



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

AIDA MEHANNA

**EFEITOS FISIOPATOLÓGICOS DA ENDOTOXEMIA POR
LPS EM RATOS ACORDADOS E SUBMETIDOS AO
TREINAMENTO FÍSICO: PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO**

Londrina
2008

AIDA MEHANNA

**EFEITOS FISIOPATOLÓGICOS DA ENDOTOXEMIA POR
LPS EM RATOS ACORDADOS E SUBMETIDOS AO
TREINAMENTO FÍSICO: PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Marli Cardoso Martins Pinge

Londrina
2008

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M498e Mehanna, Aida.

Efeitos fisiopatológicos da endotoxemia por LPS em ratos acordados e submetidos ao treinamento físico : papel do óxido nítrico / Aida Mehanna. – Londrina, 2008.

96f. : il. + anexos no final da obra.

Orientador: Marli Cardoso Martins Pingé.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2008.

Bibliografia: f.86-95.

1. Patologia experimental – Teses. 2. Endotoxemia – Teses. 3. Óxido nítrico – Teses. I. Pingé, Marli Cardoso Martins. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616-092

AIDA MEHANNA

**EFEITOS FISIOPATOLÓGICOS DA ENDOTOXEMIA POR
LPS EM RATOS ACORDADOS E SUBMETIDOS AO
TREINAMENTO FÍSICO: PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marli Cardoso Martins Pingé
UEL-PR

Prof. Dr. Hugo Celso Dutra
USP - Faculdade de Medicina de Riberão Preto
(FMRP-USP)

Prof. Dr. Rubens Cecchini
UEL-PR

Londrina, 15 de fevereiro de 2008.

“O fácil se faz logo, o difícil demora um pouco, o impossível entrega nas mãos de Deus, porque para Ele tudo é possível”.

Provérbios

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por me guiar em todos os momentos de minha vida.

À minha família, razão da minha existência, por todo o apoio, compreensão e força. Em especial à minha mãe (a melhor mãe do mundo) e aos meus irmãos Adla e Assaad que eu amo... Ao meu cunhado Claudio e minha cunhada Luciane por todo o amor e carinho. E ao mais novo membro da família meu querido sobrinho Guilherme.

Ao meu querido pai que mesmo não estando mais presente, esteve comigo em todos os momentos...

Aos meus queridos ratinhos que mesmo de forma involuntária doaram suas vidas para que este trabalho fosse possível.

À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Marli, por toda a força, presença e companheirismo. Por ter me ensinado o que é ciência, e mais que tudo, ter me mostrado que com trabalho e persistência tudo é possível. Obrigada por tudo!

A todos os meus professores em especial ao Prof. Dr. Phileno por todo o apoio.

À Prof^ª. Dr^ª. Sílvia Ponzoni, a Prof^ª. Dr^ª Helenir , a Prof^ª. Dr^ª Gláucia e a Prof^ª. Dr^ª Eleonora por todo o apoio e amizade.

A todos os meus amigos de laboratório, todos têm um lugar especial em meu coração: Adriane, Rosi, Igor (Xuxu), Vinícius, Paola, e a todos aqueles que passaram pelo laboratório.

À minha grande amiga Samantha, por toda a amizade, força e apoio. Pessoa muito especial presente em todos os momentos. Obrigada por tudo!

À Luciana que também faz parte da grande família do laboratório 3 de Fisiologia.

À minha grande amiga Priscila Cassola por toda a sua alegria e amizade.

A todas as minhas amigas do mestrado: Débora, Patrícia, Vânia, Alissana, Rosália e Josiane. E por último à Carolina Panis por todo o apoio e colaboração.

MEHANNA, Aida. **Efeitos Fisiopatológicos da Endotoxemia por LPS em Ratos Acordados e Submetidos ao Treinamento Físico: papel do óxido nítrico.** 2008. 100f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

A sepse é caracterizada por hipotensão sistêmica, hiporreatividade aos vasoconstritores, perfusão tecidual inadequada e falência múltipla de órgãos. Um dos principais mediadores envolvidos é o óxido nítrico (NO). Durante o treinamento físico (TF), ajustes cardiovasculares dinâmicos mantêm a pressão sangüínea adequada e ajustam o suprimento sangüíneo aos diferentes leitos vasculares, e o NO parece estar participando desse processo. O objetivo principal desse estudo foi verificar se o treinamento físico pela natação tem efeito preventivo sobre as anormalidades cardiovasculares e pulmonares induzidas pela administração de lipopolissacárideos de *Escherichia coli* (LPS), e de que maneira o NO contribui para essas alterações. Para este estudo foram usados ratos Wistar machos (200 a 220 g), submetidos ao treinamento físico pela natação (1 hora; 5 dias/semana; 4 semanas). Os animais sedentários (SED) ou treinados (TF) foram submetidos à cateterização da artéria e veia femorais. Após 24 horas do procedimento cirúrgico, os animais foram tratados com salina 0,9% e com inibidores da NOS: Aminoguanidina (Amino), L-NAME e 7-NI e submetidos à endotoxemia através da administração de LPS (5mg/kg, i.v.). Os parâmetros cardiovasculares foram analisados por 2 horas, e os animais foram sacrificados 5 horas após a administração de LPS, para a quantificação do edema pulmonar. Os parâmetros basais da pressão arterial média (PAM), não mostraram diferenças entre os grupos, no entanto na frequência cardíaca basal (FC), foi observado bradicardia de repouso nos animais treinados. Neste estudo, nós também investigamos o envolvimento dos inibidores das vias indutiva e constitutiva da NOS nas respostas cardiovasculares em animais sedentários e treinados sem endotoxemia por LPS. Nossos dados mostraram uma resposta pressora tônica nos grupos sedentários e treinados tratados com L-NAME (inibidor da cNOS), onde houve um aumento nos valores da pressão arterial média em relação ao basal, acompanhados de bradicardia, sendo que no grupo treinado a administração de L-NAME, levou a uma menor resposta hipertensiva, quando comparado ao grupo sedentário. Após a administração de LPS foi observada hipotensão e taquicardia no grupo SED tratado com salina, sendo que estas alterações foram atenuadas no grupo TF. No entanto, após a Amino no grupo SED a hipotensão foi atenuada, com aumento na taquicardia. Após o L-NAME no grupo SED a hipotensão foi acentuada, com atenuação da taquicardia. Após a Amino no grupo TF a hipotensão foi acentuada, com atenuação da taquicardia. O L-NAME no grupo TF bloqueou a hipotensão e atenuou a taquicardia. Os animais treinados mostraram um menor índice de edema após o LPS, o qual foi atenuado em ambos os grupos após o tratamento com Amino. Após o tratamento com L-NAME, houve um aumento do índice de edema pulmonar tanto no grupo SED quanto no grupo TF. O tratamento com 7-NI não mostrou qualquer alteração em ambos os grupos. A dosagem de TNF- α no plasma dos animais revelou que o treinamento físico diminui os níveis dessa citocina e que o bloqueio da via constitutiva aumenta os níveis desta, especialmente no grupo TF. As alterações

promovidas pelo treinamento físico mostraram-se benéficas, no sentido de se contrapor às anormalidades cardiovasculares e pulmonares observadas na endotoxemia induzida pelo LPS. No entanto, a inibição das vias constitutiva e indutiva da produção de NO revelam papéis diferentes durante a fase inicial da sepse, onde a iNOS parece ser predominante nos animais controle, enquanto a cNOS nos animais treinados.

Palavras-chave: Pressão arterial. Treinamento físico. Óxido nítrico. Aminoguanidina. L-NAME. 7-NI. Sepse. Edema pulmonar.

MEHANNA, Aida. **Pathophysiological effects of endotoxemia by LPS in rats subject to swimming training: role of nitric oxide.** 2008. 100f. Dissertation (Master degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

The sepsis is characterized by systemic hypotension, hyporeactiveness to vasoconstrictors, impaired tissue perfusion and multiple organ failure. One of the main mediators involved is nitric oxide (NO). During the exercise training (ET), dynamic cardiovascular adjustments take place to maintain proper blood pressure and adjust blood supply to the different vascular beds, and NO seems to be participating in this process. The main objective of this study was to investigate whether exercise training by swimming protects against the cardiovascular and pulmonary abnormalities induced by the administration of lipopolysaccharide of *Escherichia coli* (LPS), and the way that NO contributes to these changes. For this study male Wistar rats (200 to 220 g), were subjected to swimming training (1 hour / day, 5 days / week, 4 weeks). The animals sedentary (ST) or trained (ET) were submitted to catheterization of the femoral artery and vein. After 24 hours of surgery, animals were treated with 0.9% saline and with NOS inhibitors: Aminoguanidine (Amino), L-NAME and 7-NI and submitted to endotoxemia by administration of LPS (5mg/kg, i.v.). The cardiovascular effects of endotoxin were analyzed by 2 hours. The rats were observed until 5 hours after LPS injection, when they were sacrificed for the quantification of pulmonary edema. The baseline parameters between both groups had not shown differences in the average mean arterial pressure (MAP), however in the heart rate (HR) were observed a bradycardia at rest in the trained animals. In this study, we also investigated the involvement of inducible and constitutive pathways by NOS inhibitors on the cardiovascular responses in animals sedentary and trained without endotoxemia by LPS. Our data showed a tonic pressor response in sedentary and trained groups treated with L-NAME (inhibitor cNOS), where there was an increase in the values of mean arterial pressure in relation to the baseline with bradycardia, and in the group trained the administration of L-NAME, led to a lesser hypertensive response, compared to the sedentary group. After administration of LPS it was observed hypotension and tachycardia in the ST group treated with saline, and these changes were attenuated in ET group. However, after pretreatment with Amino in ST group the hypotension was blocked without alteration in the tachycardia. After pretreatment with L-NAME in ST group the hypotension was enhanced without alteration in the tachycardia. After pretreatment with Amino in ET group the hypotension did not modify, but the tachycardia was attenuated. Pretreatment with L-NAME in ET group inhibited the hypotension and attenuated the tachycardia. The trained animals showed a lower index of pulmonary edema after LPS, which was attenuated in both groups after treatment with Amino. After treatment with L-NAME, there was an increase in the index of pulmonary edema in both the ST group as the ET group. Treatment with 7-NI did not show any change in both groups. Plasma TNF- α concentrations showed that the exercise training reduces the levels of this cytokine and that the blockade of cNOS pathway increases the levels of this, especially in the ET group. The cardiopulmonary adaptations promoted by exercise training seem to be beneficial, to counteracting the

cardiovascular and pulmonary abnormalities observed in the septicemia induced by LPS. However, the inhibition of the constitutive and inducible NOS isoforms presented different roles during the initial phase of sepsis, where iNOS seems to be predominant in the control animals, while cNOS in trained animals.

