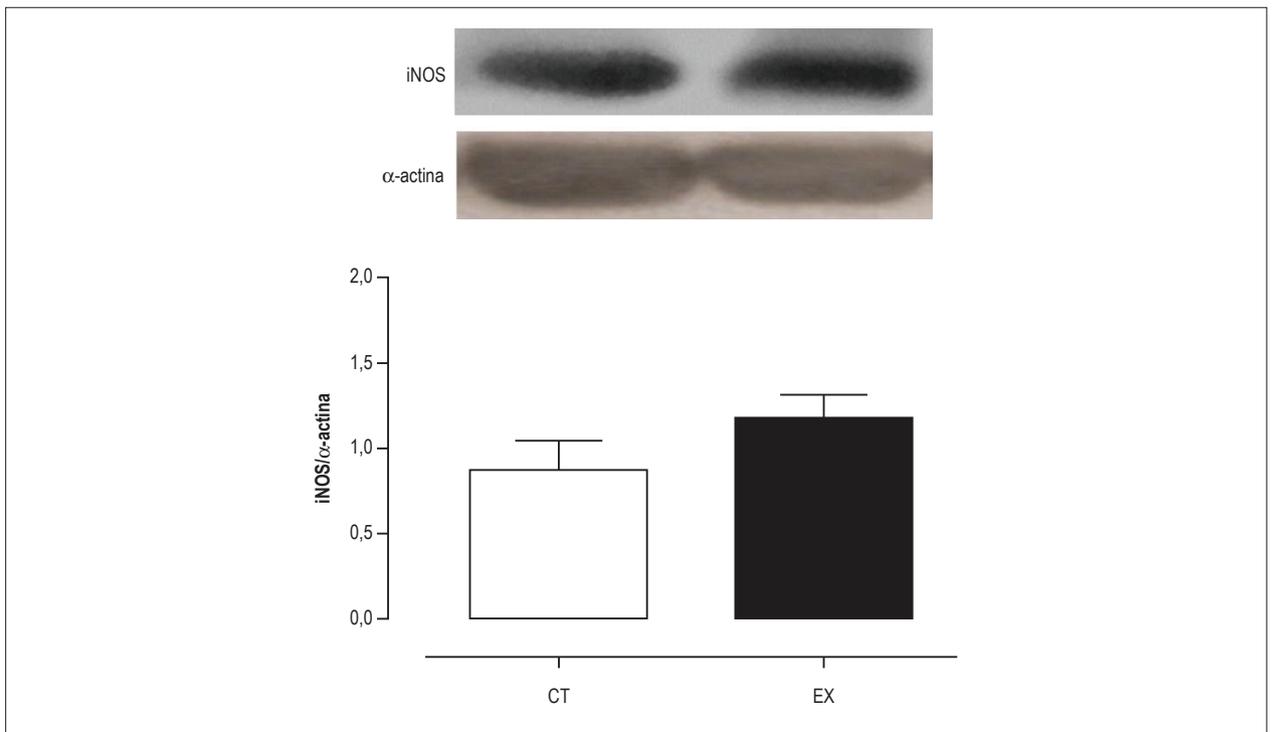


Figura 3 – iNOS determinado por análise Western blot na aorta de ratos controles (Ct) e exercitados (Ex). Média \pm EPM (n = 7).

