

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE EDUCAÇÃO FÍSICA E DESPORTOS**

VANESSA DA SILVA ROCHA

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA À FUMAÇA DO CIGARRO NA
REATIVIDADE EM AORTA DE RATOS TREINADOS: PAPEL DO
ENDOTÉLIO VASCULAR**

VITÓRIA

2013

VANESSA DA SILVA ROCHA

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA À FUMAÇA DO CIGARRO NA
REATIVIDADE EM AORTA DE RATOS TREINADOS: PAPEL DO
ENDOTÉLIO VASCULAR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Educação Física e Desportos da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Educação Física.

Orientador (a): Prof^a Dr^a Márcia Regina Holanda da Cunha

VITÓRIA

2013

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar se a exposição aguda à fumaça de cigarros (EFC) altera as respostas contráteis à fenilefrina em anéis de aorta de ratos submetidos à natação. Foram utilizados ratos *Wistar* (250-300g) divididos em 4 grupos: CONTROLE (N=6), FUMO (exposição aguda à fumaça de cigarros, 1 vez/dia/5 dias N=6), TRN (submetidos à natação, 5 vezes/semana, 60 min./dia, N=6) e TRN+FUMO (submetidos à natação e à EFC, N=6). Após a última exposição, ratos foram anestesiados e decapitados. A reatividade vascular foi avaliada por doses crescentes de FENILEFRINA (10^{-12} a 10^{-3} M) em anéis com endotélio preservado (E+), após bloqueios com L-NAME (100 μ M) e INDOMETACINA (10 μ M) e em anéis sem endotélio (E-). Observamos que anéis com E+ houve um aumento na resposta contrátil máxima (RMax) do grupo TRN+FUMO ($75 \pm 7\%$) em relação ao TRN ($54 \pm 4\%$, $^{\#}p<0,05$). Em anéis E-, não houve diferença na RMax entre os grupos TRN+FUMO e TRN (123 ± 4 vs $138 \pm 12\%$, respectivamente), assim como no bloqueio pela INDOMETACINA (93 ± 2 vs $103 \pm 12\%$, respectivamente). O bloqueio com L-NAME não foi capaz de inibir o aumento da RMax à FENILEFRINA nos grupos TRN+FUMO e TRN ($155 \pm 13^{\#\#}$ vs $113 \pm 4\%$, $^{\#\#}p<0,05$). Concluímos que a exposição aguda à fumaça de cigarros altera a RMax de anéis de aorta de ratos submetidos ao exercício físico por participação do endotélio vascular.

Palavras-chave: Anéis de aorta. Natação. Fumaça do cigarro

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate whether acute exposure to cigarette smoke (ECS) changes the contractile responses to phenylephrine in aortic rings of rats submitted to swimming. Wistar rats (250-300g) were divided into 4 groups: CONTROL (N=6), SMOKE (acute exposure to cigarette smoke, 1 time/day/5days; N=6), TRN (submitted to swimming, 5 times/week, 60 min./day, N=6) and TRN+SMOKE (submitted to swimming and the ECS, N=6). After the last exposure, rats were anesthetized and decapitated. Vascular reactivity was assessed by increasing doses of phenylephrine (10^{-12} to 10^{-3} M) in rings with preserved endothelium (E+) after blocking with L-NAME (100 μ M) and indomethacin (10 μ M) and ring without endothelium (E-). We note that rings with E+ there was an increase in the contractile response maximum (RMax) group TRN+SMOKE ($75 \pm 7^{\#}$ %) compared to the TRN ($54 \pm 4\%$, $^{\#}p < 0.05$). In E- rings, there was no difference between RMax in groups TRN and SMOKE+TRN (123 ± 4 vs $138 \pm 12\%$, respectively), as well as blockade by INDOMETHACIN (93 ± 2 vs $103 \pm 12\%$, respectively). Blocking with L-NAME was not able to inhibit the increase of RMax phenylephrine in groups TRN+SMOKE and TRN ($155 \pm 13^{\#\#}$ vs $113 \pm 4\%$, $^{\#\#}p < 0.05$). We conclude that acute exposure to cigarette smoke alters the RMax of aortic rings of rats subjected to physical participation by the vascular endothelium.

Keywords: Aortic rings. Swimming. Cigarette smoke.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	14
3.2 PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO.....	15
3.3 EXPOSIÇÃO AO FUMO.....	15
3.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	16
3.4.1 Retirada e preparação da aorta.....	16
3.4.2 Avaliação da reatividade vascular.....	17
3.4.3 Avaliação da integridade endotelial.....	18
3.4.4 Estudo da resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	18
3.4.5 Estudo da resposta vasoconstritora à fenilefrina na presença de L-NAME.....	18
3.4.6 Estudo da resposta vasoconstritora à fenilefrina na presença de Indometacina.....	19
3.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO TECIDO CARDÍACO.....	19
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
4 RESULTADOS	21
4.1 PARTICIPAÇÃO DA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA.....	21
4.2 PARTICIPAÇÃO DO ENDOTÉLIO NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA.....	22
4.3 PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA.....	23
4.4 PARTICIPAÇÃO DA CICLOOXIGENASE NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA.....	24
4.5 AVALIAÇÃO DO PESO DAS CÂMARAS CARDÍACAS.....	25
5 DISCUSSÃO	26

6 REFERÊNCIAS.....	29
---------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

O tabagismo é a principal causa de morte evitável a nível mundial, representando uma epidemia global que afeta tanto os países desenvolvidos quanto os subdesenvolvidos. Os dados epidemiológicos mostram que o número de mortes tabágica vem crescendo mundialmente e já representa mais de cinco milhões de sujeitos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012). No Brasil, segundo a Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, aproximadamente 200 mil indivíduos morrem por ano. Se os números de consumidores de cigarros não diminuirmos, estima-se que em 2030 mais de 8 milhões da população mundial virá a óbito por ano, incidindo num importante problema econômico para a saúde pública (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2011).

O cigarro apresenta um complexo número de substâncias tóxicas que ainda não foram totalmente identificadas. A fumaça do cigarro contém cerca de 4.700 elementos químicos já conhecidos que são aspirados ou inalados. O cigarro quando aceso emite dois tipos de fumaça, a chamada de principal, geralmente exalada diretamente pelos fumantes ativos; e a fumaça secundária, emitida para a atmosfera a partir da queima da ponta do cigarro, e inalada de forma indireta pelos fumantes passivos. Muitos componentes tóxicos e cancerígenos são encontrados em concentrações mais elevadas na fumaça secundária do que aqueles contidos na fumaça da via principal (SMITH; FISCHER, 2001). Uma explicação plausível é a temperatura na ponta do cigarro que chega a 900 graus Celsius (°C) incidindo na combustão completa, pois há oxigênio suficiente para o processo da combustão. Diferente do que acontece nos intervalos entre as tragadas, a temperatura é menor em torno de 600°C, o que promove uma queima incompleta diminuindo o oxigênio e, conseqüentemente, menor combustão, sendo produzida uma abundância de substâncias químicas (TAYLOR; JOHNSON; KAZEMI, 1992; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2008).

O tabagismo contribui para a etiologia e o aumento da incidência de diversas patologias como cânceres (pulmão, boca e outros), impotência sexual masculina, hipertensão, aterosclerose, angina pectoris, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral (AVC), insuficiência cardiorrespiratória entre outras, as quais estão associadas com o prejuízo da qualidade de vida e o aumento da mortalidade (ROSEMBERG, 2003). No tabagismo a nicotina, o alcatrão, e os

produtos da queima do cigarro, como o monóxido de carbono, são responsáveis principalmente pelos efeitos deletérios ao sistema cardiovascular. Esses elementos são extremamente reativos e estão presentes na fumaça do cigarro e podem induzir numa maior oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), redução da lipoproteína de alta densidade (HDL), aumento dos níveis das moléculas de adesão fibrinogênio, aumento da agregação plaquetária, formação de trombos, aumento da atividade adrenérgica, disfunção endotelial (SMITH; FICHER, 2001; PAIVA et al., 2003).

Evidências experimentais mostram que a exposição à fumaça do cigarro em ratos *wistar*, por trinta dias não acarretou em alteração mecânicas no músculo papilar isolado, entretanto, a estrutura cárdica avaliada por meio do ecocardiograma, apresentou aumento do diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo e diminuição da fração de encurtamento sistólico e da fração de ejeção, quando comparado aos animais que não foram expostos a fumaça do cigarro. Desse modo, apesar da função do músculo permanecer conservada os animais submetidos à fumaça do cigarro apresentaram uma atenuação da função da câmara do ventrículo esquerdo (PAIVA et al., 2003). Confirmando tal achados Castardeli et al. (2005), ao submeter animais por quatro meses à fumaça do cigarro, mostraram que o átrio esquerdo encontrava-se maior, houve um aumento do diâmetro diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo, resultando em remodelação cardíaca, quando comparado aos animais não expostos ao tabagismo. Além disso, o tabagismo ainda provoca vasoconstrição em artérias coronarianas mediada pela estimulação alfa-adrenérgica (α -adrenérgica) afetando na constrição proximal e distal das artérias coronarianas e no aumento do tônus em vasos de resistência. Além de danificar as paredes dos vasos sanguíneos, tornando-os menos elásticos (JÚNIOR; TOLEDO; MELO, 2005).