Keywords: Arterial pressure. Exercise training. Nitric oxide. Aminoguanidine. L-NAME. 7-NI. Sepsis. Pulmonary edema.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Evolução temporal do peso corporal dos ratos dos grupos sedentário e treinado. * $p < 0,05$ 32
- Figura 2** – Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B), após a administração dos inibidores da NOS, nos grupos sedentários: aminoguanidina (n=5), L-NAME (n=6), DMSO (veículo, n=5) e 7-NI (n=5).....36
- Figura 3** – Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B), após a administração dos inibidores da NOS, nos grupos submetidos ao treinamento físico (TF): aminoguanidina (n=6), L-NAME (n=3), DMSO (veículo, n=3), 7-NI (n=4)37
- Figura 4** – Variação máxima da pressão arterial média (Δ PAM) (A), e da frequência cardíaca (Δ FC) (B), após a administração dos diferentes inibidores da NOS. # Diferença em relação aos valores basais ($p < 0,05$). * Diferença entre os grupos sedentário e grupo treinado ($p < 0,05$). ** Diferença entre os grupos sedentário 7-NI e o grupo sedentário DMSO ($p < 0,05$).....38
- Figura 5** – Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B), após a administração de LPS no grupo sedentário (n=9) e treinado (n=11). A seta indica o momento da administração de LPS. * Grupo treinado vs. grupo sedentário ($p < 0,05$).....41
- Figura 6** – Variação máxima da pressão arterial média (Δ PAM) (A), e da frequência cardíaca (Δ FC) (B), após a administração de LPS no grupo sedentário (n=9) e no grupo treinado (n=11). Fase 1 = 5 minutos, Fase 2 = 25 minutos, Fase 3 = 50 minutos. * Diferença em relação aos valores basais ($p < 0,05$). # Grupo treinado vs. sedentário ($p < 0,05$)42
- Figura 7** – Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B), após a administração de LPS no grupo sedentário salina (n=9) e sedentário aminoguanidina (n=9). A seta indica o momento da administração de LPS. * Diferença entre o grupo sedentário salina e grupo sedentário aminoguanidina ($p < 0,05$)45

- Figura 8** – Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B), após a administração de LPS no grupo treinado salina (n=11) e grupo treinado aminoguanidina (n=8). A seta indica o momento da administração de LPS. * Diferença entre o grupo treinado salina e grupo treinado aminoguanidina ($p < 0,05$)46
- Figura 9** – Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B), após a administração de LPS no grupo sedentário aminoguanidina (n=9) e grupo treinado aminoguanidina (n=8). A seta indica o momento da administração de LPS. * Diferença entre o grupo sedentário aminoguanidina e grupo treinado aminoguanidina ($p < 0,05$).....47
- Figura 10** – Variação máxima da pressão arterial média (Δ PAM) (A), e da frequência cardíaca (Δ FC) (B), após a administração de LPS no grupo sedentário aminoguanidina (n=9) e no grupo treinado aminoguanidina (n=8). Fase 1 = 5 minutos, Fase 2 = 25 minutos, Fase 3 = 50 minutos. * Diferença em relação aos valores basais ($p < 0,05$). # Grupo treinado vs. grupo sedentário ($p < 0,05$).....48
- Figura 11** – Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B), após a administração de LPS no grupo sedentário salina (n=9) e grupo sedentário L-NAME (n=9). A seta indica o momento da administração de LPS. * Diferença entre o grupo sedentário salina e grupo sedentário L-NAME ($p < 0,05$).....52
- Figura 12** – Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B), após a administração de LPS no grupo treinado salina (n=11) e grupo treinado L-NAME (n=8). A seta indica o momento da administração de LPS. * Diferença entre o grupo treinado salina e grupo treinado L-NAME ($p < 0,05$)53
- Figura 13** – Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B), após a administração de LPS no grupo sedentário L-NAME (n=9) e grupo treinado L-NAME (n=8). A seta indica o momento da administração de LPS. * Diferença entre o grupo sedentário L-NAME e grupo treinado L-NAME ($p < 0,05$)54

- Figura 14** – Variação máxima da pressão arterial média (Δ PAM) (A), e da frequência cardíaca (Δ FC) (B), após a administração de LPS no grupo sedentário L-NAME (n=9) e no grupo treinado L-NAME (n=8). Fase 1 = 5 minutos, Fase 2 = 25 minutos, Fase 3 = 50 minutos. * Diferença em relação aos valores basais ($p < 0,05$). # Grupo treinado vs. grupo sedentário ($p < 0,05$).....55
- Figura 15** – Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B), após a administração de LPS no grupo sedentário DMSO (n=6) e grupo treinado DMSO (n=3). A seta indica o momento da administração de LPS. * Diferença entre o grupo sedentário DMSO e grupo treinado DMSO ($p < 0,05$)58
- Figura 16** – Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B), após a administração de LPS no grupo sedentário DMSO (n=6) e grupo sedentário 7-NI (n=8). A seta indica o momento da administração de LPS. * Diferença entre o grupo sedentário DMSO e grupo sedentário 7-NI ($p < 0,05$)59
- Figura 17** – Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B), após a administração de LPS no grupo treinado DMSO (n=3) e grupo treinado 7-NI (n=7). A seta indica o momento da administração de LPS. * Diferença entre o grupo treinado DMSO e grupo treinado 7-NI ($p < 0,05$).....60
- Figura 18** – Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B), após a administração de LPS no grupo sedentário 7-NI (n=8) e grupo treinado 7-NI (n=7). A seta indica o momento da administração de LPS. * Diferença entre o grupo sedentário 7-NI e grupo treinado 7-NI ($p < 0,05$)61
- Figura 19** – Variação máxima da pressão arterial média (Δ PAM) (A), e da frequência cardíaca (Δ FC) (B), após a administração de LPS no grupo sedentário 7-NI (n=8) e no grupo treinado 7-NI (n=7). Fase 1 = 5 minutos, Fase 2 = 25 minutos, Fase 3 = 50 minutos. * Diferença em relação aos valores basais ($p < 0,05$)62

- Figura 20** – Variação máxima da pressão arterial média (Δ PAM) (A), e da frequência cardíaca (Δ FC) (B), 50 minutos após a administração de LPS (Fase 3), nos grupos sedentários e treinados submetidos aos diferentes tratamentos (salina, DMSO, aminoguanidina, L-NAME e 7-NI). * Diferença entre grupo sedentário e grupo treinado ($p < 0,05$). # Diferença entre os grupos sedentário tratado e sedentário salina ($p < 0,05$). ** Diferença entre grupo treinado tratado e grupo treinado salina ($p < 0,05$). ## Diferença entre treinado DMSO e treinado 7-NI63
- Figura 21** – Índice de edema pulmonar (peso pulmonar/peso corporal X 100) (A), e ganho de peso pulmonar (B), 5 horas após administração de LPS em animais sedentários (SED: n=6) e treinados (TF: n= 5). *Diferença em relação ao grupo sedentário ($p < 0,05$)65
- Figura 22** – Índice de edema pulmonar (IEP: peso pulmonar/peso corporal X 100) (A) e ganho de peso pulmonar (GPP) (B), 5 horas após a administração de LPS em animais sedentários e treinados salina (C: n=6; TF: n=5), pré-tratados com L-NAME (20mg/kg) (SED: n=13; TF:n=11); aminoguanidina (Amino 20mg/kg)(SED: n=9; TF: n=6); ou 7-nitroindazol (7-NI: 8mg/kg)(SED: n=7; TF: n=5). * Diferença em relação ao sedentário ($p < 0,05$). # Diferença em relação aos grupos salina ($p < 0,05$)66
- Figura 23** – Concentrações plasmáticas de TNF- α nos vários grupos em condições basais (Sedentário: SED, Treinado: TF), ou 2 horas após a administração de LPS. LN = L-NAME. Os valores representam a média \pm EPM e correspondem a dois experimentos independentes, utilizando 4 ratos por grupo. As diferenças entre as concentrações de TNF- α foram analisadas através do teste ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni. * Diferença em relação ao grupo sedentário; # Diferença em relação ao grupo sedentário LPS (SED+LPS); ** Diferença em relação ao grupo treinado (TF); ## Diferença em relação ao grupo treinado LPS (TF+LPS) ($p < 0,01$)67

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Valores médios de índice de massa muscular dos grupos sedentário (n=8) e treinado (n=11). * Diferença em relação ao grupo sedentário $p < 0,05$32
- Tabela 2** – Valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) dos grupos experimentais tratados com os diferentes inibidores e com administração de LPS. * Diferença em relação ao grupo sedentário correspondente $p < 0,05$33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- PA** – Pressão Arterial
- PAM** – Pressão Arterial Média
- FC** – Frequência Cardíaca
- NO** – Óxido Nítrico
- NOS** – Óxido Nítrico Sintase
- cNOS** – Óxido Nítrico Sintase Constitutiva
- iNOS** – Óxido Nítrico Sintase Indutiva
- nNOS** – Óxido Nítrico Sintase Neuronal
- eNOS** – Óxido Nítrico Sintase Endotelial
- L-NAME** – **N^G** – nitro-L-arginina-metil-ester
- 7-NI** – 7 nitroindazole
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- Amino** – Aminoguanidina
- LPS** – Lipopolissacarídeo
- TNF- α** – Fator de Necrose Tumoral - α
- TF** – Treinamento Físico
- PC** – Peso Corporal
- PM** – Peso Muscular
- IMM** – Índice de Massa Muscular
- PP** – Peso Pulmonar
- IEP** – Índice de Edema Pulmonar
- GPP** – Ganho de Peso Pulmonar
- RVLm** – Área Ventro-Lateral do Bulbo

SÚMARIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 ANIMAIS	25
3.2 TREINAMENTO FÍSICO	25
3.3 CANULAÇÃO DA ARTÉRIA E VEIA FEMORAIS	26
3.4 REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA	26
3.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	27
3.5.1 Análise da pressão arterial e frequência cardíaca.....	27
3.5.2 Análise do edema pulmonar.....	27
3.5.3 Quantificação do TNF- α	28
3.6 DROGAS UTILIZADAS	29
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
4 RESULTADOS	31
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EFICÁCIA DO TREINAMENTO FÍSICO	31
4.2 ANÁLISE DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES (PAM E FC) EM ANIMAIS NORMAIS, SEDENTÁRIOS OU SUBMETIDOS AO TREINAMENTO FÍSICO, APÓS A ADMINISTRAÇÃO DOS INIBIDORES DA NOS	34
4.3 ANÁLISE DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES (PAM E FC), EM ANIMAIS SEDENTÁRIOS OU SUBMETIDOS AO TREINAMENTO FÍSICO COM ENDOTOXEMIA INDUZIDA POR LPS, APÓS A ADMINISTRAÇÃO DOS INIBIDORES DA NOS OU SALINA..	39
4.3.1 Efeito do pré-tratamento com salina.....	39
4.3.2 Efeito do pré-tratamento com aminoguanidina.....	43
4.3.3 Efeito do pré-tratamento com L-NAME	49
4.3.4 Efeito do pré-tratamento com DMSO e 7-NI	56
4.4 ANÁLISE DO EDEMA PULMONAR E QUANTIFICAÇÃO DE TNF- α EM ANIMAIS COM ENDOTOXEMIA INDUZIDA POR LPS	64

5 DISCUSSÃO	68
6 CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS	78
ANEXO – ARTIGO PUBLICADO	92

1 INTRODUÇÃO

A sepse ainda constitui uma das principais causas de morte em unidades de terapia intensiva, sendo que os principais agentes etiológicos são bactérias gram-negativas seguidas pelas gram-positivas, e em menor escala os fungos (LEE *et al.*, 2002). É caracterizada por hipotensão sistêmica, hiporreatividade aos vasoconstritores, subseqüentes anormalidades na função e perfusão tecidual, seguida de falência múltipla de órgãos (BONE *et al.*, 1997).

A fisiopatologia da sepse envolve a associação de intrincadas reações desencadeadas pelo patógeno microbiano, principalmente as bactérias gram-negativas que são comumente isoladas em indivíduos sépticos (SHAPIRO *et al.*, 1993). A endotoxina é uma molécula derivada da membrana de bactérias gram-negativas e é o estímulo inicial para as reações celulares que levam a liberação de citocinas. Dois mecanismos distintos contribuem para o colapso hemodinâmico na sepse: 1) extrínsecos: toxinas, endotoxinas e partículas de proteínas de bactérias gram-positivas, vírus ou fungos, e 2) intrínsecos (ou endógenos): liberação de mediadores pró-inflamatórios pelas células do hospedeiro (JEAN-BAPTISTE, 2007; ALBERT *et al.*, 2002).

A endotoxina pode ativar diretamente os macrófagos, as células endoteliais, e o sistema complemento, levando a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios: TNF- α , interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator de ativação plaquetário (PAF), óxido nítrico (NO), complementos e eicosanóides (SHAPIRO *et al.*, 1993, WANG *et al.*, 1999). O LPS liga-se a uma molécula de superfície chamada de CD14, presente nos macrófagos, monócitos e neutrófilos. Este acoplamento é facilitado pela proteína ligante de LPS (WRIGHT *et al.*, 1995). Uma vez que o domínio endoplasmático do CD14 é ativado, a sinalização é então dada através de uma proteína transmembrana, chamada de receptor toll-like (TLR). O toll-like 4 (TLR-4), é responsável pelo reconhecimento de muitas bactérias gram-negativas (VISINTIN *et al.*, 2001). A sinalização dada pelo complexo CD14/TLR-4 ativa o fator nuclear κ B (NF- κ B), através de uma cascata de fosforilação dada pela família de proteínas quinases mitógeno-ativadas (MAPK). A MAPK, especialmente a p38, desempenha papel crucial na liberação de citocinas e na apoptose (ARBABI *et al.*, 2002).