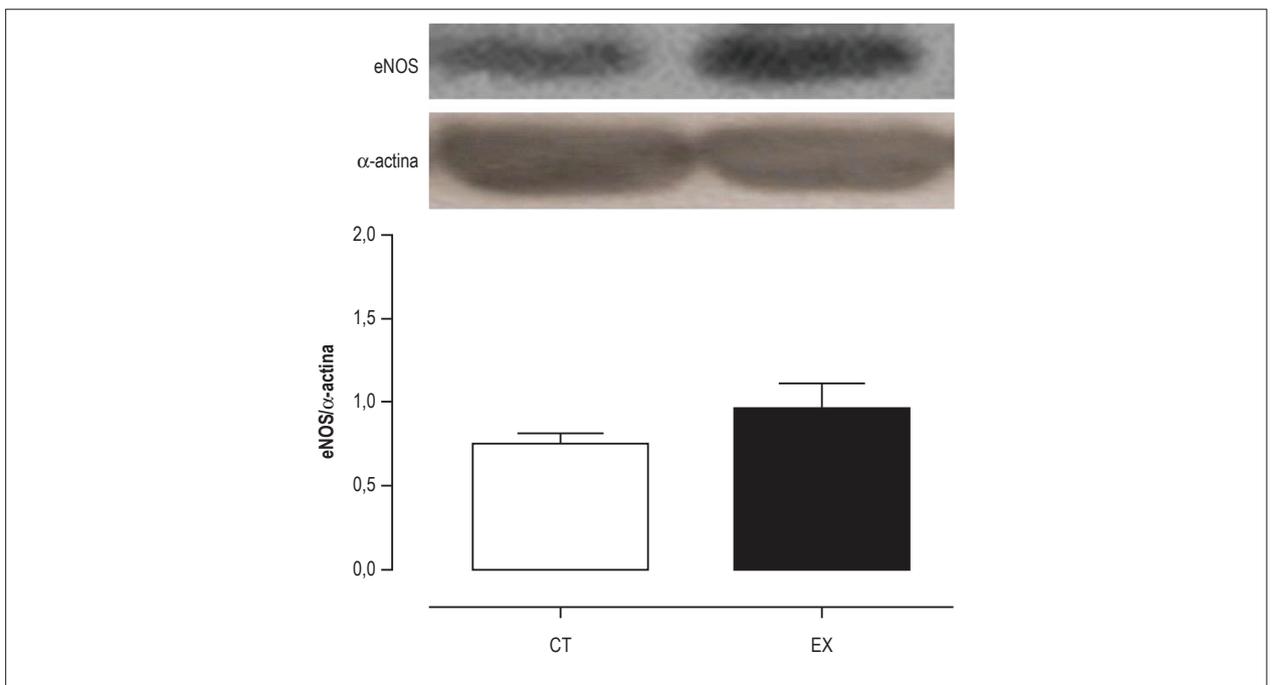


Figura 4 – Efeitos do exercício no nível de proteína. eNOS determinado por análise Western blot na aorta de ratos controles (Ct) e exercitados (Ex). Média \pm EPM (n = 7).