Os vasos sanguíneos morfologicamente são descritos por possuírem basicamente três camadas (ou túnicas): a adventícia, a média e a íntima (Figura 1).

A camada adventícia tem a função de recobrir externamente os vasos sanguíneos e consiste de tecido conjuntivo denso composto de fibroblastos, fibras colágenas, elásticas e terminações nervosas e pequenos vasos sanguíneos que abastecem o tecido da parede do vaso. A túnica média é a camada intermediária (entre a adventícia e a íntima) composta de células musculares lisas, fibras colágenas e uma pequena quantidade de tecido conjuntivo elástico. Esta camada é responsável em regular o fluxo sanguíneo e a pressão arterial, ou seja, a

capacidade de aumentar ou diminuir o diâmetro quando submetido a uma determinada pressão interna. A camada íntima conhecida como endotélio vascular, fica situada entre o sangue circulante e a camada média revestindo internamente os vasos sanguíneos, e é constituída por uma única camada de células endoteliais (TORTORA; DERRICKSON, 2010; SILVA; ZANESCO, 2010).

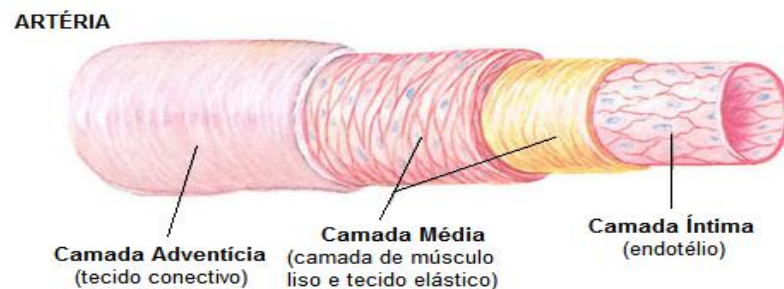


Figura 1 - Estrutura morfológica dos vasos sanguíneos a camada adventícia, a camada média e a camada íntima.

O endotélio é uma monocamada de revestimento pavimentoso simples com células alongadas e com núcleo saliente, na qual encontra-se vesículas ou invaginações chamadas de cavéolas. A cavéola é a região que confere a presença de receptores, moléculas efetoras e sinalizadoras que regulam o tônus vascular, a trombose, a coagulação, o tráfego de leucócito (GALLEY; WEBSTER, 2004; NASCIMENTO PATRIARCA; HEIMANN, 2005). O endotélio é um órgão endócrino, que além de representar uma barreira física entre o lúmen e a parede do vaso, a sua localização estratégica controla ativamente a homeostasia da parede vascular. Além de que, regula ativamente o tônus vascular e a reatividade vascular, advindas de estímulos humorais, neurais, químicos e mecânicos, sintetizando e liberando uma variedade de substâncias contráteis e relaxantes desempenhando um papel relevante na circulação (FURCHGOTT; VANHOUTTE, 1989; CANNON, 1998).

O endotélio libera e sintetiza substâncias vasoativas conhecidas, como: fatores relaxantes derivados do endotélio - EDRF (óxido nítrico, prostaciclina e o fator hiperpolarizante derivados do endotélio) e fatores constritores derivados do endotélio - EDCF (endotelina, prostanóides, angiotensina e espécies reativas de oxigênio) (JASPERSE; LAUGHLIN, 2006). Vale ressaltar que na homeostasia o tônus vascular é advindo pelo equilíbrio dos fatores vasoconstritores e vasodilatadores (Figura 2). Caso ocorra perda da integridade funcional ou

disfunção endotelial, isso resultará em desequilíbrio na produção e/ou liberação dos fatores relaxantes e contráteis vasculares estando associado a alterações no sistema vascular (MATHER et al., 2002; CARVALHO et al., 2005).

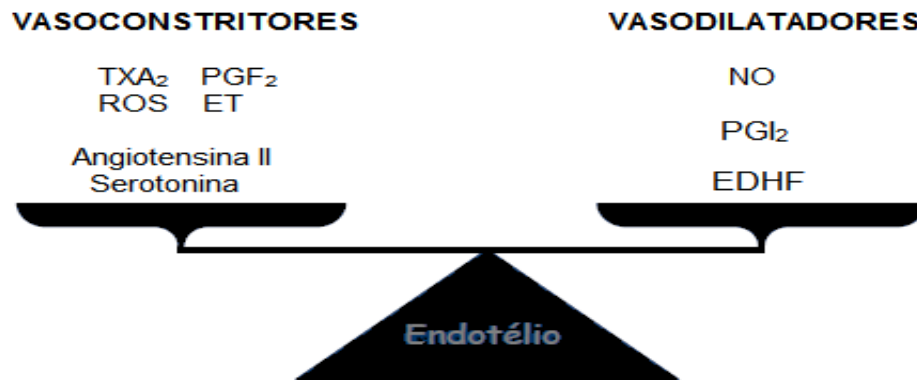


Figura 2 - Fatores vasoconstritores e vasodilatadores derivados do endotélio. NO – óxido nítrico; PGI₂ – Prostaciclina; EDHF – fator hiperpolarizante derivado do endotélio; TXA₂ – tromboxano; PGF₂ – prostaglandinas; ET – endotelina; ROS – espécies reativas de oxigênio.

Dentre as substâncias relaxantes derivadas do endotélio, ressalta-se a participação do óxido nítrico (NO), por ser um gás instável e lipossolúvel é também a principal substância vasodilatadora sintetizado nas células endoteliais, a partir do aminoácido L-arginina por ação da enzima óxido nítrico sintase (BRANDÃO; PINGE, 2007). Quando o endotélio encontra-se intacto, o NO é essencial para inibir a agregação plaquetária, a adesão de monócitos e leucócitos e a proliferação celular (CARVALHO et al., 2005). Atualmente, três isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS) foram identificadas, uma é expressa como induzível (iNOS) localizada em macrófagos, leucócitos polimorfonucleares entre outros e é independente de cálcio. E duas são expressa constitutiva, isto é, são dependentes de cálcio, na qual temos a NOS neural (nNOS) presente em neurônios e a NOS endotelial (eNOS) encontrada em plaquetas e principalmente nas células endoteliais vasculares (MONCADA; HIGGS; FURCHGOTT, 1997; GALLEY; WEBSTER, 2004).

No endotélio vascular, a eNOS encontra-se inativa quando associada a proteína caveolina-1 (Cav-1). A dissociação da ligação eNOS+Cav-1, acontece a partir do aumento da concentração de cálcio (Ca²⁺) intracelular, favorecendo na interação do complexo Ca²⁺-calmodulina, resultando na ativação da eNOS (GRATTON; BERNATCHEZ; SESSA, 2004). Com a eNOS ativa, ocorre hidroxilação do aminoácido L-arginina que será formado N^G-

hidroxil-L-arginina para em seguida ser convertida em citrulina (bioinativo) e NO (bioativo) (GOLIGORSKY et al., 2002; DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003). Em seguida, o NO (Figura 3) se difunde para o músculo liso vascular estimulando a guanilato ciclase solúvel (GCs), que cataliza a saída de dois fosfatos de guanosina trifosfato (GTP), elevando os níveis de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). A formação de GMPc, promove a ativação da bomba de cálcio dentro da célula muscular lisa, diminuindo as concentrações de cálcio intracelular, o que promoverá a redução do tônus vascular, isto é, o relaxamento dos vasos sanguíneos (WEBB, 2003). Vale ressaltar, que todas as isoformas de NOS podem ser inibidas por análogos da arginina, como a *N^G-monometil-L-arginina* (L-NMMA), *N-imino-etil-Lornitina* (L-NIO), *N^G-amino-L-arginina* (L-NAA), *N^G-nitro-L-arginina* (L-NA) e o metil éster correspondente ao *N^G-nitro-L-arginina-metil-éster* (L-NAME) (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

Além do NO, outras substâncias vasodilatadoras são liberadas pelo endotélio a prostaciclina (PGI_2) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (LAURINDO; LIBERMAN; LEITE, 2005). A prostaciclina (PGI_2) foi o primeiro mediador vasorrelaxante endotelial identificado, e é o produto mais abundante do ácido araquidônico produzido pelo tecido vascular, sua meia vida é maior do que a do óxido nítrico (NARUMIYA, SUGIMOTO; USHIKUBI, 1999). É responsável pelo relaxamento do músculo liso e uma potente inibidora da agregação plaquetária. A síntese da PGI_2 nas células endoteliais é desencadeada por ação da enzima fosfolipase A_2 , que hidrolisa os fosfolipídios de membrana, provocando a liberação do ácido araquidônico (AA). O ácido araquidônico é oxidado pela enzima ciclooxigenase, dando origem a PGI_2 (MICHELINI; ROSSONI, 2008).