A progressão dos estágios iniciais de septicemia para choque séptico envolve várias etapas. Os macrófagos e neutrófilos ativados aumentam a expressão das moléculas de adesão nas células endoteliais dos vasos sanguíneos. O PAF, um potente agente quimiotático para neutrófilos, contribui significativamente para o início da adesão leucocitária, ativação da cascata de coagulação e oclusão vascular, o que eventualmente leva a isquemia tecidual. A perfusão tecidual inadequada e hipóxia favorecem a conversão da xantina desidrogenase para a xantina oxidase, a qual catalisa a transformação do oxigênio a radicais livres, como o superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil. Estes radicais livres amplificam o dano tecidual e a falência múltipla de órgãos. Terapias no sentido de reestabelecer a perfusão tecidual facilitam a propagação sistêmica dos radicais livres. Na reperfusão ocorre um aumento da permeabilidade vascular, e a perda da auto-regulação do tônus vascular em resposta aos efeitos dos mediadores inflamatórios. Finalmente, respostas inflamatórias contínuas levam a falência múltipla de órgãos (MARICK & ZALOPA, 2002; BRIX-CHRISTENSEN *et al.*, 2004; MARIX & RAGHAVAN, 2004; JEAN-BAPTISTE, 2007).

Um dos principais mediadores inflamatórios liberados durante a sepse é o óxido nítrico (NO). O papel deste já está bem estabelecido na regulação cardiovascular, no entanto o NO parece ter muitos outros papéis importantes em funções biológicas (MONCADA *et al.*, 2006). Ele é sintetizado enzimaticamente a partir do aminoácido L-arginina, por um grupo de hemoproteínas conhecidas por NO sintases (NOS). Até o presente momento foram identificadas três isoformas da NOS: neuronal NOS (nNOS ou NOS I) presente no cérebro, medula espinhal, gânglios simpáticos, nervos periféricos, células epiteliais do estômago, útero, pulmão e músculo esquelético; endotelial NOS (eNOS ou NOS III) encontrada em células endoteliais, músculo liso vascular e músculo cardíaco, sendo estas duas isoformas expressas constitutivamente dentro de condições fisiológicas, e uma terceira isoforma induzível da NOS (iNOS ou NOS II), cujas fontes podem ser células endoteliais, células epiteliais, macrófagos, neutrófilos, células do músculo liso vascular e fibroblastos (MONCADA, 1993; RANDOMSKI *et al.*, 1990; MAYER & ANDREW, 1998; COLASANTI & SUZUKI, 2000). Alguns trabalhos descrevem ainda uma quarta forma de NOS, com características intermediárias entre a cNOS e a iNOS, localizada nas mitocôndrias de diferentes órgãos (NOS mitocondrial - mtNOS) (GIULIVI *et al.*, 1998; ENKHBAATAR, 2004).

Enquanto a eNOS e a nNOS são enzimas constitutivas e dependentes de cálcio, a ação da iNOS requer a presença de um indutor, como por exemplo, um microorganismo invasor, endotoxina ou citocina. As citocinas mais importantes envolvidas na estimulação da iNOS são o TNF- α , IL1- β e interferon gama (INF- γ). (JIA *et al.*, 2006).

Após a indução, a iNOS produz grandes quantidades de NO, substancialmente maiores que as produzidas pela eNOS ou nNOS, e sua atividade continua até que o substrato seja exaurido. Dentro de condições de substrato reduzido (como a L-arginina), o NO produzido pela iNOS pode também levar a produção do ânion superóxido, mostrando a estreita interação entre o NO e as espécies reativas de oxigênio (ROS) (ESCH, 2002). O NO tem uma meia-vida “in vivo” extremamente curta (8-9 s), e é rapidamente degradado a nitrito (NO $_2^-$), e subsequentemente a nitrato (NO $_3^-$), os quais estão elevados na sepse (EVANS *et al.*, 1993). Entretanto, o NO pode reagir rapidamente com o superóxido para formar peroxinitrito (ONOO $^-$, um oxidante potente e altamente reativo). O peroxinitrito formado pode induzir dano celular incluindo agregação plaquetária, coagulação intravascular disseminada, peroxidação lipídica e dano mitocondrial (BURNEY, 1999; PARRAT, 1998).

A seqüência de eventos cardiovasculares durante a septicemia por LPS é complexa, mas pode ser vista como uma vasodilatação generalizada, o que leva ao final ao colapso circulatório devido a dois fatores: aumentada produção de NO e sensibilidade diminuída aos agentes vasoconstritores endógenos (NAVA *et al.*, 1992; MAYEUX, 1997; WOLKOW, 1998). Embora a evidência bioquímica para produção aumentada de NO e diminuída sensibilidade a agentes vasoconstritores endógenos é sólida, pouco foi estudado sobre o envolvimento de mecanismos fisiológicos durante o choque séptico induzido por LPS. Em trabalho recente, a função barorreflexa arterial foi estudada em ratos acordados e submetidos a uma dose letal de LPS. Nesse trabalho, os autores observaram que a sobrevivência dos animais era dependente da função barorreflexa (SHEN *et al.*, 2004). Outros estudos têm mostrado também que a sepse severa é caracterizada por falência autonômica a qual precede o choque e a falência múltipla de órgãos (SHARSHAR *et al.*, 2003). A ativação simpática prejudicada durante a septicemia parece desempenhar um papel bastante importante no desenvolvimento do choque séptico. ANNANE *et al.* (1999), têm demonstrado que o choque séptico é caracterizado por altas

concentrações nas catecolaminas circulantes, mas com modulação simpática prejudicada tanto nos vasos quanto no coração, sugerindo que a alteração na regulação autonômica central contribui para a falência circulatória.

Existem evidências de que o NO induzido pela iNOS deve ser o mediador mais importante para produzir as alterações cardiovasculares observadas na sepse. Em alguns modelos de endotoxemia, a redução da função miocárdica coincidiu com a indução da expressão da iNOS no miocárdio, aumento da atividade miocárdica da iNOS e formação de peroxinitrito (PRICE *et al.*, 2002; MITCHELL *et al.*, 2000). Em vasos sanguíneos isolados, o aumento da expressão e atividade da iNOS resultou em hiporesponsividade a agentes pressores (REES *et al.*, 1990). Camundongos “knockout” para iNOS apresentam menor hipotensão, além de apresentarem proteção total ou parcial contra a disfunção mecânica miocárdica quando submetidos à endotoxemia (CSONT *et al.*, 2005; McMICKING *et al.*, 1995).

Entretanto, os efeitos dos inibidores da iNOS na sepse são controversos. Vários estudos demonstraram que o bloqueio da iNOS foi benéfico no choque séptico em roedores anestesiados (KENGATHAVAN *et al.*, 1996; ARANOW *et al.*, 1996; UNNO *et al.*, 1997; NUMATA *et al.*, 1998). Por outro lado, existem estudos indicando que certos efeitos colaterais como baixo débito cardíaco, isquemia miocárdica, hipertensão pulmonar, e decréscimos de perfusão e oxigenação de órgãos, devem ser causados por inibidores da iNOS (MEYER *et al.*, 1994; AVONTUUR *et al.*, 1995; COHEN *et al.*, 1998). Um estudo em ratos acordados mostrou que a inibição da iNOS aumenta a disfunção de órgãos e o dano tecidual devido à septicemia (LEE *et al.*, 2005).

O exercício físico regular e adequado apresenta papel importante na manutenção da saúde (BLAIR *et al.*, 2001; KELLEY *et al.*, 2001; KOHL *et al.*, 2001). Por outro lado, exercícios de caráter exaustivo ou de alta intensidade podem causar diversos tipos de lesão, aumentando a produção de radicais livres e causando vários danos nos órgãos. Diversos estudos têm demonstrado que o exercício regular e de caráter moderado pode aumentar as funções antioxidantes e imunológicas, reduzindo a elevação dos níveis de TNF- α induzidos pela endotoxemia (MACKINNON *et al.*, 1994; NIEMAN *et al.*, 1993; PEDERSEN *et al.*, 2000).

O caráter protetor do exercício físico regular nas doenças cardiovasculares está bem estabelecido (RUSSEL *et al.*, 1989; TIPTON *et al.*, 1991; SHEPHARD & BALADY, 1999). Vários trabalhos têm evidenciado que o NO, atua na

regulação hemodinâmica e metabólica durante a prática de exercícios físicos. Um possível mecanismo envolvido nesta regulação é a alteração da resposta vascular endotélio-dependente a favor da vasodilatação. Alguns estudos têm demonstrado que o exercício físico crônico aumenta a vasodilatação endotélio-dependente induzida pela acetilcolina (Ach) e reduz a vasoconstrição induzida pela norepinefrina através de um aumento da produção de NO (CHEN & LI, 1993; CHEN *et al.*, 1994; DELP *et al.*, 1993; PARKER *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 1996). Além disso, o NO derivado do músculo é um importante regulador da contração e metabolismo muscular, onde parece modular a captação de glicose independentemente do fluxo sanguíneo (KINGWELL, 2000; BALON *et al.*, 1994, 1997; ROBERTS *et al.*, 1997; BRADLEY *et al.*, 1999).

O exercício físico regular promove adaptações nos vários sistemas formadores de NO, os quais aumentam a sua biodisponibilidade através de uma variedade de mecanismos, incluindo aumento da expressão e atividade da NOS (KINGWELL, 2000).

Em animais submetidos a uma sessão de exercício agudo em esteira motorizada, a atividade da NOS total está aumentada, principalmente no músculo esquelético (ROBERTS *et al.*, 1999). Em outro trabalho com animais submetidos a treinamento físico por natação, a atividade da nNOS está aumentada no músculo esquelético e a eNOS está aumentada nos pulmões, átrios e na aorta (TATCHUM-TALOM *et al.*, 2000). Uma possível explicação para o aumento da atividade da NOS com o exercício é o aumento do conteúdo de cálcio nas fibras musculares durante a contração, fazendo com que haja a ativação das vias constitutivas da NOS (nNOS e eNOS) (HIRAI *et al.*, 1994; ROBERTS *et al.*, 1999). O aumento da atividade da NOS pode ocorrer também quando há aumento da demanda metabólica no músculo esquelético (depleção de glicogênio), tendo em vista que o NO também desempenha um importante papel no transporte de glicose para o músculo durante a contração muscular (BALON *et al.*, 1997; ROBERTS *et al.*, 1997). Assim, a produção aumentada do NO durante o exercício pode estar envolvida no aumento do fluxo sanguíneo e transporte de glicose para o músculo esquelético, o que sugere que o NO possa ser um mediador chave no metabolismo durante o exercício (ROBERTS *et al.*, 1999, CARTEE *et al.*, 1989).

Muitos trabalhos indicam que o NO contribui para as alterações fisiopatológicas envolvidas na lesão pulmonar aguda, como no edema pulmonar rico

em proteínas, estresse oxidativo e disfunção de surfactante. Muitos autores tem relatado, que um aumento na atividade da iNOS pode levar a lesão microvascular e edema pulmonar rico em proteínas em uma variedade de modelos animais de edema pulmonar, como na endotoxemia induzida pela administração de lipopolissacárideos (LASZLO *et al.*, 1995; PHENG *et al.*, 1995; LI *et al.*, 1998; NUMATA *et al.*, 1998; SCUMPIA *et al.*, 2002; KOIZUMI *et al.*, 2004). Por outro lado, o papel da cNOS na sepse parece ser controverso, sendo que o L-NAME pode inibir um aumento no NO exalado dos pulmões, mas não reduz a inflamação pulmonar, e muitas vezes, contribui para aumentá-la (AARON *et al.*, 1998).

Um grande número de trabalhos experimentais tem demonstrado que a cNOS e a iNOS são reguladas inversamente tanto nas células quanto nos tecidos. Neste sentido, tem sido observado que muitos fatores que estimulam a atividade catalítica da cNOS, ou aumentam a expressão da enzima, agem como redutores ou supressores da expressão da iNOS (COLASANTI & SUZUKI, 2000; MARIOTTO *et al.*, 2004; PERSICHINI *et al.*, 2006). Em um estudo recente, (COMINI *et al.*, 2005), foi observado que tanto a nNOS quanto a eNOS apresentaram redução na expressão em resposta ao tratamento com LPS, enquanto houve um aumento da expressão da iNOS. O cálcio citosólico parece ser afetado pelo LPS, mas esta alteração provavelmente não é dada pela produção endógena de NO. Este estudo sugere que todas as isoformas da NOS são alteradas de diferentes maneiras pela endotoxemia.