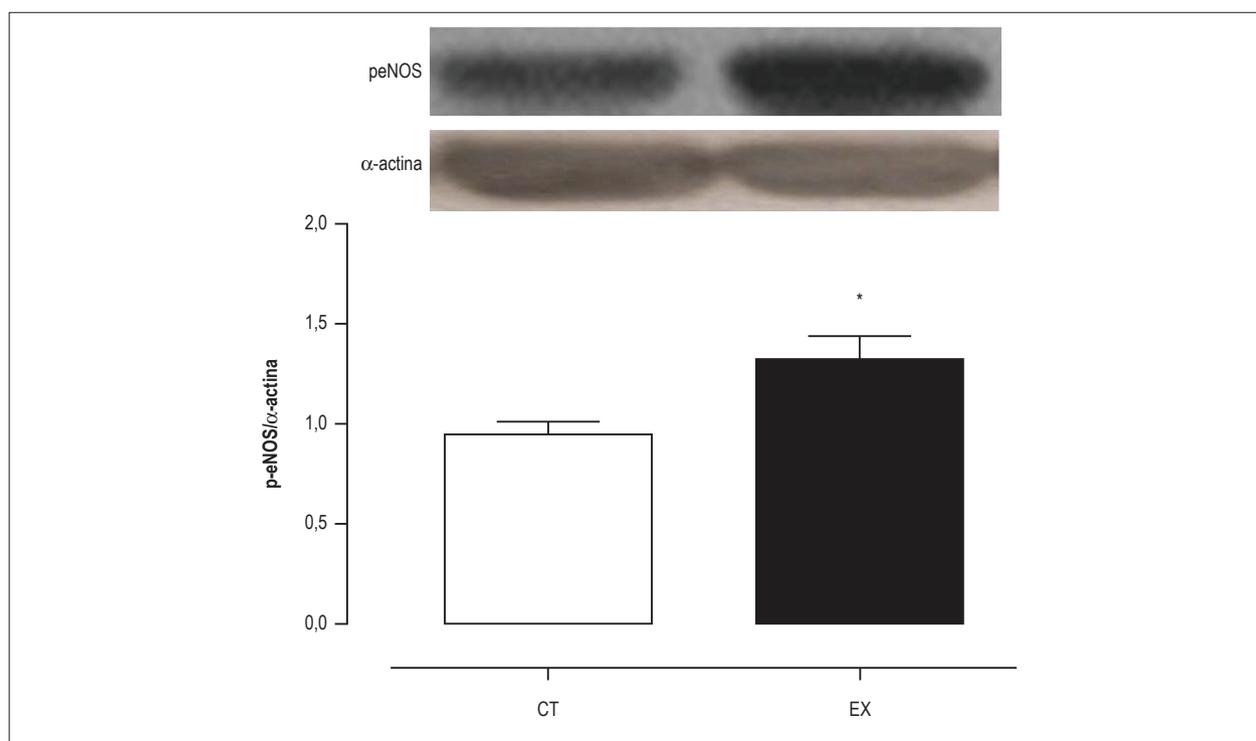


Figura 5 – Efeitos do exercício no nível de proteína. Fosforilação da eNOS na posição Ser1177 como determinado por análise Western blot na aorta de ratos controles (Ct) e exercitados (Ex). Média ± EPM (n = 7). *p < 0,05 vs. CT.

Usando métodos similares, Howard et al.²⁰ mostraram que uma única sessão de exercício resistido reduziu a resposta à FEN em coelhos normotensos. Ainda, Patil et al.³⁰ relataram *in vivo* uma significativa atenuação da resposta vasoconstritora máxima à FEN nas artérias ilíacas de ratos Sprague-Dawley após uma única sessão de corrida. Tal resposta foi abolida com a inibição da síntese de NO. Da mesma forma, no presente estudo, a resposta à FEN após exercício retornou aos níveis de controle com a administração de L-NAME, sugerindo haver aumento da produção de NO durante a recuperação após exercício. Rao et al.²² também demonstraram uma significativa redução na resposta à FEN nas artérias femorais de SHR após exercício agudo em esteira, que foi abolida após inibição da síntese de NO com L-NAME. Em seres humanos, a inibição da síntese de NO também abole a resposta vasodilatadora após exercício agudo.³¹ Nossos resultados estão de acordo com os dados obtidos de experimentos com exercício crônico. Chen et al.¹⁹ mostraram que a redução da resposta vascular a norepinefrina após treino em esteira foi mediada por NO. Da mesma maneira, Chen et al.¹⁸ demonstraram uma redução na sensibilidade à norepinefrina e à FEN na aorta de SHR e ratos Wistar Kyoto após treino em esteira, devido ao aumento da produção de NO.

Portanto, parece que tanto o exercício agudo quanto o crônico desencadeiam uma redução na resposta vascular primariamente mediada por aumento da síntese de NO. Entretanto, os mecanismos subjacentes que aumentam a produção de NO após exercício agudo e crônico são