A ação da PGI_2 nas células endoteliais (Figura 3) é desencadeada por vários estímulos, incluindo fatores mecânicos (força de cisalhamento), substâncias endógenas derivadas do plasma (bradicinina, trombina), entre outros. Em seu mecanismo de ação vasorrelaxante, a PGI_2 nas células do músculo liso ativa receptores específicos na membrana acoplado a proteína G, ativando a adenilato ciclase. A ativação dessa enzima cliva o trifosfato de adenosina (ATP) em monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), o que é o segundo mensageiro que aciona os efeitos da PGI_2 (CARVALHO et al., 2001; MICHELINI; ROSSONI, 2008).

Já o Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio – EDHF (Figura 3) tem sido apontado como responsável pelo relaxamento de vasos com diâmetro menores, e sua identificação química ainda permanece uma incógnita. A vasodilatação é seguida por hiperpolarização das células musculares lisas. Esta hiperpolarização da célula do músculo liso vascular ocorre pela participação dos canais de potássio (K^+) dependentes de cálcio (Ca^{2+}). A diminuição da concentração de K^+ intercelular ativa a sódio/potásio ATPase (Na^+/K^+ ATPase) e os canais K^+ retificadores, contribuindo para a hiperpolarização, que impede a ativação dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem que gera uma diminuição do Ca^{2+} citosólico resultando em relaxamento muscular (CARVALHO et al., 2005).

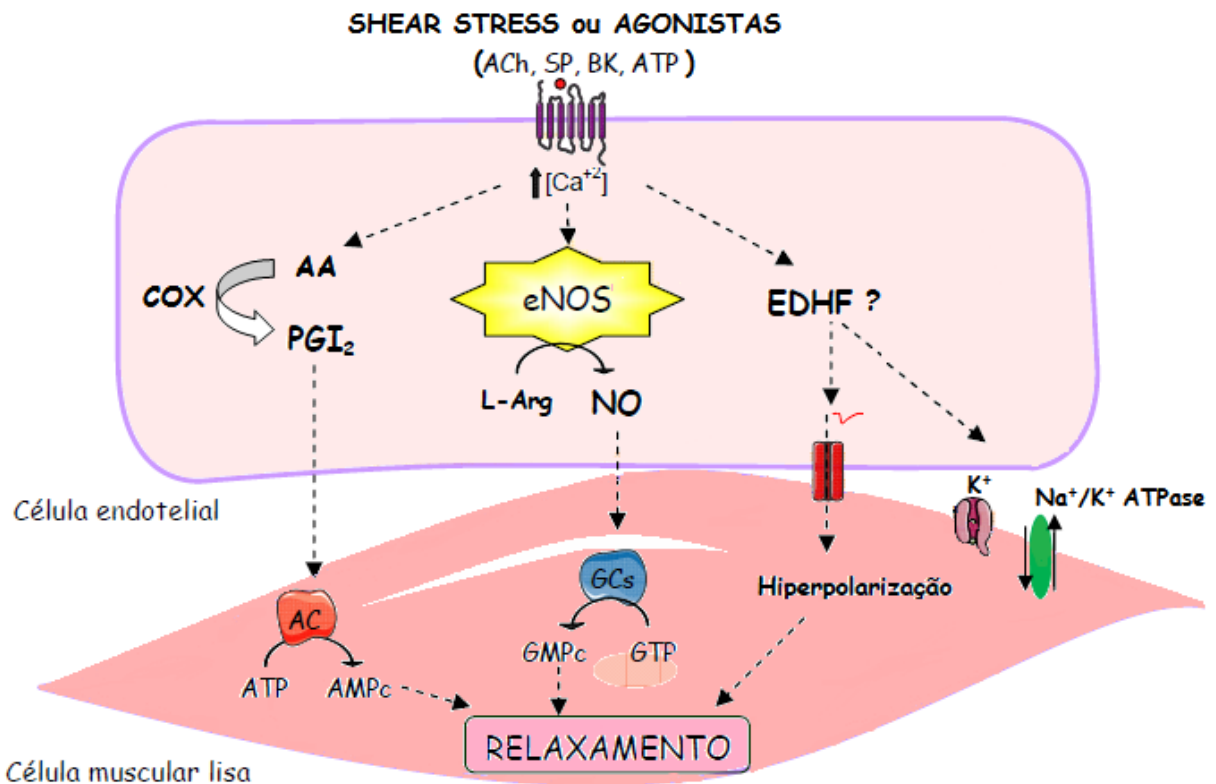


Figura 3 - Fatores vasodilatadores originado do endotélio e a ação no músculo liso vascular. Dentre os agonistas pode-se citar a acetilcolina (ACh), substância P (SP), bradicinina (BK), e adenosina trifosfato (ATP). Prostaciclina – PGI_2 ; óxido nítrico – NO ; fator hiperpolarizante derivado do endotélio – EDHF; L-arginina – L-arg; ácido araquidônico – AA; ciclooxigenase – COX; adenilato ciclase – AC; trifosfato de adenosina – ATP; monofosfato cíclico de adenosina – $AMPc$; guanosina ciclase solúvel – GCs; fosfato de guanosina trifosfato – GTP; monofosfato cíclico de guanosina – $GMPC$ (Adaptado MICHELINI; ROSSONI, 2008).

As alterações na liberação de substâncias relaxantes derivadas do endotélio podem ser encontradas em algumas situações patológicas, tais como as doenças cardiovasculares, diabetes, hipertensão arterial e também no exercício físico (MARSH; COOMBES, 2005). A

prática regular de exercício físico vem sendo usualmente utilizado como uma medida não-farmacológica no tratamento e/ou prevenção de patologias como hipertensão, diabetes *mellitus* tipo II, obesidade, dislipidemias, aterosclerose entre outras. Diminuindo assim, a incidência e a progressão de doenças cardiovasculares (MYERS, 2003). Durante o exercício, há uma sequência de demandas metabólicas, essas exigências metabólicas são salgadas pelo aumento na oferta de oxigênio e de substratos energéticos para a musculatura que está sendo exigida, implicando na vasodilatação muscular, através da produção de óxido nítrico (NEGRÃO; SANTOS; ALVES, 2005).

Após a descoberta do óxido nítrico, inúmeros estudos apontam que o treinamento físico provoca no vaso sanguíneo uma melhora na resposta vasodilatadora e atenuação vasoconstritora aos agonistas adrenérgicos tanto em humanos quanto em animais (CHEN; LI; CHEN, 1994; SPIER; LAUGHLIN; DELP, 1999; CLARKSON et al., 1999; CHIES et al., 2004) . Um dos motivos pelo qual o exercício melhora a produção do óxido nítrico parece ser devido ao *shear stress* ou estresse de cisalhamento (a força que o sangue exerce na parede do vaso durante o exercício), elevando o influxo de cálcio na célula endotelial que estimula a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) a produzir NO (MARSH; COOMBES, 2005).

Fica bem descrito na literatura, a importância da liberação do NO na melhora da função contrátil dos vasos sanguíneos após o exercício físico. Outros mecanismos, além destes podem corroborar com essa resposta em situações patológicas ou não. Mas não está bem definido se o exercício físico é capaz de evitar danos vasculares promovidos pelo tabagismo. Ou mesmo, se o tabagismo agudo é capaz de induzir alterações prejudiciais na estrutura vascular. Portanto, este trabalho investigará se cinco dias de exposição à fumaça do cigarro é capaz de alterar a resposta vasoconstritora vascular, e se o treinamento físico é capaz de proteger o endotélio frente à exposição aguda ao tabagismo, em ratos *wistar* submetidos ao treinamento de natação (cinco dias).