O exercício parece estar envolvido como um importante fator no aumento da expressão de ambas eNOS (SESSA *et al.*, 1994) e nNOS (MOHAN *et al.*, 2000). Ao mesmo tempo, vários padrões de expressão da iNOS tem sido observados: uma redução na ativação da iNOS na aorta de coelhos em 8 semanas de treinamento físico em esteira (YANG & CHEN, 2003), nenhuma alteração foi observada nos músculos ventilatórios e dos membros após 4 semanas de treinamento em esteira (VASSILAKOPOULOS *et al.*, 2003), ou ainda um aumento da iNOS em células endoteliais da aorta de ratos após 10 semanas de treinamento (YANG *et al.*, 2002). O fato é que o metabolismo do NO em indivíduos submetidos ao treinamento físico parece estar alterado. Estas alterações parecem depender do tipo ou da intensidade do exercício, o que contribui para o condicionamento cardiovascular dado pelo treinamento físico. Em um trabalho bastante recente (CHEN *et al.*, 2007), as respostas à sepse após treinamento físico foram avaliadas

em ratos acordados. Entretanto, o envolvimento do óxido nítrico após o treinamento físico e seus efeitos cardiovasculares e pulmonares induzidos pela endotoxemia ainda não foram avaliados.

Dessa forma, a proposta desta dissertação é avaliar os possíveis efeitos benéficos ou não do treinamento físico pela natação, de intensidade moderada, em animais submetidos à septicemia quando comparados com animais sedentários. Também caracterizar a participação das vias de produção de NO, utilizando bloqueadores da NOS das vias constitutiva e indutiva, em animais sedentários e treinados. Além dos parâmetros cardiovasculares de pressão arterial e frequência cardíaca foram também avaliados o peso pulmonar (para calcular o índice de edema) e a concentração plasmática de TNF- α .

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo principal foi avaliar os parâmetros cardiovasculares, pulmonares e imunológicos induzidos pela administração de LPS em ratos acordados sedentários ou submetidos previamente ao treinamento físico pela natação. Além disso, analisar o papel das vias produtoras de NO em animais com endotoxemia e normais submetidos ou não ao treinamento físico pela natação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar os parâmetros de eficácia do treinamento físico:
 - 1.1 – Frequência cardíaca de repouso;
 - 1.2 - Ganho de peso corporal;
 - 1.3 – Índice de massa muscular cardíaca e esquelética.

2. Analisar os parâmetros cardiovasculares (PAM e FC) em animais normais, sedentários ou submetidos ao treinamento físico, após a administração de um dos inibidores da NOS: Aminoguanidina (iNOS), L-NAME (cNOS) e 7-NI (nNOS);

3. Analisar os seguintes parâmetros em animais com endotoxemia induzida por LPS, sedentários ou submetidos ao treinamento físico, após a administração de um dos inibidores da NOS (Aminoguanidina, L-NAME e 7-NI):
 - 3.1. Pressão arterial média e frequência cardíaca;
 - 3.2. Ganho de peso pulmonar e índice de edema pulmonar
 - 3.4. TNF- α plasmático.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Este trabalho foi realizado no Departamento de Ciências Fisiológicas (CIF) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade.

Para esta pesquisa foram utilizados ratos Wistar machos, provenientes do Biotério Central da UEL. Os animais tiveram peso padronizado entre 200 a 220 gramas no início do treinamento, e foram mantidos em gaiolas coletivas (máximo de seis animais) à temperatura constante de 21 ± 2 °C, com ciclo claro/escuro de 12 horas. Água e ração foram fornecidas “*ad libitum*”.

3.2 TREINAMENTO FÍSICO

Os animais destinados ao treinamento físico tiveram seus pesos avaliados diariamente antes do início de cada sessão. O treinamento consistiu de 20 sessões (4 semanas) de uma hora de natação diária, durante cinco dias por semana, de acordo com MARTINS-PINGE *et al.* (2005).

Na primeira semana houve aumento gradual do período de natação até alcançar o tempo de uma hora, iniciando com quinze minutos no primeiro dia, seguido de trinta minutos no segundo dia, quarenta e cinco minutos no terceiro dia e sessenta minutos a partir do quarto dia. Durante o período de treinamento o grupo controle sedentário, teve seu peso avaliado paralelamente aos animais submetidos ao treinamento.

Os animais realizaram o treinamento em um tanque de vidro (100 X 60 X 50 cm) contendo água aquecida a 31 ± 1 ° C, a uma profundidade de 40 cm. Após cada sessão de natação diária os animais foram colocados em caixa para aquecimento e secagem. Depois de secos retornavam ao biotério.

3.3 CANULAÇÃO DA ARTÉRIA E VEIA FEMORAIS

Os animais sedentários e treinados foram submetidos à cirurgia sob anestesia de tribromoetanol 2,5%, ou pentobarbital sódico (50 mg/kg) por via intraperitoneal, para implantação de cateteres na artéria e veia femorais. Os vasos foram dissecados e cateteres de polietileno foram introduzidos na artéria e veia femorais. Os cateteres eram constituídos por segmentos de polietileno PE-10 (4-5 cm) soldados a segmentos de polietileno PE-50 (12-13 cm), previamente preenchidos com solução salina e anticoagulante (15 U/mL de heparina em solução salina) e obstruídos com pino de metal.

Após a implantação dos cateteres, os mesmos foram exteriorizados na região dorsal do animal através de um trocater por via subcutânea, e fixados à pele por sutura cirúrgica.

O cateter arterial foi utilizado para registro da pressão arterial e o cateter venoso para administração de drogas. O registro da pressão arterial foi realizado 24 horas após o procedimento cirúrgico de implantação dos cateteres, permitindo a recuperação dos animais dos efeitos anestésicos. Os animais foram mantidos em caixas individuais durante todo o período pós-operatório e de registro da pressão arterial.

3.4 REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL E DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

A cânula arterial do animal foi acoplada a um transdutor de pressão (MLT0380, ADInstruments) conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (Powerlab, 4/20T, ADInstruments), obtendo-se assim a pressão pulsátil (PA), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). Durante o período de registro os animais foram mantidos dentro de caixas individuais em ambiente silencioso. Experimentos pilotos já evidenciaram que os procedimentos utilizados neste protocolo não causam reações dolorosas ou outro tipo de comportamento que interfira no registro cardiovascular.

3.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.5.1 Análise da pressão arterial e frequência cardíaca

No dia do experimento o animal foi mantido em sua gaiola moradia e os registros basais foram obtidos por pelo menos 30 minutos. Durante esse período e até o final do experimento o ambiente era silencioso e desprovido de estímulos estressantes. Após o registro basal da pressão arterial (30 min), os animais do grupo sedentário e do grupo treinado foram submetidos à administração endovenosa de um dos seguintes inibidores da NOS: aminoguanidina (Amino) 20 mg/kg, 7-nitroindazol (7-NI) 25 mg/kg, N^G-nitro-L-arginina methyl ester (L-NAME) 20 mg/kg, solução salina (NaCl 0,9%), ou dimetilsulfóxido (DMSO). Todas as drogas foram dissolvidas em solução salina, exceto o 7-NI que foi diluído em DMSO 100%. Em outros experimentos, após a administração do inibidor os animais do grupo sedentário e treinado foram submetidos à endotoxemia. Neste grupo, após o período de 10 minutos da administração do inibidor, foi injetada uma dose (in “bolus”) de Lipopolissacáride de *Escherichia coli* (LPS) sorotipo 026:B6 (5 mg/kg). A avaliação cardiovascular após a administração do inibidor ou indução da septicemia por LPS foi então registrada por duas horas.

3.5.2 Análise do edema pulmonar

O índice de edema pulmonar foi avaliado no grupo sedentário e treinado. Todos os animais foram inicialmente tratados com os seguintes inibidores: aminoguanidina (Amino) 20mg/kg, L-NAME 20 mg/kg, 7-nitroindazol (7NI) 8 mg/kg ou solução salina (0,9%). Após um período de 10 minutos foi administrado nos animais o LPS (5mg/kg) de *Escherichia coli* sorotipo 026:B6, aguardando-se um período de 5 horas até que os animais fossem sacrificados com uma sobredose de anestésico (pentobarbital sódico).

Os animais sacrificados foram submetidos à toracotomia e após exangüinação os pulmões livres dos tecidos mediastinais foram retirados e pesados, para avaliação do ganho de peso pulmonar. Além da retirada dos pulmões, foi feita também a retirada do coração e dos músculos sóleo e gastrocnêmio, para análise dos pesos musculares e cálculo do índice de massa muscular (IMM), dado pela relação do peso muscular (PM) e peso corporal (PC) de cada animal multiplicado por 100 ($IMM = PM/PC \times 100$).

O ganho de peso pulmonar foi calculado como segue:

$$GPP = \frac{(PP \text{ final} - PP \text{ inicial})}{PP \text{ inicial}}$$

O peso pulmonar final (PP final) foi obtido através da pesagem dos pulmões ao final dos experimentos, já o peso pulmonar inicial (PP inicial) foi calculado segundo *SU et al* (2007), através da seguinte equação de regressão:

$$PP \text{ (g)} = 0,0015 \times PC + 0,034$$

O edema foi avaliado pelo seu índice calculado pela relação entre os pesos pulmonar e corporal de cada animal e multiplicado por 100 ($PP/PC \times 100$) (*Lee et al.*, 2001). Nos casos em que ocorreu morte do animal antes do período de 5 horas após a administração de LPS, a pesagem dos pulmões se deu imediatamente.

3.5.3 Quantificação de TNF- α

Amostras de sangue (1,5 ml) foram coletadas dos grupos sedentários e treinados não submetidos ao registro cardiovascular através da cânula arterial, antes e 2 horas depois da administração de salina e LPS, ou L-NAME e LPS. O sangue foi centrifugado a 4500 g por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a quantificação de TNF- α através do método ELISA, utilizando um kit de anticorpo comercial, padrões recombinantes e um sistema de detecção de avidina-peroxidase (PeproTech, México).

Basicamente o protocolo utilizado para a quantificação do TNF- α

plasmástico pode ser descrito da seguinte maneira: a placa de ELISA com 96 poços foi revestida com 100µl de anticorpo de captura, diluído em PBS à uma concentração de 1µg/ml. A placa foi incubada “overnight” à temperatura ambiente. Após este período, os poços foram aspirados e lavados 4 vezes com 300 µl de tampão de lavagem (0,05 % Tween – 20 em PBS pH 7,4), em seguida a placa foi invertida para remoção dos resíduos do tampão. Em seguida, adicionou-se 300 µl de tampão de bloqueio (1% BSA em PBS pH 7,4) em cada poço, seguido de incubação por 1 hora à temperatura ambiente, aspiração e lavagem por 4 vezes. Procedeu-se então ao preparo da curva-padrão e amostras. O padrão foi diluído em série à partir da concentração de 2 ng/ml (2 ng/ml, 1 ng/ml, 0,5 ng/ml, 0,25 ng/ml, 0,125 ng/ml, 0,0625 ng/ml, 0,03125 ng/ml e 0 ng/ml) até 0, e imediatamente 100 µl do padrão ou amostra foram adicionados a cada poço em triplicata e incubados à temperatura ambiente por 2 horas. A placa foi então lavada por 4 vezes, e foi adicionado o anticorpo de detecção à uma concentração de 0,25 µg/ml , seguida de incubação por 2 horas. A placa foi aspirada e lavada por 4 vezes com tampão de lavagem, e uma alíquota de 6 µl de avidina peroxidase (1:2000), foi diluída em 12 ml de diluente, sendo adicionado 100 µl desta solução em cada poço da placa de ELISA, seguida de incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. Procedeu-se a lavagem e aspiração da placa por mais 4 vezes e então foi adicionada 100 µl de solução do substrato ABTS em cada poço da placa, seguida de incubação à temperatura ambiente para o desenvolvimento de cor. A leitura da absorbância foi feita em leitora automática de microplacas (modelo ELX-800, Biotek Instruments Inc.) em 405 nm.