diferentes. Foi relatado que o exercício aumenta a expressão de eNOS.^{26,32} Investigamos se a expressão de proteína de eNOS e iNOS aumentava após uma única sessão de exercício resistido. Como esperado, a expressão dessas isoformas não se alterou após exercício agudo, porque é improvável que uma única sessão de exercício represente suficiente estímulo para induzir expressão de proteína. Como a ativação de eNOS depende de um padrão de fosforilação de sítios bem caracterizados,³³ levantamos a hipótese de que a fosforilação de eNOS pudesse ser o mecanismo envolvido na produção de NO após exercício agudo; consequentemente, medimos os níveis de proteína p-eNOS1177. O aminoácido serina na posição 1177 é o sítio primário de ativação da fosforilação de eNOS, e, quando modulado por Akt quinase (também conhecida como proteína B quinase) e eNOS, demonstra aumento da sensibilidade às concentrações basais de Ca²⁺/calmodulina.³⁴ O nível da proteína p-eNOS1177 aumentou significativamente após exercício resistido agudo quando comparado ao de ratos controles, indicando que eNOS é ativado após exercício resistido agudo. Tal achado confirma nossa hipótese de que a diminuição da vasoconstricção e o aumento da vasodilatação após exercício estimulada por ACT foram mediados por NO. Alguns fatores envolvidos na ativação de eNOS e, consequentemente, na síntese de NO, como estresse de cisalhamento, hipóxia e liberação de catecolamina, estão presentes durante exercício e na recuperação depois do exercício. Logo, após exercício, a atividade de eNOS poderia permanecer elevada por maior tempo, reduzindo a reatividade vascular mediada por NO.

Para investigar o possível papel dos prostanoídeos vasodilatadores na redução da resposta vascular após exercício, avaliamos a resposta à FEN na presença de indometacina, um inibidor da COX. Diferentemente dos resultados obtidos na artéria da cauda em estudos prévios,¹² a resposta aórtica foi significativamente diminuída após inibição da COX (Figura 2C) em ratos controles e exercitados. Tal resposta pode ser explicada pela elevação da produção de prostanoídeo vasoconstritor induzida por COX em ratos hipertensos.³⁵ Além disso, o aumento da síntese de prostanoídeo mostrou resultar do aumento da atividade de COX-2. Nossos dados indicam um importante efeito de uma única sessão de exercício resistido. Como observado na Figura 2, a porcentagem da área sob a curva foi maior após o exercício, sugerindo que o exercício resistido agudo diminua a liberação de prostanoídeo vasoconstritor nos vasos. A disfunção endotelial presente na hipertensão arterial aumenta a produção de prostanoídeo vasoconstritor,³⁵⁻³⁸ e uma única sessão de exercício resistido tem importante impacto no aprimoramento da função vascular, pois reduz a liberação de prostanoídeo vasoconstritor. Além disso, está bem estabelecido que o NO pode regular a atividade de enzimas COX,³⁹ e a atividade de NOS é aumentada quando a via COX é inibida por indometacina.⁴⁰

Conclusões

Este estudo demonstrou que uma única sessão de exercício resistido diminuiu a resposta vascular à FEN e aumentou o relaxamento endotélio-dependente mediado por ACT em SHR. Tal adaptação parece ser mediada por NO, devido à elevação dos níveis da proteína p-eNOS117.