2 OBJETIVO

Avaliar se a exposição aguda (cinco dias) à fumaça de cigarros altera as respostas vasomotoras contráteis à fenilefrina em anéis de aorta de ratos submetidos à natação.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a resposta vasoconstritora à fenilefrina (FEN) em anéis de aorta sem o endotélio vascular de ratos treinados e sedentários expostos ou não a fumaça de cigarro;
- Avaliar a resposta vasoconstritora à fenilefrina (FEN) em anéis de aorta com o endotélio vascular intacto de ratos treinados e sedentários expostos ou não a fumaça de cigarro com ou sem bloqueio farmacológico com L-NAME (inibidor da síntese de óxido nítrico - NOS) e Indometacina (inibidor da ciclooxigenase).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizados ratos *wistar* machos (*Rattus norvegicus albinus*), com peso inicial de 250 a 300 g e com aproximadamente três meses de idade, provenientes do biotério central da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES. Os animais foram mantidos em caixas coletivas de polipropileno com a tampa de arame, forrada com maravalha de *pinus* esterilizada contendo até cinco animais por caixa. Dispostos em ambiente dotado de controle de temperatura que era mantida constante (25°C), e com ciclo claro-escuro de 12/12 horas (das 06h00min até as 18h00min). Ambos os grupos receberam água e comida (ração PRESENCE) *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES (Protocolo número: 057/2010; UFES). Para determinação e distribuição dos grupos, os animais foram escolhidos por uma tabela de números ao acaso.

3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos nos grupos:

Controle (Controle): composto por animais sem qualquer tratamento e que permaneceram sedentários e também não tiveram contato com a fumaça do cigarro.

Fumo (Fumo): composto por animais expostos agudamente à fumaça do cigarro.

Treinado (TRN): composto por animais submetidos ao treinamento de natação por oito semanas.

Treinado e Fumo (Fumo+TRN): composto por animais submetidos por oito semanas ao treinamento de natação e expostos agudamente à fumaça do cigarro.

3.2 PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO

O protocolo de treinamento com a natação foi realizado durante oito semanas, cinco vezes por semana com duração de 60 minutos/sessão. O exercício desenvolveu-se em uma piscina de vidro (comprimento 100 centímetros (cm) x largura 80 cm x altura 80 cm) com subdivisões, e com água a uma temperatura entre 32° e 35°C. A profundidade da piscina garantiu que os animais não alcançassem a cauda no fundo da piscina, impedindo a utilização do rabo como suporte.

O protocolo proposto consistiu de duas fases: a adaptação e o treinamento. Inicialmente, os animais passaram pelo período de adaptação ao meio aquático, durante os seis primeiros dias de treinamento. Assim sendo, no primeiro dia os animais exercitavam-se por dez minutos, e a cada dia aumentava progressivamente em dez minutos (10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos) até que os ratos nadassem por sessenta minutos. Já o treinamento consistiu de oito semanas, cinco vezes por semana e a duração da sessão diária era de sessenta minutos (5x/semana – 1 hora/dia). Os animais que não conseguiram nadar por sessenta minutos foram excluídos do treinamento (PORTES; TUCCI, 2006). A cada sessão foram colocados três ratos juntos na mesma raia para evitar que eles boiassem.

3.3 EXPOSIÇÃO AO FUMO

Os animais dos grupos Fumo e Fumo+TRN foram expostos diariamente por cinco dias a fumaça do cigarro. O cigarro empregado no experimento, segundo o fabricante, forneceu 1,1 miligramas (mg) de nicotina, 14 mg de alcatrão e 15 mg de monóxido de carbono. Empregamos o método descrito por Simani et al. (1974), adaptado por Wang et al. (1999) e padronizado por Paiva et al. (2003), que consiste em um artefato construído especialmente para expor animais à fumaça do cigarro. Os ratos foram colocados em uma câmara de contenção com volume aproximado de 95x80x65 cm conectada ao aparato de fumar (Figura 4). A fumaça era tirada dos cigarros por vácuo e impelida para a câmara de contenção durante o período de trinta minutos. Em seguida, a fumaça era liberada da câmara através de um

exaustor, no qual os animais permaneciam em um período de intervalo de dez minutos, para que em seguida fosse repetido o procedimento de exposição de dez cigarros por trinta minutos.



Figura 4 - Câmara e máquina de exposição à fumaça do cigarro.

3.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.4.1 Retirada e preparação da aorta

Os animais foram anestesiados com Tiopentax (50 mg/kg; IP) e decapitados por meio da guilhotina, logo após, foi feita uma incisura no abdome do animal, na qual a aorta torácica foi retirada e dissecada em uma placa de petri contendo solução tampão Krebs-Henseleit (em mM: NaCl, 124; KCl, 46; CaCl₂.2H₂O, 2,5; MgSO₄.7H₂O, 1,2; KH₂PO₄, 1,2; EDTA, 0,01 e pH = 7,4) para a remoção dos tecidos conectivo e adiposo, e dividida em quatro anéis de aproximadamente 4 a 5 milímetros de comprimento cada, que foram montados em cubas de órgãos isolados.

Indistintamente, um dos anéis de aorta teve o endotélio removido mecanicamente com o auxílio de uma haste de ferro, enquanto que nos outros três anéis manteve-se íntegro a camada

endotelial. A efetividade da remoção ou manutenção do endotélio foi comprovada pela ausência ou presença de resposta vasodilatadora a acetilcolina (10^{-5} molar - M) em anéis pré-contráídos com fenilefrina (10^{-6} M).

3.4.2 Avaliação da reatividade vascular

Com o intuito em mensurar *in vitro* as respostas de tensão isométrica desenvolvida pelos anéis aórticos frente aos agonistas empregados no protocolo. Cada anel foi suspenso em um par de ganchos inoxidável, em uma cuba de fibra de vidro para órgão isolado, contendo 5 mililitros (ml) de solução nutriente de Krebs-Henseleit, mantida a uma temperatura de 36,5 °C e aerada com mistura carbogênica (95% O₂, 5% CO₂). Um gancho encontrava-se fixado na parte inferior da cuba, enquanto o outro gancho foi conectado a um transdutor de força (Letica Tri 011) interligado a um sistema de aquisição de dados (Biopac – Biopac Systems, Inc., Santa Bárbara, Califórnia, USA, mod. MP 100A/série 94111065) que estava acoplado a um computador para o registro da tensão isométrica desenvolvida pelo vaso.

Os anéis de aorta permaneceram por um período de quarenta e cinco minutos para estabilização, sob uma tensão inicial de 1 grama (g), no qual se manteve ao longo de todo o experimento, com a troca da solução nutriente e ajuste da tensão quando necessário. E em seguida, administrou-se KCl (Cloreto de Sódio, 75 milimolar - mM) para comprovar a viabilidade das artérias. E traçaram-se as curvas concentração efeito a fenilefrina, na presença ou ausência dos inibidores enzimáticos: *N-nitro-L-arginine methyl ester* (L-NAME - inibidor da síntese de óxido nítrico) e indometacina (inibidor da ciclooxigenase). A seguir serão detalhados os protocolos efetuados.

3.4.3 Avaliação da integridade endotelial

Depois do período de estabilização, realizou-se o protocolo para verificar a ausência ou presença da integridade do endotélio, na qual se adicionou acetilcolina (10^{-5} M) nos anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina (10^{-6} M). Considerou-se que o endotélio estava presente nos anéis que apresentaram no mínimo 80% de relaxamento, e ausente nos anéis que não apresentaram nenhum relaxamento.

3.4.4 Estudo da resposta vasoconstritora à fenilefrina

Em seguida, foi realizada a troca da solução de Krebs-Henseleit da cuba e depois de trinta minutos em estabilização, foram realizadas as curvas concentração-resposta cumulativa ao agente vasoconstritor fenilefrina (10^{-12} a 10^{-3} M) tanto nos anéis de aorta íntegros quanto nos anéis com o endotélio removido.

3.4.5 Estudo da resposta vasoconstritora à fenilefrina na presença de L-NAME

Para avaliar a participação do óxido nítrico na modulação da resposta vasoconstritora a fenilefrina, após a estabilização, o anel aórtico foi incubado por trinta minutos com *N-nitro-L-arginine methyl ester* (L-NAME, 100 micromolar - μ M) inibidor da síntese de óxido nítrico e em seguida foi realizada a curva concentração-resposta cumulativa de fenilefrina (10^{-12} a 10^{-3} M).

3.4.6 Estudo da resposta vasoconstritora à fenilefrina na presença de Indometacina

Avaliaram-se os efeitos das substâncias liberadas pela enzima da ciclooxigenase na resposta vascular. Os anéis de aorta foram pré-incubados por trinta minutos com indometacina (10 μ M), inibidor da ciclooxigenase. Depois iniciamos a curva de doses crescentes cumulativas de fenilefrina (10^{-12} a 10^{-3} M).