3.6 DROGAS UTILIZADAS

- Cloreto de sódio P.A. Casa Americana de Produtos para Laboratório-CAAL;
- Aminoguanidina. Sigma Chemical Company, St Louis - USA;
- N^G-nitro-L-arginina methyl ester (L-NAME). Research Biochemicals (RBI), Natick, USA;
- 7- nitroindazol (7-NI). Sigma Chemical Company, St Louis - USA;

- Dimetilsulfóxido (DMSO) P.A. Merck, USA;
- LPS sorotipo 026:B6. Sigma Chemical Company, St Louis - USA;
- Tribromoetanol. Sigma Chemical Company, St Louis - USA;
- Heparina Sódica. Laboratórios Roche, Brasil;
- Tween 20. Sigma Chemical Company, St Louis - USA;
- BSA 1% .Sigma Chemical Company, St Louis – USA

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Comparações feitas num mesmo animal ao longo do tempo foram analisadas por Análise de Variância (ANOVA). Para as variações de tempo num mesmo animal foi utilizado o teste t' de Student pareado. As comparações entre sedentários e treinados em um mesmo tempo foram analisadas pelo teste t' de Student não pareado. As diferenças foram consideradas significantes para um valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EFICÁCIA DO TREINAMENTO FÍSICO

Os valores basais da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC) para cada grupo experimental foram obtidos do valor médio do período de registro inicial de 30 minutos. A tabela 2 mostra os valores da PAM e da FC dos diferentes grupos experimentais evidenciando a bradicardia de repouso no grupo submetido ao treinamento físico (TF), quando comparado ao grupo sedentário (SED) ($p < 0,05$). O acompanhamento dos pesos corporais dos animais sedentários e dos animais treinados mostrou uma diminuição no ganho de peso corporal nos animais treinados, que foi estatisticamente significativa a partir do décimo dia de treinamento (Figura 1). Em relação ao índice de massa muscular (IMM), houve um aumento do IMM do músculo cardíaco no grupo TF ($0,48 \pm 0,04$), quando comparado ao grupo SED ($0,37 \pm 0,01$), enquanto não houve diferenças estatísticas no IMM dos músculos sóleo e gastrocnêmio (Tabela 1). Estes dados em conjunto demonstram a efetividade do treinamento físico pela natação.

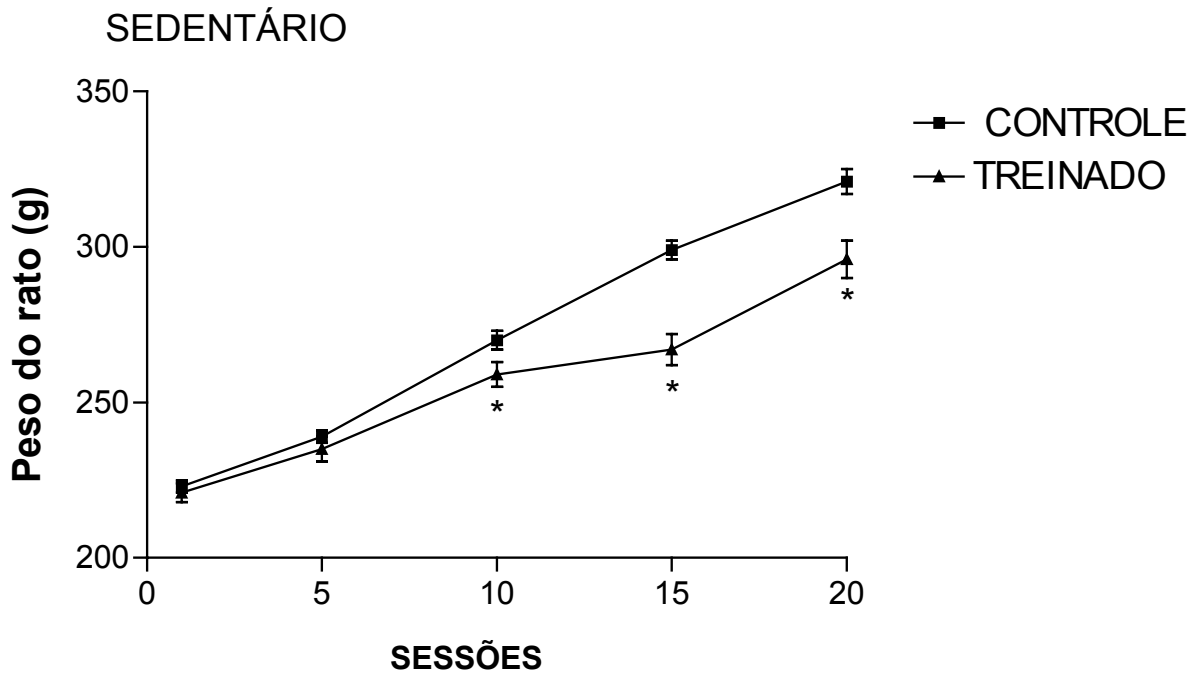


FIGURA 1 – Evolução temporal do peso corporal dos ratos dos grupos sedentário e treinado. * $p < 0,05$. Cada ponto no gráfico representa a média \pm EPM do peso corporal para ambos os grupos.

TABELA 1 – Valores médios de índice de massa muscular dos grupos sedentário ($n=8$) e treinado ($n=11$). * diferença em relação ao grupo sedentário $p < 0,05$.

	SEDENTÁRIO	TREINADO
SÓLEO	0,09 \pm 0	0,09 \pm 0
GASTROCNÊMIO	0,51 \pm 0,01	0,53 \pm 0,02
CORAÇÃO	0,37 \pm 0,01	0,48 \pm 0,04 *

	Sedentário SALINA n=9	Treinado SALINA n=11	Sedentário AMINO n=9	Treinado AMINO n=8	Sedentário L-NAME n=9	Treinado L-NAME n=8	Sedentário DMSO n=6	Treinado DMSO n=4	Sedentário 7NI n=8	Treinado 7NI n=7
PAM	105 ± 2	115 ± 0 *	103 ± 1	111 ± 2 *	110 ± 3	108 ± 2	107 ± 7	106 ± 2	111 ± 5	106 ± 2
FC	371 ± 8	294 ± 8 *	383 ± 12	312 ± 14*	386 ± 4	324 ± 14*	369 ± 11	312 ± 4*	343 ± 10	311 ± 7*

Tabela 2 – Valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) dos grupos experimentais tratados com os diferentes inibidores e com administração de LPS. * diferença em relação ao grupo sedentário correspondente, (p<0,05)

4.2 ANÁLISE DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES, PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA EM ANIMAIS SEDENTÁRIOS OU SUBMETIDOS AO TREINAMENTO FÍSICO, APÓS A ADMINISTRAÇÃO DOS INIBIDORES DA NOS

Foi realizada a administração dos inibidores da NOS após 30 minutos de registro basal da PAM e da FC, seguido do registro de 2 horas dos parâmetros cardiovasculares. As análises foram realizadas a partir do tempo 0, ou seja, imediatamente antes da administração do inibidor e cerca de 25 minutos após a administração, onde foram encontrados os valores máximos da resposta (Δ PAM e Δ FC). A relação dos valores médios da pressão arterial e frequência cardíaca após a administração dos inibidores da NOS durante o período de 2 horas está representada nas Figuras 2A e B, 3A e B.

A Figura 4 A e B mostra a variação máxima da pressão arterial média (Δ PAM) e da frequência cardíaca (Δ FC) nos diferentes grupos experimentais sedentários e submetidos ao treinamento físico, após a administração dos diferentes inibidores da NOS.

No grupo sedentário aminoguanidina foi observado um aumento na variação máxima da PAM (Δ PAM = + 20 \pm 8 mmHg, t = 0-20 min., n=5; Fig. 4A), em relação ao grupo treinado aminoguanidina (Δ PAM = -1 \pm 5 mmHg, t = 0-15 min.; n=6; Fig. 4A) com p<0,05, já em relação à FC não houve diferença significativa entre o grupo sedentário aminoguanidina (Δ FC= -7 \pm 15 bpm, t = 0-15 min.; n=5; Fig.4B), e o grupo treinado aminoguanidina (Δ FC= +13 \pm 5 bpm, t = 0-15 min; n=6; Fig.4B).

No grupo sedentário L-NAME foi observado um aumento na variação máxima da PAM (Δ PAM = +52 \pm 3 mmHg; t = 0-20 min; n=6; Fig. 4A), em relação ao grupo treinado L-NAME (Δ PAM= +42 \pm 1 mmHg, t = 0-25 min; n=3; Fig. 4A) com p<0,05, não demonstrando qualquer diferença significativa na FC entre o grupo sedentário L-NAME (Δ FC= -59 \pm 6 bpm; t = 0-20 min; n=6; Fig. 4B), e o grupo treinado L-NAME (Δ FC= -75 \pm 23 bpm; t = 0-25 min; n=3; Fig. 4B).

No grupo sedentário DMSO não foram observadas diferenças significativas no Δ PAM (Δ PAM= +8 \pm 4 mmHg; t = 0-20 min.; n=5; Fig. 4A), em relação ao grupo treinado DMSO (Δ PAM= +3 \pm 18 mmHg; t = 0-15 min; n=3; Fig. 4A). No Δ FC não houve alteração estatisticamente significativa no grupo sedentário DMSO (Δ FC= -9 \pm 10 bpm; t = 0-20 min; n=5; Fig. 4B), quando comparado ao grupo

treinado DMSO ($\Delta FC = -36 \pm 5$ bpm; $t = 0-15$ min; $n=3$; Fig. 4B).

No grupo sedentário tratado com 7-NI, não foram observadas diferenças significativas no ΔPAM ($\Delta PAM = +20 \pm 3$ mmHg; $t = 0-10$ min; $n=5$; Fig. 4A), em relação ao grupo treinado 7-NI ($\Delta PAM = +23 \pm 5$ mmHg; $t = 0-25$ min; $n=4$; Fig. 4A), não havendo também diferença significativa entre os valores de ΔFC do grupo sedentário 7-NI ($\Delta FC = -49 \pm 15$ bpm; $t = 0-10$ min; $n=5$; Fig. 4B) e do grupo treinado 7-NI ($\Delta FC = -11 \pm 21$ bpm; $t = 0-25$ min; $n=4$; Fig. 4B).

No entanto, foi evidenciado um aumento significativo da ΔPAM no grupo sedentário 7-NI ($\Delta PAM = +20 \pm 3$ mmHg; $t = 0-10$ min), quando comparado ao grupo sedentário DMSO ($\Delta PAM = +8 \pm 4$ mmHg; $t = 0-20$ min; $p < 0,05$ Fig. 4A). Os valores de ΔFC também foram estatisticamente diferentes no grupo sedentário 7-NI ($\Delta FC = -49 \pm 15$ bpm; $t = 0-10$ min), quando comparados ao grupo sedentário DMSO ($\Delta FC = -9 \pm 10$ bpm; $t = 0-20$ min; $p < 0,05$; Fig. 4B).