Referências

1. Giannotti G, Doerries P, Mocharla PS, Mueller MF, Bahlmann FH, Horvath T, et al. Impaired endothelial repair capacity of early endothelial progenitor cells in prehypertension: Relation to endothelial dysfunction. *Hypertension*. 2010;55(6):1389-97.
2. Gkaliagkousi E, Douma S, Zamboulis C, Ferro A. Nitric oxide dysfunction in vascular endothelium and platelets: role in essential hypertension. *J Hypertens*. 2009;27(12):2310-20.
3. Mordi I, Mordi N, Delles C, Tzemos N. Endothelial dysfunction in human essential hypertension. *J Hypertens*. 2016;34(8):1464-72.
4. Lee L, Webb RC. Endothelium-dependent relaxation and L-arginine metabolism in genetic hypertension. *Hypertension*. 1992;19(5):435-41.
5. Luscher TF, Diederich D, Weber E, Vanhoutte PM, Buhler FR. Endothelium-dependent responses in carotid and renal arteries of normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*. 1988;11(6 Pt 2):573-8.
6. Chou TC, Yen MH, Li CY, Ding YA. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension*. 1998;31(2):643-8.
7. Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Di Paola R, Caputi AP, Salvemini D. Superoxide: a key player in hypertension. *FASEB*. 2004;18(1):94-101.
8. Chen HI, Kao SL, Tsai MH, Shiao MS, Jen CJ. Exercise training modulates the effects of lipoproteins on acetylcholine-induced endothelial calcium signaling in rat aortas. *Exp Biol Med*. 2009;234(3):323-31.
9. Clarkson P, Montgomery HE, Mullen MJ, Donald AE, Powe AJ, Bull T, et al. Exercise training enhances endothelial function in young men. *J Am Coll Cardiol*. 1999;33(5):1379-85.
10. Montero D. The association of cardiorespiratory fitness with endothelial or smooth muscle vasodilator function. *Eur J Prev Cardiol*. 2015;22(9):1200-11.
11. Siasos G, Athanasiou D, Terzis G, Stasinaki A, Oikonomou E, Tsitkanou S, et al. Acute effects of different types of aerobic exercise on endothelial function and arterial stiffness. *Eur J Prev Cardiol*. 2016;23(14):1565-72.
12. Faria T de O, Targueta GP, Angeli JK, Almeida EA, Stefanon I, Vassallo DV, et al. Acute resistance exercise reduces blood pressure and vascular reactivity, and increases endothelium-dependent relaxation in spontaneously hypertensive rats. *Eur J Appl Physiol*. 2010;110(2):359-66.
13. Cheng L, Yang C, Hsu L, Lin MT, Jen CJ, Chen H. Acute exercise enhances receptor-mediated endothelium-dependent vasodilation by receptor upregulation. *J Biomed Sci*. 1999;6(1):22-7.
14. Baraúna VG, Batista ML Jr, Costa Rosa LF, Cassarini DE, Krieger JE, Oliveira EM. Cardiovascular adaptations in rats submitted to a resistance-training model. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005;32(4):249-54. Erratum in: *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008;35(5-6):714.
15. Tamaki T, Uchiyama S. A weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hindlimb muscles of rats. *Med Sci Sports Exerc*. 1992;24(8):881-6.

Além disso, a presente investigação mostra que o exercício resistido agudo pode reduzir a produção de prostanoídeos vasodilatadores nos anéis aórticos de SHR. Assim, nossos achados sugerem que a prática de exercício resistido, mesmo de uma única sessão, possa ter grande relevância clínica para o controle da hipertensão.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Stefanon I, Vassallo DV, Lizardo JHF; Obtenção de dados: Faria TO, Angeli JK, Mello LGM, Pinto GC, Lizardo JHF; Análise e interpretação dos dados: Faria TO, Angeli JK, Mello LGM, Stefanon I, Vassallo DV, Lizardo JHF; Análise estatística: Faria TO, Angeli JK, Lizardo JHF; Obtenção de financiamento: Stefanon I, Vassallo DV; Redação do manuscrito: Faria TO, Lizardo JHF; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Faria TO, Angeli JK, Mello LGM, Pinto GC, Stefanon I, Vassallo DV, Lizardo JHF.

Potencial conflito de interesse

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pelo CNPq.

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Juliana Hott de Fúcio Lizardo pela Universidade Federal do Espírito Santo.