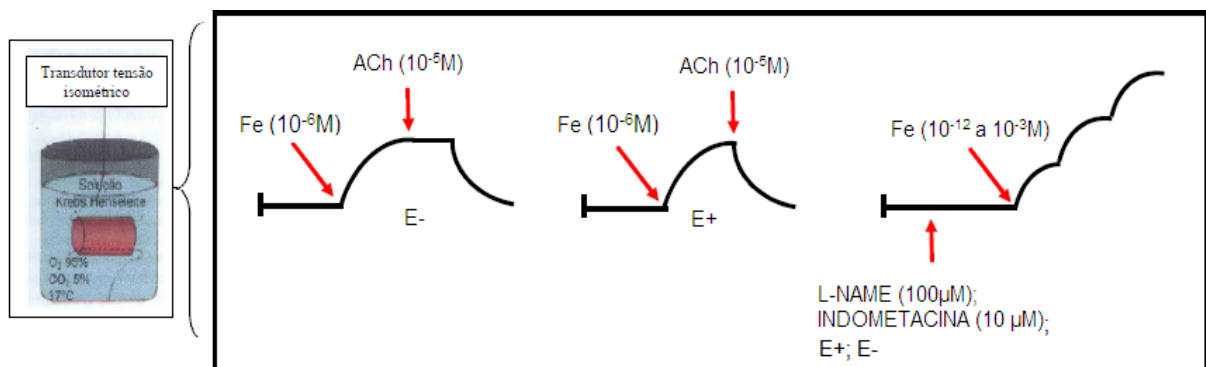


Figura 5 - Representação esquemática dos protocolos experimentais realizados na reatividade vascular em aortas torácicas de ratos Controle, Fumo, TRN, Fumo+TRN, com a camada endotelial íntegra (E+) ou removido (E-). Ach: acetilcolina; Fe: fenilefrina.

3.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO TECIDO CARDÍACO

O ventrículo direito (VD) e o ventrículo esquerdo (VE) foram separados e pesados *in natura* em balança analítica de precisão. Em seguida, os fragmentos foram colocados em estufa para a secagem a uma temperatura de 100°C, por um período de vinte e quatro horas. Após esse período os tecidos encontravam-se desidratados sendo novamente pesados, obtendo-se assim o peso seco de cada fragmentos de VD e VE. O peso total das câmaras cardíacas foram corrigidas pelo comprimento da tibia. As análises morfológicas para distinguir os grupos de animais constituíram-se do peso do ventrículo esquerdo (VE), tanto úmido quanto seco, e o comprimento da tibia (VEúmido/Tibia; VEseco/Tibia).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. Os dados foram avaliados utilizando-se o programa *GraphPad Prism (version 5.00)* através da análise de variância (ANOVA) *post hoc Tukey*. O nível de significância considerado para todas as variáveis foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 PARTICIPAÇÃO DA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA

Este resultado apresenta a resposta vasoconstritora máxima (RMax) de anéis de aorta ao agonista α_1 , fenilefrina, no qual foram realizadas curvas de doses crescentes cumulativas ao agonista fenilefrina (10^{-12} a 10^{-3} M) em anéis de aorta com o endotélio preservado. Podemos observar na Figura 6, que não houve diferença na porcentagem de contração (% Contração ao KCl) vasoconstritora entre os grupos Controle e Fumo. Entretanto, houve uma diminuição significativa da resposta contrátil máxima (RMax) no grupo Controle ($82 \pm 8\%$) quando comparada ao grupo TRN ($54 \pm 4\%$). Mas ao observarmos a RMax dos animais Fumo+TRN, houve um aumento significativo na RMax dos animais do grupo Fumo+TRN ($75 \pm 7\%$) quando comparado aos animais do grupo TRN (Figura 6).

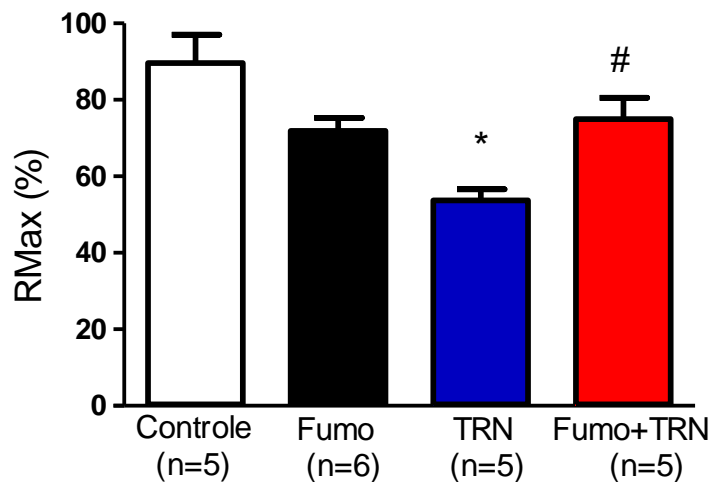


Figura 6 - Valores das RMax dos grupos estudados. Respostas obtidas por doses crescentes de fenilefrina (10^{-12} a 10^{-3} M) obtidas em anéis de aorta com endotélio preservado de ratos *wistar* controles, fumo, treinado e fumo e treinado. Dados expressos como média \pm EPM. Análise de variância (ANOVA) *post hoc* Tukey. * $p < 0,05$ vs Controle; # $p < 0,05$ vs TRN.

4.2 PARTICIPAÇÃO DO ENDOTÉLIO NA MODELAÇÃO DA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA

A fim de verificar a participação do endotélio vascular nas modificações das respostas encontradas na Figura 6, foram realizadas curvas de doses crescentes cumulativas a fenilefrina (10^{-12} a 10^{-3} M), em anéis de aorta torácica de ratos *wistar* que tiveram as células endoteliais removidas mecanicamente. Podemos observar, que na ausência do endotélio vascular não houve diferença nas respostas máximas (RMax) entre os grupos estudados Controle ($122 \pm 2,8\%$), Fumo ($107,7 \pm 11\%$), TRN ($138 \pm 12\%$) e Fumo+TRN ($123 \pm 4\%$) (Figura 7). Diante destes resultados podemos salientar que o endotélio vascular demonstra uma importante participação por meio da liberação de fatores relaxantes e constritores derivados do endotélio.

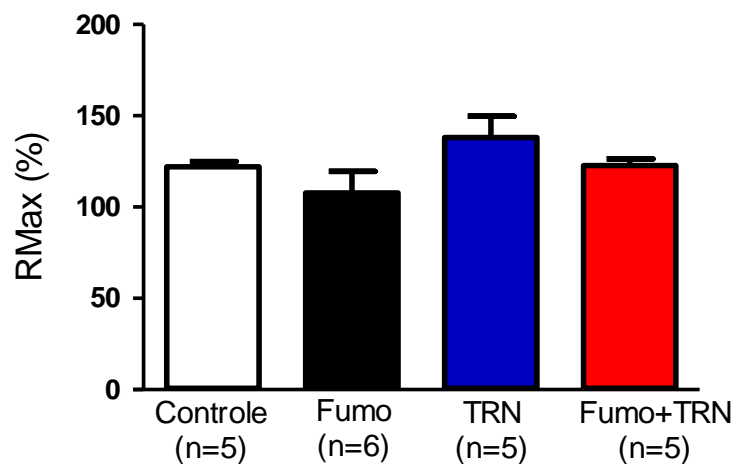


Figura 7 - Valores das RMax dos grupos estudados. Respostas obtidas por doses crescentes de fenilefrina (10^{-12} a 10^{-3} M) obtidas em anéis de aorta com endotélio desnudo dos grupos estudados. Dados expressos como média \pm EPM. Análise de variância (ANOVA) *post hoc* Tukey.

4.3 PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA MODELAÇÃO DA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA

Dentre os fatores liberados pelo endotélio vascular que poderiam mediar as respostas encontradas na Figura 6, podemos citar o óxido nítrico, gás solúvel que em contato com a musculatura lisa vascular produz relaxamento. Foram realizadas curvas de doses crescentes cumulativas ao agonista fenilefrina (10^{-12} a 10^{-3} M), em anéis de aorta torácica de ratos *wistar* com o endotélio preservado e pré-incubados com L-NAME (100 μ M), um inibidor da síntese de NO, a fim de verificar a participação da liberação dessa substância, no modelo estudado.

Após o pré-tratamento dos anéis de aorta com L-NAME não promoveu alteração na RMax induzida por fenilefrina nos grupos estudados Controle ($132 \pm 8\%$) e Fumo ($141 \pm 2\%$). Já em relação aos grupos TRN ($113 \pm 4\%$) e Fumo+TRN ($155 \pm 13\%$) houve um aumento na resposta contrátil (Figura 8), semelhante à encontrada nos animais com endotélio preservado (Figura 6). Isso demonstra que a provável participação do endotélio nas alterações das respostas observadas nos animais TRN quando comparado aos Fumo+TRN, não se deve a participação do NO na modulação da resposta vasoconstritora à fenilefrina.