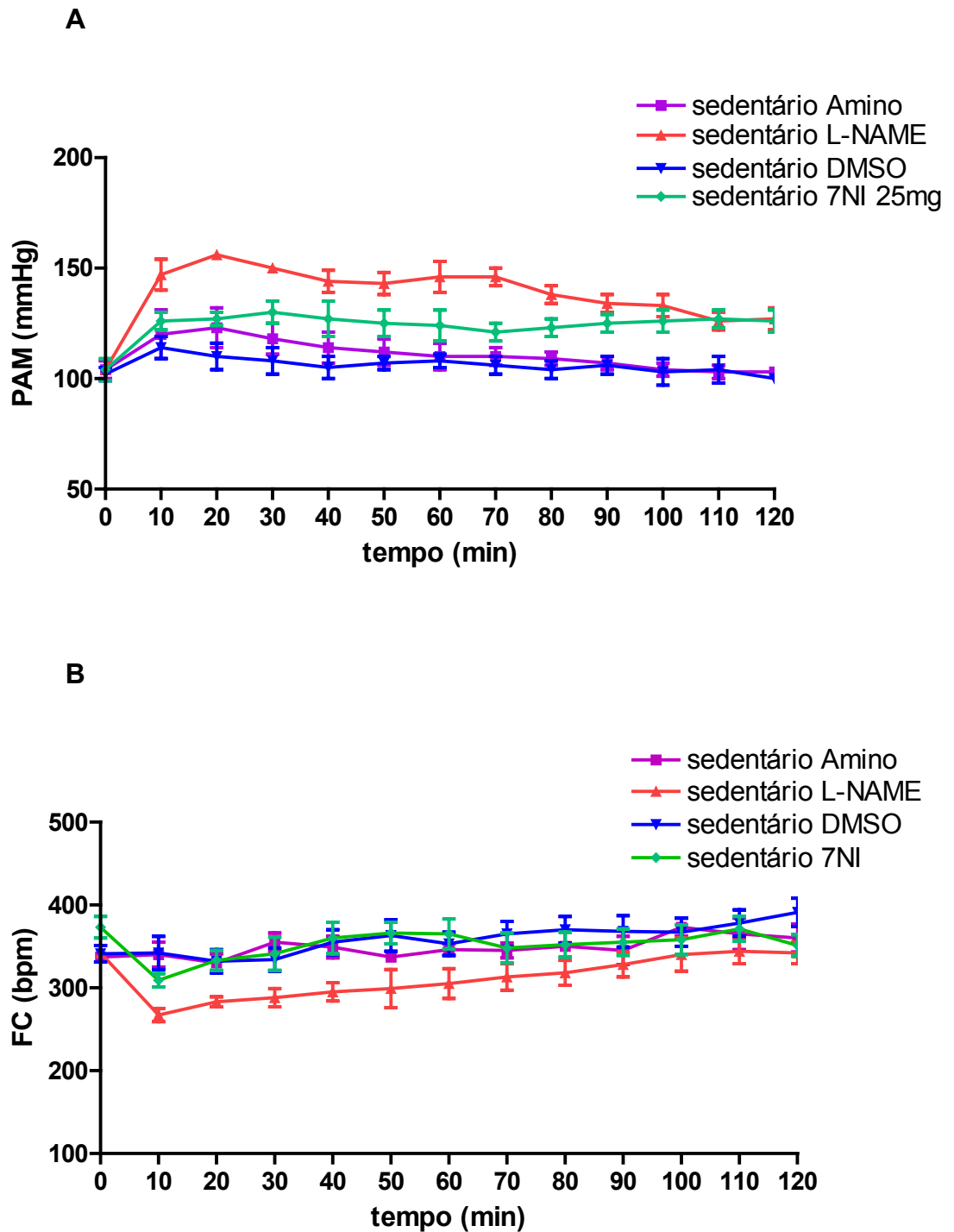
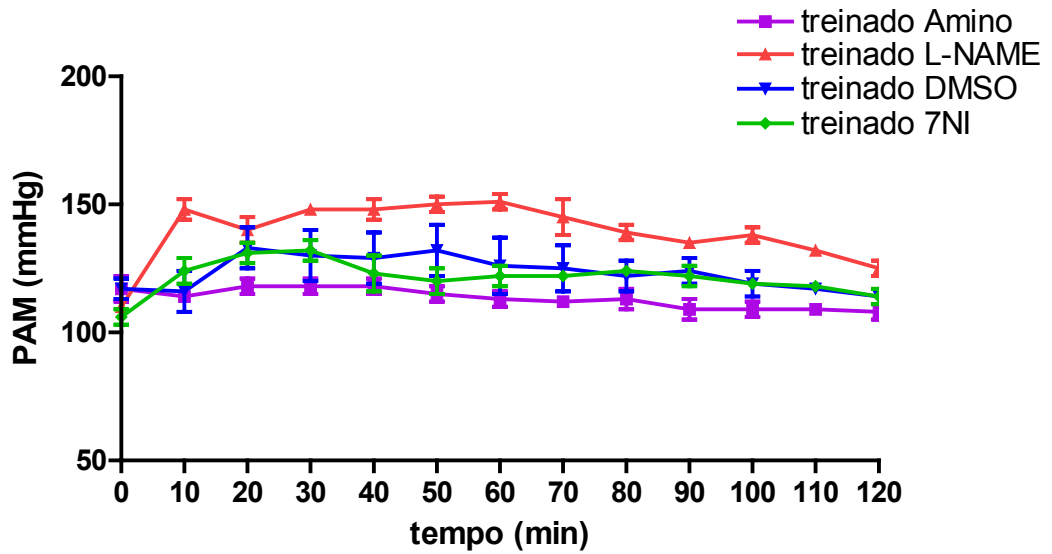


FIGURA 2 – Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B), após a administração dos inibidores da NOS, nos grupos sedentários: aminoguanidina (n=5), L-NAME (n=6), DMSO (veículo, n=5) e 7-NI (n=5).

A



B

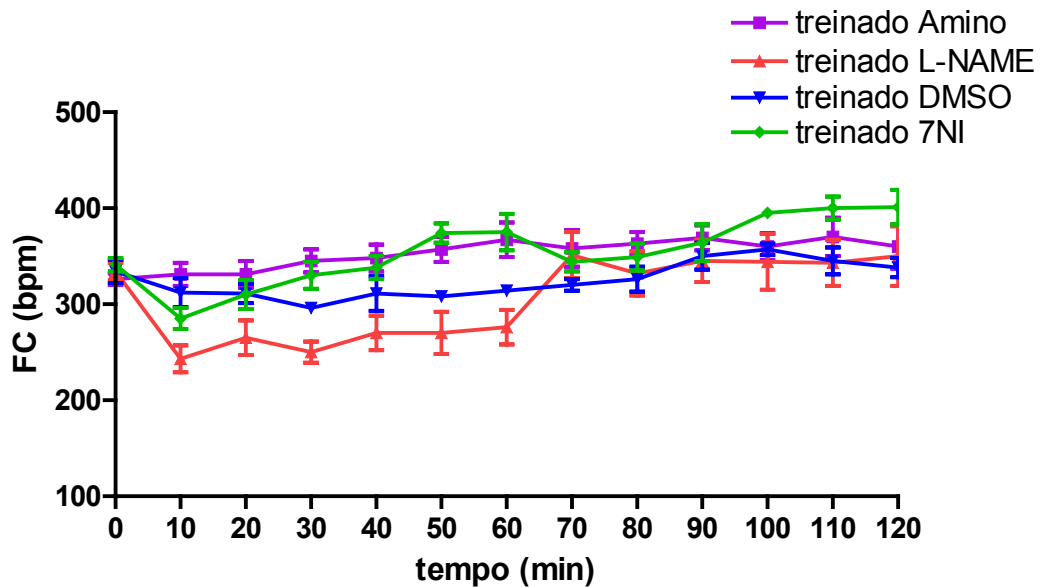


FIGURA 3 – Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B), após a administração dos inibidores da NOS, nos grupos submetidos ao treinamento físico (TF): aminoguanidina (n=6), L-NAME (n=3), DMSO (veículo, n=3), 7-NI (n=4).

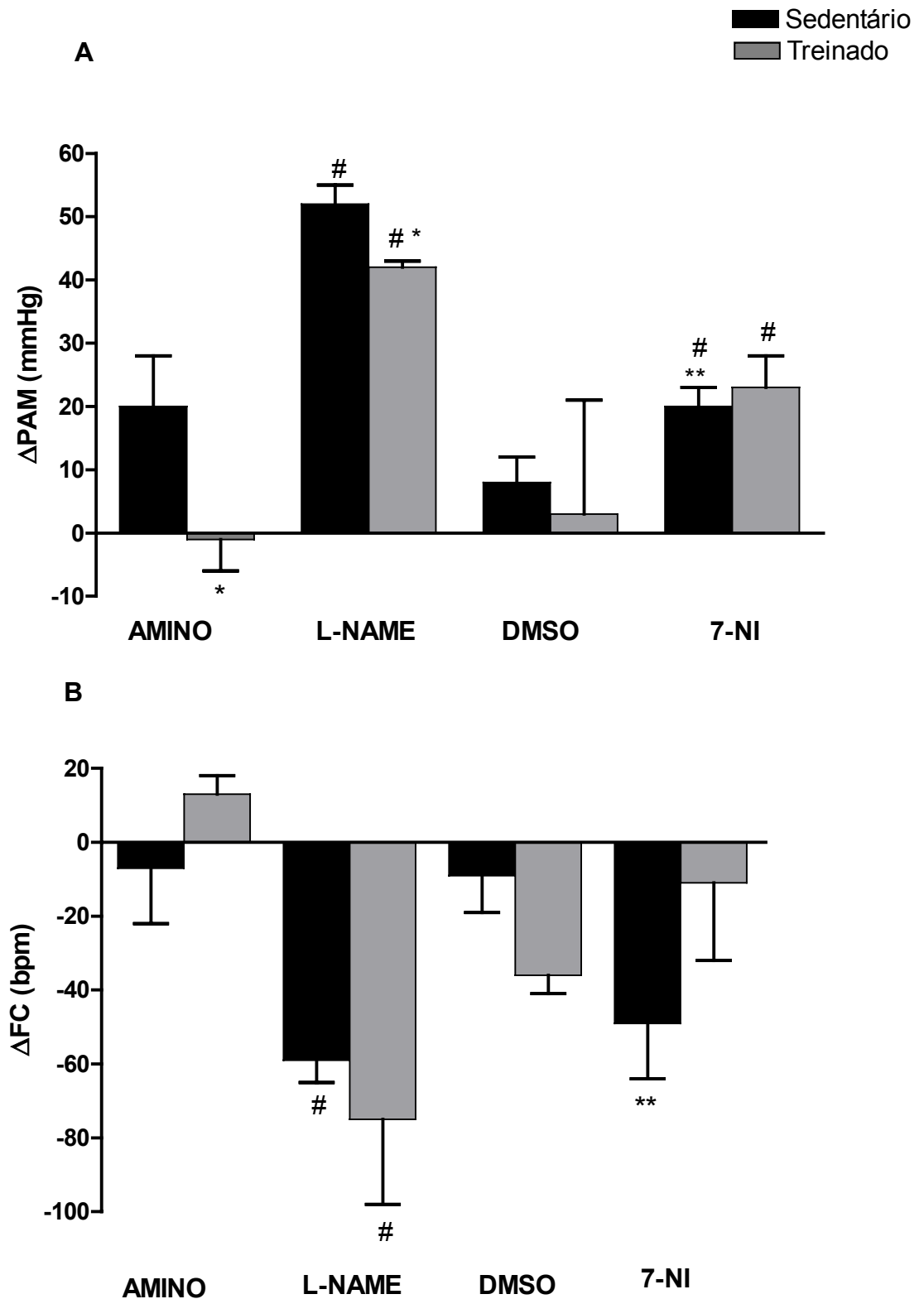


FIGURA 4 – Variação máxima da pressão arterial média (Δ PAM) (A), e da frequência cardíaca (Δ FC) (B), após a administração dos diferentes inibidores da NOS. # Diferença em relação aos valores basais ($p < 0,05$). * Diferença entre o grupo sedentário e grupo treinado ($p < 0,05$). ** Diferença entre o grupo sedentário 7-NI e o grupo sedentário DMSO ($p < 0,05$).

4.3 ANÁLISE DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA EM ANIMAIS SEDENTÁRIOS OU SUBMETIDOS AO TREINAMENTO FÍSICO, COM ENDOTOXEMIA INDUZIDA POR LPS, APÓS A ADMINISTRAÇÃO DOS INIBIDORES DA NOS OU SALINA

Após trinta minutos do registro basal da PAM e FC, os animais dos diferentes grupos experimentais sedentários e treinados foram tratados com salina, DMSO, ou com inibidores da NOS, e aguardou-se um período de 10 minutos sendo, em seguida, realizada a administração endovenosa de LPS. Os efeitos cardiovasculares promovidos pela administração de LPS nos diferentes grupos experimentais foram registrados por 2 horas.