16. Angeli JK, Ramos DB, Casali EA, Souza DO, Sarkis JJ, Stefanon I, et al. Gadolinium increases the vascular reactivity of rat aortic rings. *Braz J Med Biol Res.* 2011;44(5):445-52.
17. Lizardo JH, Silveira EA, Vassallo DV, Oliveira EM. Post-resistance exercise hypotension in spontaneously hypertensive rats is mediated by nitric oxide. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008;35(7):782-7.
18. Chen HI, Chiang IP, Jen CJ. Exercise training increases acetylcholine-stimulated endothelium-derived nitric oxide release in spontaneously hypertensive rats. *J Biomed Sci.* 1996;3(6):454-60.
19. Chen HI, Li HT, Chen CC. Physical conditioning decreases norepinephrine-induced vasoconstriction in rabbits: possible roles of norepinephrine-evoked endothelium-derived relaxing factor. *Circulation.* 1994;90(2):970-5.
20. Howard MG, DiCarlo SE. Reduced vascular responsiveness following a single bout of dynamic exercise in the conscious rabbit. *J Appl Physiol* (1985). 1992;73(6):2662-7.
21. Jen CJ, Chan HP, Chen HI. Acute exercise enhances vasorelaxation by modulating endothelial calcium signaling in rat aortas. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282(3):H977-82.
22. Rao SP, Collins HL, DiCarlo SE. Postexercise α -adrenergic receptor hyporesponsiveness in hypertensive rats is due to nitric oxide. *Am J Physiol Integrative Comp Physiol.* 2002;282(4):R960-8.
23. Spier SA, Laughlin MH, Delp MD. Effects of acute and chronic exercise on vasoconstrictor responsiveness of rat abdominal aorta. *J Appl Physiol* (1985). 1999;87(5):1752-7.
24. Goto C, Higashi Y, Kimura M, Noma K, Hara K, Nakagawa K, et al. Effect of different intensities of exercise on endothelium-dependent vasodilation in humans: role of endothelium-dependent nitric oxide and oxidative stress. *Circulation.* 2003;108(5):530-5.
25. Goto C, Nishioka K, Umemura T, Jitsuiki D, Sakaguchi A, Kawamura M, et al. Acute moderate-intensity exercise induces vasodilation through an increase in nitric oxide bioavailability in humans. *Am J Hypertens.* 2007;20(8):825-30.
26. Sessa WC, Pritchard K, Seyedi N, Wang J, Hintze TH. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide synthase production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res.* 1994;74(2):349-53.
27. McGowan CL, Visocchi A, Faulkner M, Rakobowchuk M, McCartney N, et al. Isometric handgrip training improves endothelial function in persons medicated for hypertension. [Abstract]. *Exp Clin Cardiol.* 2004;9:68.
28. McGowan CL, Levy AS, Millar PJ, Guzman JC, Morillo CA, McCartney N, et al. Acute vascular responses to isometric handgrip exercise and effects of training in persons medicated for hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(4):H1797-802.
29. Maiorana A, O'Driscoll G, Dembo L, Cheetham C, Goodman C, Taylor R, et al. Effect of aerobic and resistance exercise training on vascular function in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279(4):H1999-2005.
30. Patil RD, DiCarlo SE, Collins HL. Acute exercise enhances nitric oxide modulation of vascular response to phenylephrine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1993;265(4 Pt 2):H1184-8.
31. Shoemaker JK, Halliwill JR, Hughson RL, Joyner MJ. Contributions of acetylcholine and nitric oxide to forearm blood flow at exercise onset and recovery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1997;273(5 Pt 2):H2388-95.
32. Sun D, Huang A, Koller A, Kaley G. Short-term daily exercise activity enhances endothelial NO synthesis in skeletal muscle arterioles of rats. *J Appl Physiol* (1985). 1994;76(5):2241-7.
33. Mount PF, Kemp BE, Power DA. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;42(2):271-9.
34. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature.* 1999;399(6736):597-601. Erratum in: *Nature* 1999;400(6746):792.
35. Tang EH, Vanhoutte PM. Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. *Physiol Genomics.* 2008;32(3):409-18.
36. Dohi Y, Kojima M, Sato K. Benidipine improves endothelial function in renal resistance arteries of hypertensive rats. *Hypertension.* 1996;28(1):58-63.
37. Taddei S, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to endothelin in the rat aorta are mediated by thromboxane A2. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993;22 Suppl 8:S328-31.
38. Zhou MS, Nishida Y, Chen QH, Kosaka H. Endothelium-derived contracting factor in carotid artery of hypertensive Dahl rats. *Hypertension.* 1999;34(1):39-43.
39. Salvemini D, Misko T, Masferrer J, Seibert K, Currie M, Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Aca. Sci USA.* 1993;90(15):7240-4.
40. Illiano S, Marsault R, Descombes JJ, Verbeuren T, Vanhoutte PM. Regulation of nitric oxide-like activity by prostanoids in smooth muscle of the canine saphenous vein. *Br J Pharmacol.* 1996;117(2):360-4.