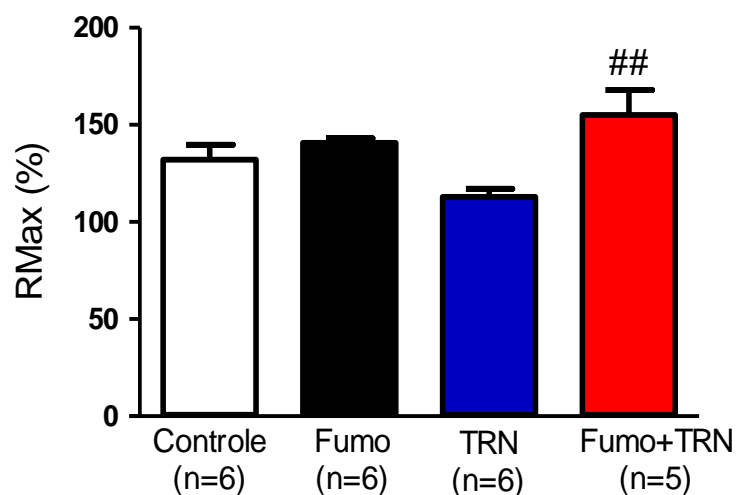


Figura 8 - Valores das RMax dos grupos estudados. Respostas obtidas por doses crescentes de fenilefrina (10^{-12} a 10^{-3} M) obtidas em anéis de aorta com endotélio preservado (E+) após o bloqueio da enzima NO sintase (L-NAME, 100 μ M) nos grupos estudados. Dados expressos como média \pm EPM. Análise de variância (ANOVA) *post hoc* Tukey. ## $p < 0,05$ vs TRN.

4.4 PARTICIPAÇÃO DA CICLOOXIGENASE NA MODELAÇÃO DA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA

Dentre outras substâncias liberadas pelo endotélio vascular que podem estar envolvidas nas respostas encontradas nos grupos de animais estudados, podemos citar o envolvimento dos prostanóides, liberados por meio da ativação da enzima ciclooxigenase (COX) produzindo substâncias relaxante (prostaciclina) e vasoconstritora (prostaglandina) modulando as respostas do músculo liso vascular. Para avaliar a participação da enzima COX na mediação destas respostas encontradas na figura 6 foram realizadas curvas de doses crescentes cumulativas a fenilefrina (10^{-12} a 10^{-3} M), em anéis de aorta torácica de ratos *wistar* com o endotélio preservado e pré-tratados com indometacina ($10 \mu\text{M}$), inibidor da ciclooxigenase.

Na figura 9, observamos que a pré-incubação dos anéis de aorta com indometacina não promoveu alterações significativas na RMax dos grupos estudados; Controle ($96,6 \pm 7\%$), Fumo ($90,2 \pm 5,58\%$), TRN ($93 \pm 2\%$) e Fumo+TRN ($103 \pm 12\%$). Essa resposta é semelhante à encontrada na Figura 7, quando a RMax foi avaliada em anéis com endotélio removido. Este resultado sugere que dentre os fatores endotelial que medeiam essas alterações, podemos citar que a via da ciclooxigenase possui importante participação.

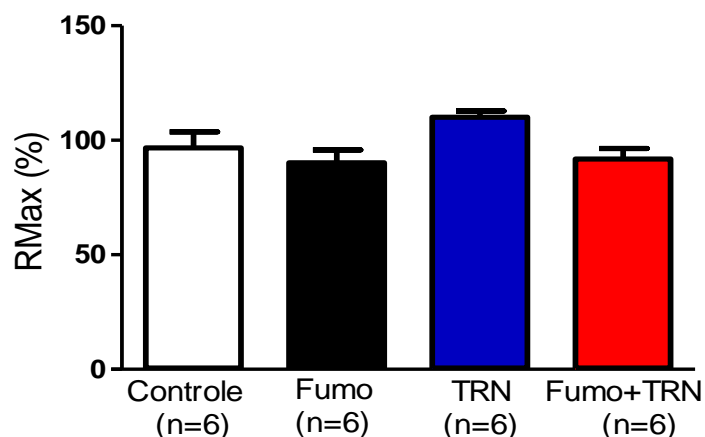


Figura 9 - Valores das RMax dos grupos estudados. Respostas obtidas por doses crescentes de fenilefrina (10^{-12} a 10^{-3} M) obtidas em anéis de aorta com endotélio preservado (E+) após o bloqueio da enzima ciclooxigenase (Indometacina, $10\mu\text{M}$) nos grupos estudados. Dados expressos como média \pm EPM. Análise de variância (ANOVA) *post hoc* Tukey.

4.5 AVALIAÇÃO DO PESO DAS CÂMARAS CARDÍACAS

A fim de verificarmos se o exercício de natação promoveu alterações cardíacas sobre o peso do ventrículo esquerdo que notoriamente acontece por meio do treinamento físico, realizamos a pesagem das câmaras ventriculares esquerdas dos animais dos grupos estudados, um efeito positivo do treinamento físico pode ser observado pelo aumento do peso do ventrículo esquerdo.

Na Figura 10, podemos observar que não houve alterações nos pesos úmidos e secos dos animais Controle e Fumo (úmido: $0,20 \pm 0,008$ e $0,18 \pm 0,010$) e (seco: $0,044 \pm 0,001$ e $0,04 \pm 0,002$); respectivamente. Também não houve diferença entre os grupos TRN e Fumo+TRN (úmido: $0,20 \pm 0,11$ e $0,21 \pm 0,009$) e (seco: $0,056 \pm 0,004$ e $0,052 \pm 0,002$); respectivamente. Entretanto, quando comparamos o peso dos VE seco dos grupos Controle e TRN observamos um aumento significativo ($0,044 \pm 0,001$ e $0,056 \pm 0,004^*$, $p < 0,05$), este aumento não foi modificado nos animais Fumo+TRN ($0,052 \pm 0,002^*$, $p < 0,05$). Mostrando assim, que as oito semanas de treinamento foram suficientes para promover alterações cardiovasculares do treinamento físico.

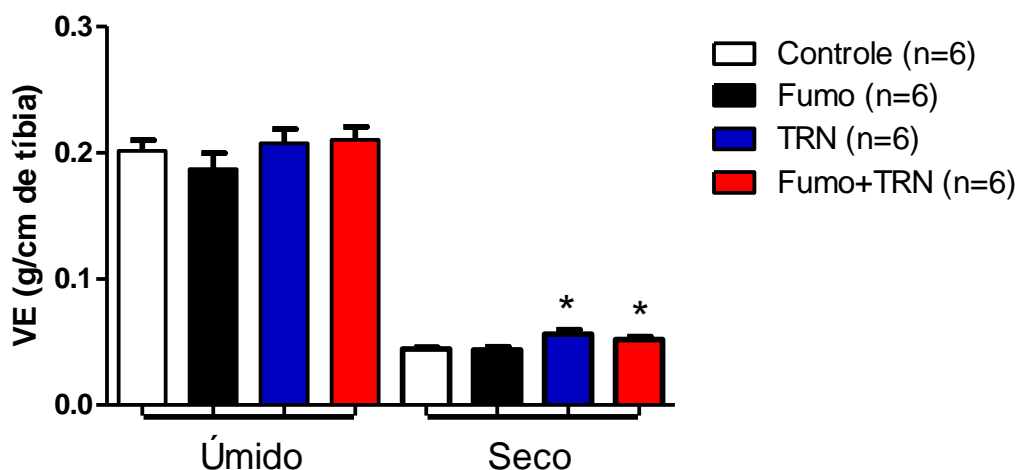


Figura 10 - Valores médios dos pesos úmido e seco do ventrículo esquerdo (VE) e corrigido pelo comprimento da tibia de ratos *wistar* sedentário (Controle), expostos por 5 dias à fumaça do cigarro (Fumo), submetidos ao treinamento de natação (TRN) e ratos treinados e fumantes (Fumo+TRN). Dados expressos como média \pm EPM. Análise de variância (ANOVA) *post hoc* Tukey. * $p < 0,05$ vs Controle

5 DISCUSSÃO

A fumaça do cigarro é uma mistura complexa de agentes biologicamente ativos e são responsáveis por alterações, principalmente no sistema cardiovascular (SMITH; FISCHER, 2001). Além de ser apontado como um possível agente responsável por disfunção endotelial vascular, que se manifestam por alterações nas substâncias vasoativas, resultando no comprometimento na biodisponibilidade de agentes, tais como: óxido nítrico, prostaciclina, tromboxano, endotelina (JÚNIOR; TOLEDO; MELO, 2005). Acredita-se que o exercício físico seja capaz de prevenir e tratar doenças como obesidade, hipertensão arterial, dislipidemias entre outras (MYERS, 2003). Seus benefícios estão relacionados com a melhora na capacidade funcional dos músculos: esquelético e cardíaco, além de beneficiar na função endotelial vascular, o que poderá atuar como um fator protetor, promovendo assim uma melhora na qualidade de vida (BRANDÃO; PINGE, 2007).