4.3.1 Efeitos do pré-tratamento com salina

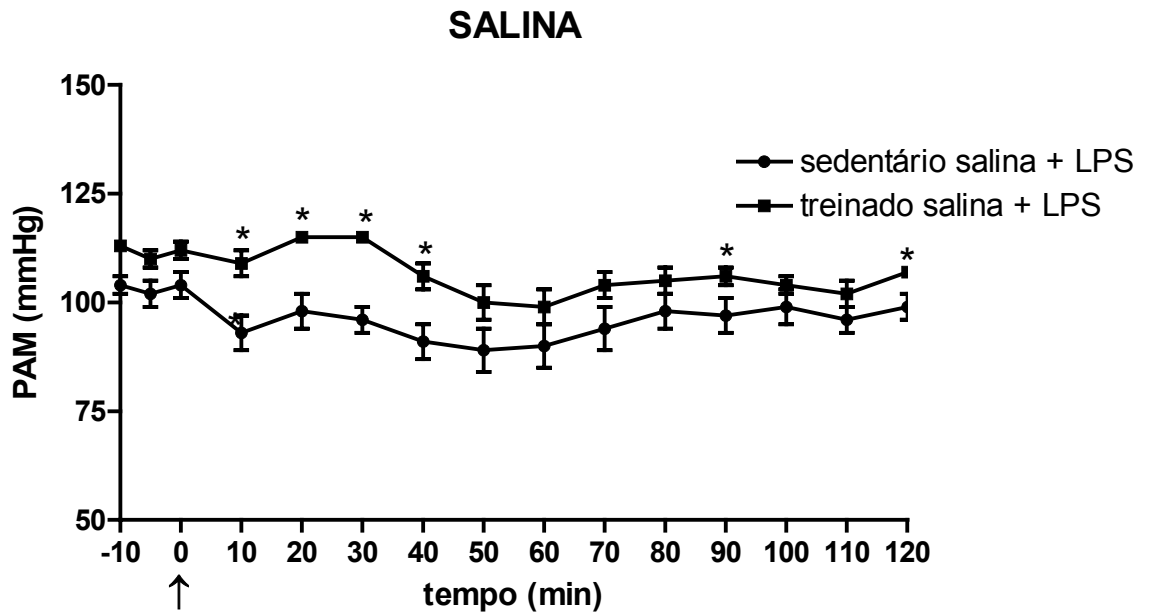
As alterações cardiovasculares na PAM e FC, dadas pela administração de LPS em animais sedentários e treinados tratados com salina são mostradas na Fig. 5 A e B. Após a administração de LPS, foram observadas três fases distintas na PAM durante as primeiras 2 horas: uma redução inicial na PAM (fase 1: 5 minutos), seguida de recuperação na PAM (fase 2: 25 minutos) e por último uma segunda e mantida queda na PAM (fase 3: 50 minutos).

O grupo sedentário salina apresentou uma queda significativa nos valores da PAM na fase 1 (antes: 104 ± 3 mmHg vs. depois: 89 ± 6 mmHg; $t = 0-5$ minutos; $p < 0,05$), enquanto no grupo treinado salina esta queda não foi significativa (antes: 112 ± 2 mmHg vs. depois: 109 ± 2 mmHg; $t = 0-5$ minutos; $p > 0,05$), sendo que ambos os grupos apresentaram um aumento significativo na FC em relação ao valor basal. Na fase 2, o grupo sedentário salina apresentou uma recuperação da queda na PAM (antes: 104 ± 3 mmHg vs. depois: 99 ± 4 mmHg; $t = 0-25$ minutos; $p > 0,05$), enquanto que no grupo treinado houve um aumento da PAM (antes: 112 ± 2 mmHg vs. depois: 116 ± 1 mmHg; $t = 0-25$ minutos; $p < 0,05$), acompanhado de um aumento significativo da FC (antes: 304 ± 8 bpm vs. depois: 378 ± 19 bpm; $t = 0-25$ minutos; $p < 0,05$). Na fase 3, foi observado queda significativa da PAM seguida de aumento

da FC em ambos os grupos, sem diferença significativa entre os grupos.

A análise dos valores de PAM e FC máximos durante as 3 fases após administração de LPS pode ser observada na Figura 6 A e B. Na fase 1 o grupo treinado salina apresentou uma menor queda do Δ PAM (Δ PAM= -3 ± 3 mmHg), em relação ao grupo sedentário (Δ PAM= -15 ± 5 mmHg), com $p < 0,05$. Os valores do Δ FC não foram diferentes para ambos os grupos. Na fase 2, o grupo treinado apresentou ao invés de queda, um aumento na PAM (Δ PAM= $+4\pm 2$ mmHg) estatisticamente diferente do sedentário salina (Δ PAM= -5 ± 2 mmHg). Na fase 3, houve queda nos valores do Δ PAM tanto no grupo sedentário salina (Δ PAM= -14 ± 4 mmHg), quanto no grupo treinado (Δ PAM= -12 ± 3 mmHg), seguida de aumento do Δ FC mas sem diferença estatística entre ambos os grupos (Figs. 20 A e B). A análise dos valores de PAM e FC obtidos nas diferentes fases evidenciam uma atenuação da resposta hipotensora após a administração de LPS no grupo treinado salina, durante as fases 1 e 2.

A



B

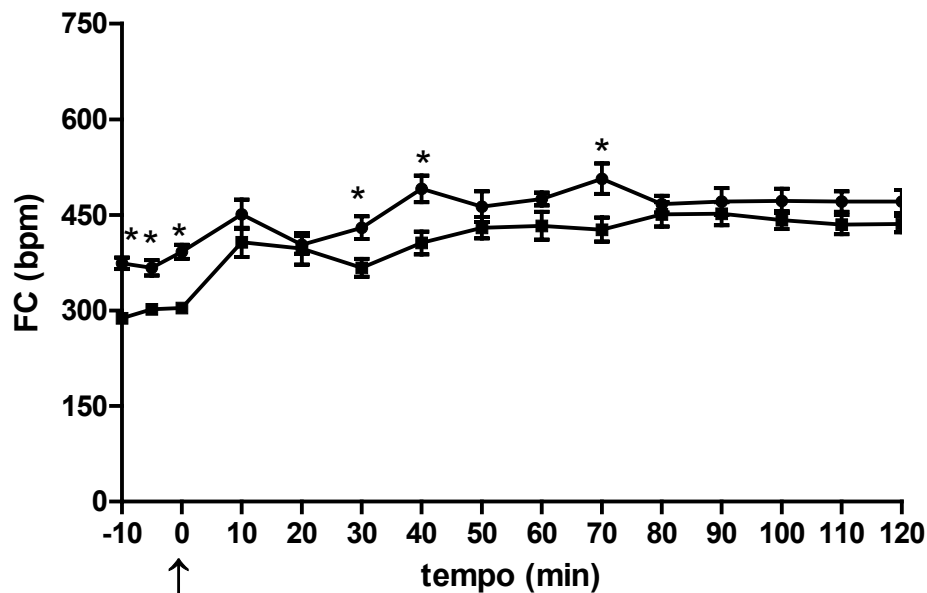


FIGURA 5 – Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B), após a administração de LPS no grupo sedentário (n=9) e treinado (n=11). A seta indica o momento da administração de LPS. * grupo treinado vs. grupo sedentário (p<0,05).

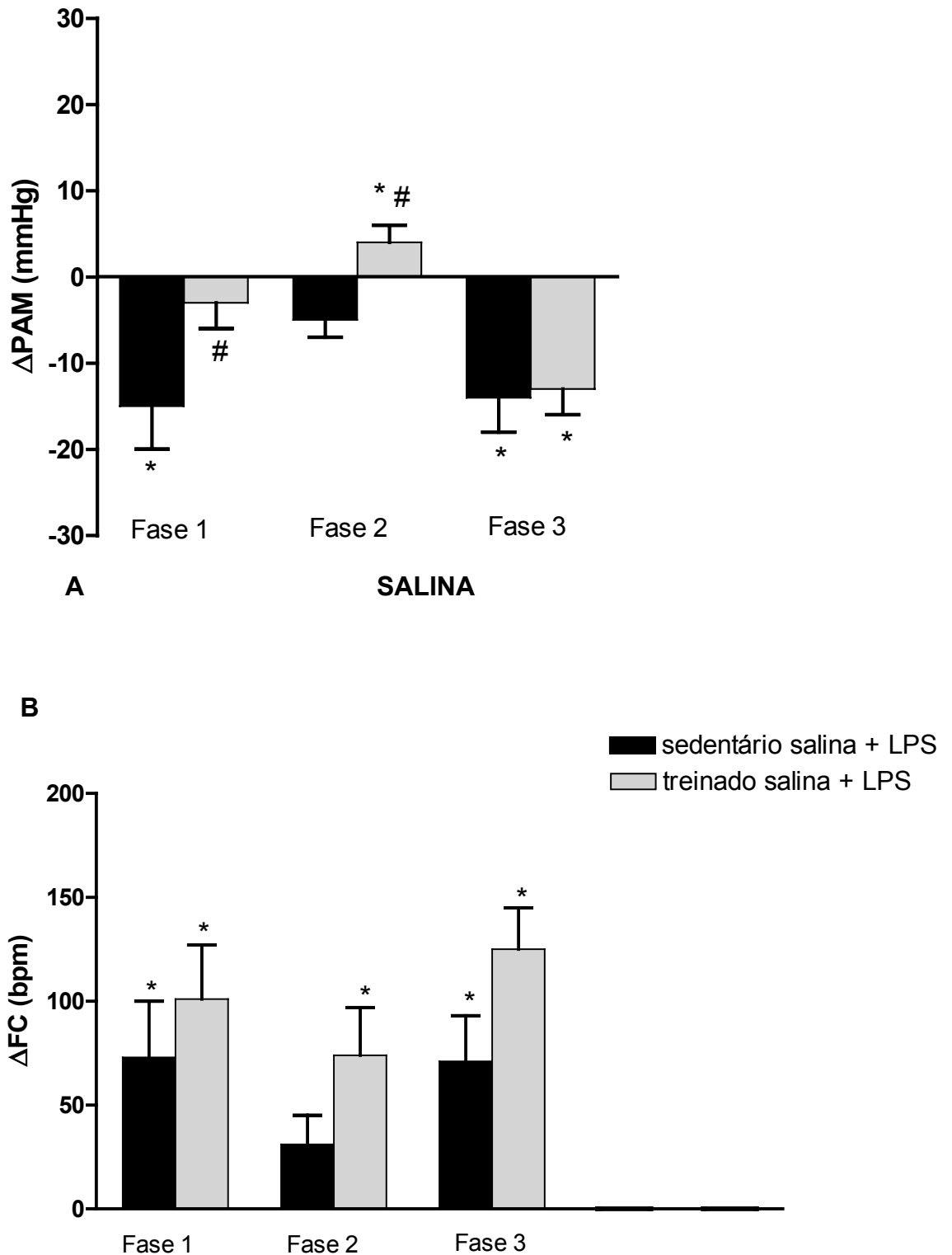


FIGURA 6 – Variação máxima da pressão arterial média (Δ PAM) (A), e da frequência cardíaca (Δ FC) (B), após a administração de LPS no grupo sedentário (n=9) e no grupo treinado (n=11). Fase 1 = 5 minutos, Fase 2 = 25 minutos, Fase 3 = 50 minutos. * Diferença em relação aos valores basais ($p < 0,05$). # Grupo treinado vs. grupo sedentário ($p < 0,05$).

4.3.2 Efeitos do pré-tratamento com aminoguanidina

As alterações cardiovasculares na PAM e FC observadas após a administração de LPS, no grupo sedentário salina e no grupo sedentário aminoguanidina são mostradas nas Figuras 7 A e B.

Na fase 1 a administração de aminoguanidina no grupo sedentário inibiu a queda da PAM e o aumento da FC observada no grupo sedentário salina (Figs. 7 A e B). Em relação aos valores máximos da PAM (Δ PAM), o grupo sedentário aminoguanidina apresentou o valor de Δ PAM= $+0,22 \pm 2$ mmHg, enquanto o grupo sedentário salina Δ PAM= -15 ± 5 mmHg, com $p < 0,05$. Já o Δ FC do grupo sedentário aminoguanidina foi de Δ FC= $+5 \pm 9$ bpm vs. Δ FC= $+73 \pm 26$ bpm no grupo sedentário salina, com $p < 0,05$ (Figs. 10 A e B).