O exercício físico é bem identificado para o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca, onde as alterações estruturais resultantes do treinamento físico resultam numa melhora na capacidade contrátil do miocárdio (MILL; VASSALLO, 2001). Nossos resultados mostram que o tempo de treinamento (8 semanas) ao qual foram submetidos os animais do grupo TRN (Figura 10) foi capaz de promover alterações cardiovasculares que podem ser observadas pelo aumento do peso seco do VE. Estes dados estão de acordo com Medeiro e outros (2000), que também mostram que oito semanas de treinamento de natação com ratos *wistar*, apresentou um aumento do peso do ventrículo esquerdo quando comparado aos animais sedentários. Vale ressaltar, que neste trabalho não foi possível observar alterações no peso do VE no grupo FUMO+TRN induzidas pelo tempo de exposição ao fumo (5 dias).

Com relação aos resultados da reatividade vascular encontrados neste estudo, mostram uma redução na resposta contrátil máxima à fenilefrina nos anéis de aorta de ratos *wistar* no grupo treinado quando comparado ao grupo controle. Mostrando que o exercício físico foi capaz de reduzir a resposta constritora à fenilefrina. Vários trabalhos tem mostrado que o exercício físico reduz a resposta vasoconstritora adrenérgica (CHEN; LI; CHEN, 1994; SPIER; LAUGHLIN; DELP, 1999; CHIES et al., 2004). Os possíveis mecanismos que podem estar envolvido nesta atenuação vasoconstritora à fenilefrina, encontrada neste estudo, podem ser devido à diminuição da sensibilidade ou da expressão de receptores adrenérgicos presentes no

músculo liso vascular, principalmente os α_1 -adrenérgico o que é predominante na aorta torácica (JANSKUL, 1995; CHIES et al., 2004).

Uma característica marcante deste trabalho, é que anéis de aorta intactos do grupo treinado e expostos à fumaça do cigarro apresentaram aumento da resposta vasoconstritora máxima à fenilefrina, quando comparado ao grupo TRN (Figura 6). Estes resultados são inéditos na literatura a respeito do estudo da reatividade vascular neste modelo, que nos revela que há modificações na resposta protetora do exercício físico sobre a resposta contrátil, quando os animais treinados são expostos por cinco dias à fumaça do cigarro. Isso nos leva a sugerir que, as substâncias presentes no cigarro agem de maneira extremamente agressiva e são capazes de alterar os efeitos benéficos protetores do treinamento físico sobre o sistema vascular.

No entanto, com a remoção mecânica das células endoteliais não observamos diferença na resposta contrátil induzida pela fenilefrina entre os grupos TRN e Fumo+TRN (Figura 7). Evidenciando o importante papel da camada endotelial na modulação do tônus vascular envolvida na atenuação da resposta vasoconstritora observada antes quando o endotélio estava preservado.

Um dos fatores endoteliais responsáveis pela modulação do relaxamento vascular é o Óxido Nítrico (NO). Alguns estímulos como o *shear stress* contribuem para a elevação do cálcio na célula endotelial e estimulando na liberação da enzima NO sintase. Essa enzima converte a L-arginina em NO. O NO propaga-se até o músculo liso vascular que ativar a enzima guanilato ciclase que catalisa a conversão de guanosina trifosfato em GMPc o que resultará em relaxamento do músculo liso vascular (NEGRÃO; SANTOS; ALVES, 2005).

O pré-tratamento dos anéis de aorta de ratos com L-NAME promoveu aumento significativo na resposta contrátil máxima à fenilefrina no grupo Fumo+TRN quando comparado ao grupo TRN (Figura 8), mostrando que não houve alteração na RMax e que não se deve unicamente à participação da via NO, a modulação da resposta vasoconstritora mediada pelo endotélio. Este dado está semelhante aos achados de Rahman e outros (2007), ao analisarem a contratilidade de vasos isolados de aortas e carótidas de ratos *Sprague-Dawley* expostos a fumaça do cigarro, durante dezesseis semanas, mostram uma diminuição na biodisponibilidade de NO, isso pode ser devido a uma redução da síntese de NO, ou ao aumento da liberação de endotelina quando comparado ao grupo controle. Diferente do que é

encontrado quando os animais são submetidos somente ao treinamento físico com a natação, durante cinco e seis semanas, que promove mudança na resposta vascular em aortas torácicas, resultando em um aumento na liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio (NO) (JANSAKUL, 1995). No entanto, não foi encontrado na literatura estudos que relacionassem os efeitos da exposição aguda à fumaça do cigarro associado ao treinamento físico em estudos de reatividade vascular. Diversos estudos tem mostrado que o exercício físico está relacionado com um aumento da biodisponibilidade de NO devido a aumentada atividade da expressão da enzima eNOS (LAUGHLIN et al., 2003; ZANCHI et al., 2006). Em razão de não termos avaliado a expressão da proteína eNOS neste trabalho, não podemos associar se há envolvimento desta proteína relacionado com os nossos achados.

O endotélio vascular libera além do NO, outros importantes agentes vasodilatador e vasoconstritor, que conjuntamente ao NO produzem a modulação do tônus vascular (CARVALHO et al., 2005). Dentre eles podemos citar os prostanóides sintetizados a partir da enzima ciclooxigenase, por ação da fosfolipase de membrana (NARUMIYA, SUGIMOTO; USHIKUBI, 1999). O pré-tratamento dos anéis de aorta de ratos com indometacina, inibidor da ciclooxigenase, mostrou um importante resultado neste estudo, representado pela atenuação da RMax dos animais Fumo+TRN (Figura 9) quando comparada ao TRN. Isso nos permite sugerir que a via da ciclooxigenase, participa ativamente na liberação de substâncias vasoconstritoras observado nos animais Fumo+TRN. Além de que, não existem dados na literatura que enfatizem de fato a importância da via dos prostanóides e o seu envolvimento no treinamento físico (JANSAKUL, 1995). Achados na literatura corroboram no sentido de enfatizar a relação existente entre fatores inflamatórios liberados pelo fumo, tais como citocinas pró-inflamatórias, interleucinas 1, 6 e 8 (IL-1, IL-6, IL-8), fator de necrose tumoral alfa, entre outros (FORONJY; D'ARMIENTO, 2006; SMITH; FISCHER, 2001), que podem aumentar a expressão vascular da COX e assim promover o aumento da RMax observado neste estudo.

Sendo assim nossos dados nos permitem concluir, que a exposição aguda ao fumo induz alterações na reatividade vascular dos animais treinados pela natação e que esta é atenuada pela inibição da enzima ciclooxigenase.

6 REFERÊNCIAS

BRANDÃO, A. F.; PINGE, M. C. M. Alterações do óxido nítrico na função cardiovascular pelo treinamento físico. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 28, n. 1, p. 53-68, 2007.

CANNON, R. O. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clinical Chemistry*, v. 44, n. 8, p. 1809–1819, 1998.

CARVALHO, M. H. C.; FORTES, Z. B.; PASSAGLIA, R. C. A. T.; NIGRO, D. Funções normais do endotélio – Uma visão geral. In: DA LUZ, P. L.; LAURINDO, F. R. M.; CHAGAS, A. C. P. (Org.). *Endotélio e doenças cardiovasculares*. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 17-32.

CARVALHO, M. H. C.; NIGRO, D.; LEMOS, V. S.; TOSTES, R. C. A.; FORTES, Z. B. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Rev Bras Hipertens*, v. 8, n. 1, p. 76-88, 2001.

CASTARDELI, E.; PAIVA, S. A. R.; MATSUBARA, B. B.; MATSUBARA, L. S.; MINICUCCI, M. F.; AZEVEDO, P. S. ; CAMPANA, A. O. ZORNOFF, L. A. M. A exposição crônica à fumaça do cigarro resulta em remodelação cardíaca e prejuízo da função ventricular em ratos. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 84, n. 4, p. 320-324, 2005.

CHEN, H. I; LI, H. T.; CHEN, C. C. Physical Conditioning Decreases Norepinephrine-Induced Vasoconstriction in Rabbits. Possible Roles of Norepinephrine-Evoked Endothelium-Derived Relaxing Factor. *Circulation*, v. 90, n. 2, p. 970-975, 1994.

CHIES, A. B; OLIVEIRA, A. M.; PEREIRA, F. C.; ANDRADE, C. R.; CORRÊA, F. M. A. Phenylephrine-induced vasoconstriction of the rat superior mesenteric artery is decreased after repeated swimming. *J. Smooth Muscle Res.*, v. 40, n. 6, p. 249-258, 2004.

CLARKSON, P.; MONTGOMERY, H. E.; MULLEN, M. J.; DONALD, A. E.; POWE, A. J BULL, T.; JUBB, M.; WORLD, M.; DEANFIELD, J. E. Exercise Training Enhances Endothelial Function in Young Men. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 33, n. 5, p. 1379-1385, 1999.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

FORONJY, R.; D'ARMIENTO, J. The effect of cigarette smoke-derived oxidants on the inflammatory response of the lung. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, v. 6, p. 53–72. 2006.

FURCHGOTT, R. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium – derived relaxing and contracting factors. *The FASEB Journal*, v. 3, p. 2007-2018, 1989.

GALLEY, H. F.; WEBSTER, N. R. Physiology of the endothelium. *British Journal of Anaesthesia*, v. 93, n. 1, p. 105-113, 2004.

GOLIGORSKY, M. S.; LI, H.; BRODSKY, S.; CHEN, J. Relationships between caveolae and eNOS: everything in proximity and the proximity of everything. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, v. 283, p. 1-10, 2002.

GRATTON, J. P.; BERNATCHEZ, P.; SESSA, W. C. Caveolae and Caveolins in the Cardiovascular System. *Circulation Research*, v. 94, p. 1408-1417, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Pesquisa nacional por amostra de domicílios: Tabagismo*. Rio de Janeiro: IBGE, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Ações de prevenção primária e secundária no controle do câncer. In: ____. *Ações de enfermagem para o controle do câncer*. 3 ed. Rio de Janeiro: INCA, 2008, p. 220-221.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). José Alencar Gomes da Silva. *A situação do tabagismo no Brasil: dados dos inquéritos do Sistema Internacional de Vigilância, da Organização Mundial da Saúde, realizados no Brasil, entre 2002 e 2009*. Rio de Janeiro: Inca, 2011.

JANSAKUL, C. Effect of swimming on vascular reactivity to phenylephrine and KCl in male rats. *British Journal of Pharmacology*, v. 115, p. 587-594, 1995.

JASPERSE, J. L.; LAUGHLIN, M. H. Endothelial function and exercise training: evidence from studies using animal models. *Med Sci Sports Exerc.*, v. 38, n. 3, p. 445-454, 2006.

JÚNIOR, H. M.; TOLEDO, J. C. Y.; MELO, S. E. S. F. C. Alterações endoteliais no tabagismo. In: DA LUZ, P. L.; LAURINDO, F. R. M.; CHAGAS, A. C. P. (Org.). *Endotélio e doenças cardiovasculares*. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 337-347.

LAUGHLIN, M. H.; RUBIN, L. J.; RUSH, J. W. E.; PRICE, E. M.; SCHRAGE, W. G.; WOODMAN, C. R. Short-term training enhances endothelium-dependent dilation of coronary arteries, not arterioles. *Journal of Applied Physiology*, v. 94, p. 234-244, 2003.

LAURINDO, R. F. M.; LIBERMAN, M.; LEITE, P. F. Substâncias vasodilatadoras produzidas pelo endotélio. In: DA LUZ, P. L.; LAURINDO, F. R. M.; CHAGAS, A. C. P. (Org.). *Endotélio e doenças cardiovasculares*. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 33-42.

MARSH, S. A.; COOMBES, J. S. Exercise and the endothelial cell. *International Journal of Cardiology*, v. 99, p. 165-169, 2005.

MATHER, K. J.; MIRZAMOHAMMADI, B.; LTEIF, A.; STEINBERG, H. O.; BARON, A. D. Endothelin Contributes to Basal Vascular Tone and Endothelial Dysfunction in Human Obesity and Type 2 Diabetes. *Diabetes*, v. 51, p. 3517-3523, 2002.

MEDEIROS, A.; GIANOLLA, R. M.; KALIL, L. M. P.; BACURAU, R. F. P.; ROSA, L. F. B. C.; NEGRÃO, C. E.; BRUM, P. C. Efeito do treinamento físico com natação sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos. *Rev. paul. Educ. Fis.*, v. 14, n. 1, p. 7-15, 2000.

MICHELINI, L. C.; ROSSONI, L. V. Vasomotricidade e regulação local de fluxo. In: AIRES, M. M. (Org.). *Fisiologia*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 497-513.

- MILL, J. G.; VASSALLO, D. V. Hipertrofia cardíaca. *Rev Bras Hipertens*, v. 8, p. 63-75, 2001.
- MONCADA, S.; HIGGS, A.; FURCHGOTT, R. XIV International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 49, n. 2, p. 137-142, 1997.
- MYERS, J. Exercise and Cardiovascular Health. *Circulation*, v. 107, p. 1-4, 2003.
- NARUMIYA, S.; SUGIMOTO, Y.; USHIKUBI, F. Prostanoid Receptors: Structures, Properties, and Functions. *Physiol Reviews*, v. 70, n. 4, p. 1193-1226, 1999.
- NASCIMENTO, C. A.; PATRIARCA, G.; HEIMANN, J. C. Estrutura orgânica do endotélio vascular. In: DA LUZ, P. L.; LAURINDO, F. R. M.; CHAGAS, A. C. P. (Org.). *Endotélio e doenças cardiovasculares*. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 1-16.
- NEGRÃO, C. E.; SANTOS, A. C.; ALVES, M. J. N. N. Exercício físico e endotélio. In: DA LUZ, P. L.; LAURINDO, F. R. M.; CHAGAS, A. C. P. (Org.). *Endotélio e doenças cardiovasculares*. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 161-171.
- PAIVA, S. A. R.; ZORNOFF, L. A. M.; OKOSHI, M. P.; OKOSHI, K.; CICOONA, A. C.; CAMPANA, A. O. Comportamento de variáveis cardíacas em animais expostos à fumaça de cigarro. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.81, n. 3, p. 221-224, 2003.
- PORTES, L. A.; TUCCI, P. J. F. O Treinamento Físico por Natação Atenua o Remodelamento miocárdico e Congestão Pulmonar em Ratas Wistar com Insuficiência Cardíaca Secundária a Infarto do Miocárdio. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.87, p. 54-59, 2006.
- RAHMAN, M. M.; ELMI, S.; CHANG, T. K. H.; BAI, N.; SALLAM, N. A.; LEMOS, V. S.; MOIEN-AFSHARI, F.; LAHER, I. Increased vascular contractility in isolated vessels from cigarette smoking rats is mediated by basal endothelin release. *Vascular pharmacology*, v. 46, p. 35-42, 2007.
- ROSEMBERG, J. Nicotina: Droga Universal. São Paulo: SES/CVE, p.1-174, 2003.
- SIMANI, A. S.; INOUE, S.; HOGGS, J. C. Penetration of the respiratory epithelium of guinea pigs following exposure to cigarette smoke. *Laboratory Investigation*, v.31, p. 75-81, 1974.
- SILVA, A. S.; ZANESCO, A. Exercício físico, receptores β -adrenérgicos e resposta vascular. *J Vasc Bras*, v. 9, n. 2, p. 47-56, 2010.
- SMITH, J. C.; FICHER, T. H. Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis*, v. 158, p. 257-267, 2001.
- SPIER, S. A.; LAUGHLIN, M. H.; DELP, M. D. Effects of acute and chronic exercise on vasoconstrictor responsiveness of rat abdominal aorta. *Journal of Applied Physiology*, v. 87, p. 1752-1757, 1999.

TAYLOR, A. E.; JOHNSON, D. C.; KAZEMI, H. Environmental Tobacco Smoke and Cardiovascular Disease. A Position Paper From the Council on Cardiopulmonary and Critical Care, American Heart Association. *Circulation*, v. 86, p. 699-702, 1992.

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. Sistema circulatório: vasos sanguíneos e hemodinâmica. In: _____. *Princípios de anatomia e fisiologia*. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. Cap. 21, p. 754-756.

WANG X-D.; LIU, C.; BRONSON, R. T.; SMITH, D. E.; KRINSKY, N. I.; RUSSEL, R. M. Retinoid signaling and activator protein-1 expression in ferrets given beta-carotene supplements and exposure to tobacco smoke. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 91, p. 60-6, 1999.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advan in Physiol Edu*, v. 27, p. 201-206, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Why tobacco is a public health priority*. WHO. Disponível em: http://www.who.int/tobacco/health_priority/en/index.html. Acesso em: ago. 2012.

ZANCHI, N. E.; BECHARA, L. R. G.; TANAKA, L. Y.; DEBBAS, V.; BARTHOLOMEU, T.; RAMIRES, P. R. Efeitos do treinamento aeróbio sobre a bioatividade do óxido nítrico e a vasodilatação aórtica. *Revista Brasileira de Educação Física e Esporte*, v. 20, n. 4, p. 239-247, 2006.