Na fase 2 houve uma pequena queda da PAM de ambos os grupos sedentário salina e sedentário aminoguanidina, mas sem diferença significativa, já em relação à FC o grupo sedentário aminoguanidina apresentou um aumento significativo da FC, com $p < 0,05$. No Δ PAM não houve diferenças significativas entre os grupos, mas o grupo aminoguanidina apresentou um aumento do Δ FC em relação ao grupo sedentário salina (amino: Δ FC= $+108 \pm 27$ bpm vs. salina Δ FC= $+31 \pm 14$ bpm; $p < 0,05$).

Na fase 3 ocorreu uma pequena queda da PAM no grupo sedentário aminoguanidina (100 ± 1 mmHg vs. 99 ± 4 mmHg; $p > 0,05$), em relação ao grupo sedentário salina (104 ± 3 mmHg vs. 89 ± 5 mmHg; $p < 0,05$), acompanhada de aumento da FC em ambos os grupos. No Δ PAM foi evidenciada uma menor queda no grupo sedentário aminoguanidina, quando comparado ao grupo sedentário salina (amino: Δ PAM= $-0,22 \pm 3$ mmHg vs. salina: Δ PAM= -15 ± 4 mmHg; $p < 0,05$).

As alterações cardiovasculares na PAM e FC observadas após a administração de LPS, no grupo treinado salina e no grupo treinado aminoguanidina são mostradas nas Figuras 8 A e B.

Na fase 1, não houve diferenças significativas nos valores de PAM nos grupos treinado salina e treinado aminoguanidina, já em relação a FC o grupo treinado aminoguanidina apresentou menores valores no Δ FC (Δ FC = $+25 \pm 21$ bpm), quando comparado ao grupo treinado salina (Δ FC = $+101 \pm 26$ bpm), com $p < 0,05$. Na fase 2, o grupo treinado aminoguanidina apresentou queda significativa na PAM

(111 ± 3 mmHg vs. 99 ± 6 mmHg, $p<0,05$), em relação ao grupo treinado salina (112 ± 2 mmHg vs. 116 ± 1 mmHg, $p<0,05$) acompanhada de aumento da FC em ambos os grupos. O Δ PAM, evidenciou a diferença dos valores de PAM entre o grupo treinado salina Δ PAM= $+4\pm 2$ mmHg e o grupo treinado aminoguanidina Δ PAM= -12 ± 5 mmHg, com $p<0,05$. Na fase 3, ocorreu queda significativa nos valores de PAM entre os grupos treinado salina (112 ± 2 mmHg vs. 100 ± 4 mmHg), e grupo treinado aminoguanidina (111 ± 3 mmHg vs. 94 ± 6 mmHg), que foi acompanhado de aumento na FC em ambos os grupos. O grupo treinado salina apresentou o valor do Δ FC= $+126\pm 20$ bpm, enquanto o grupo treinado aminoguanidina obteve o valor de Δ FC = $+60\pm 21$ bpm, evidenciando um menor aumento da FC no grupo treinado aminoguanidina, com $p<0,05$.

As alterações cardiovasculares da PAM e FC nos grupos sedentário aminoguanidina e treinado aminoguanidina após a administração de LPS podem ser observadas nas Figuras 9 A e B.

Na fase 1 não houve diferenças significativas nos valores de PAM e FC nos grupos sedentário e treinado aminoguanidina. Na fase 2, houve uma queda significativa nos valores de PAM no grupo treinado aminoguanidina (111 ± 3 mmHg vs. 99 ± 6 mmHg; $p<0,05$), em relação ao grupo sedentário aminoguanidina (100 ± 2 mmHg vs. 95 ± 4 mmHg; $p>0,05$), enquanto ocorreu um aumento significativo da FC em ambos os grupos. Os valores de Δ FC evidenciaram um maior aumento da FC no grupo sedentário aminoguanidina (Δ FC = $+108\pm 27$ bpm), em relação ao grupo treinado aminoguanidina (Δ FC = $+38\pm 7$ bpm) (Fig.10 B; $p<0,05$). Na fase 3, ocorreu queda significativa da PAM no grupo treinado aminoguanidina (111 ± 3 mmHg vs. 94 ± 6 mmHg; $p<0,05$), em relação ao grupo sedentário aminoguanidina (100 ± 2 mmHg vs. 99 ± 4 mmHg; $p>0,05$), que foi acompanhada de aumento na FC em ambos os grupos. O grupo treinado aminoguanidina apresentou Δ PAM = -17 ± 4 mmHg, enquanto o grupo sedentário aminoguanidina Δ PAM = $-0,22\pm 3$ mmHg, evidenciando uma maior queda na PAM no grupo treinado ($p<0,05$; Fig. 10 A e 20 A).

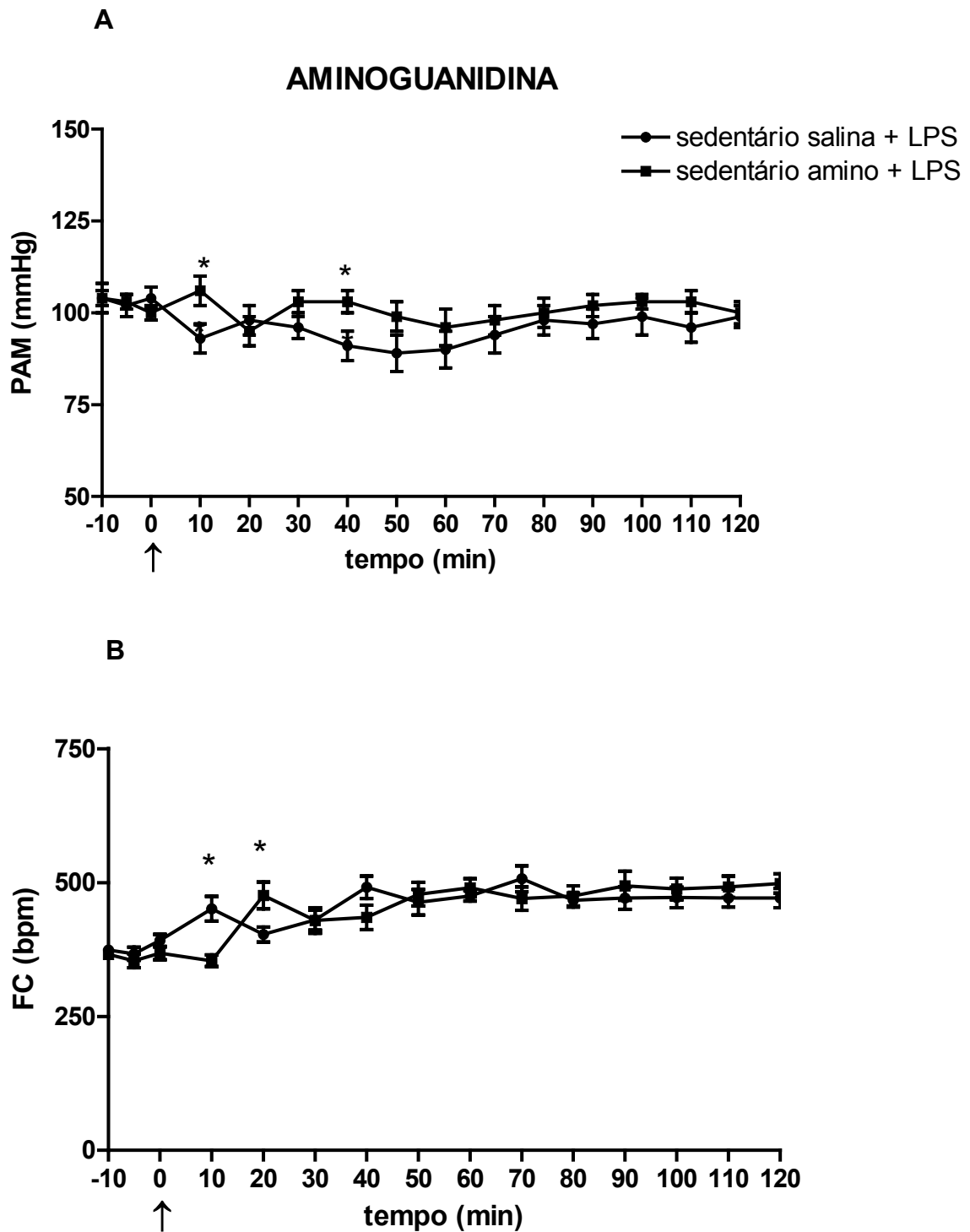


FIGURA 7 – Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B), após a administração de LPS no grupo sedentário salina (n=9) e sedentário aminoguanidina (n=9). A seta indica o momento da administração de LPS. * Diferença entre o grupo sedentário salina e o grupo sedentário aminoguanidina ($p < 0,05$).

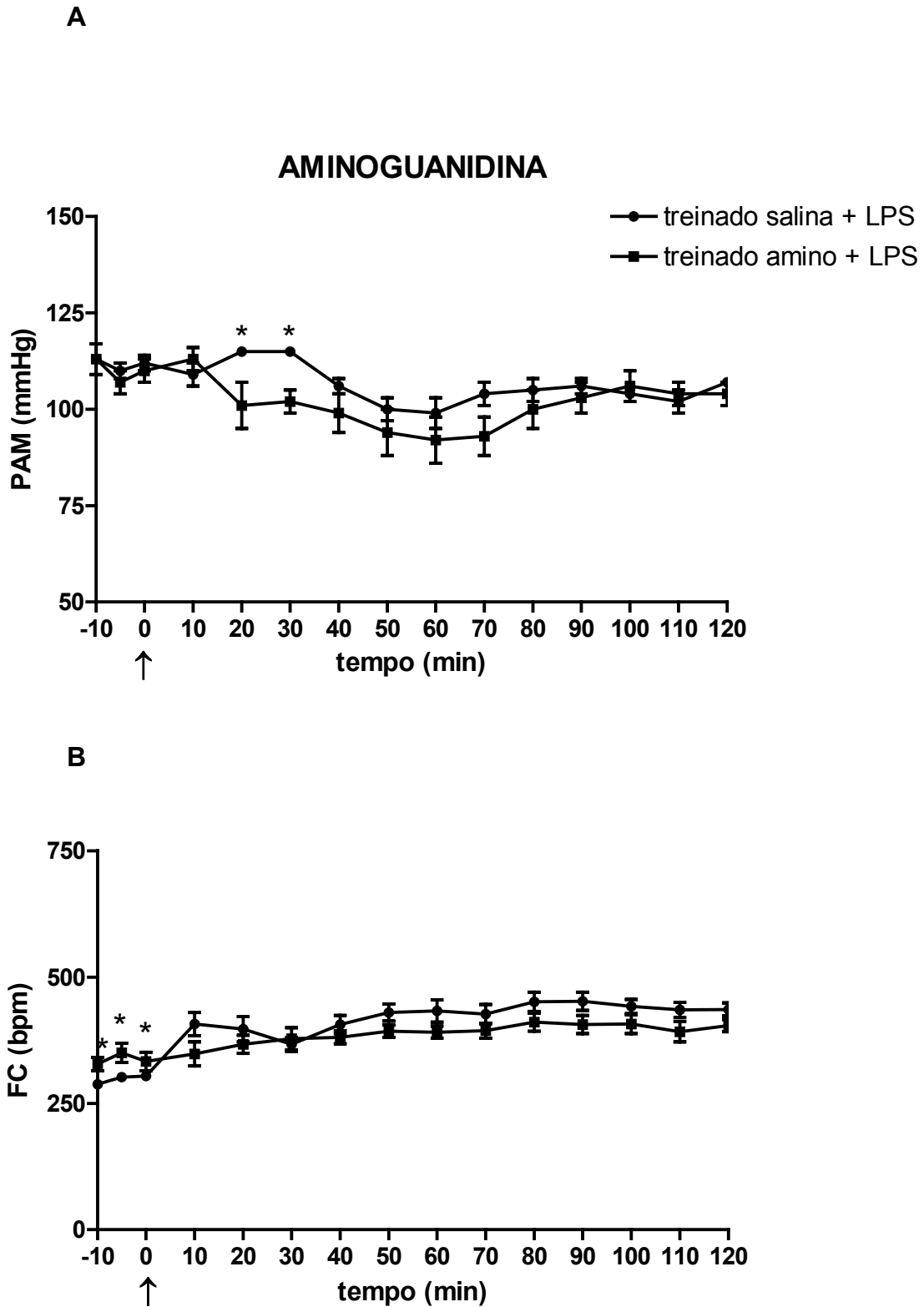
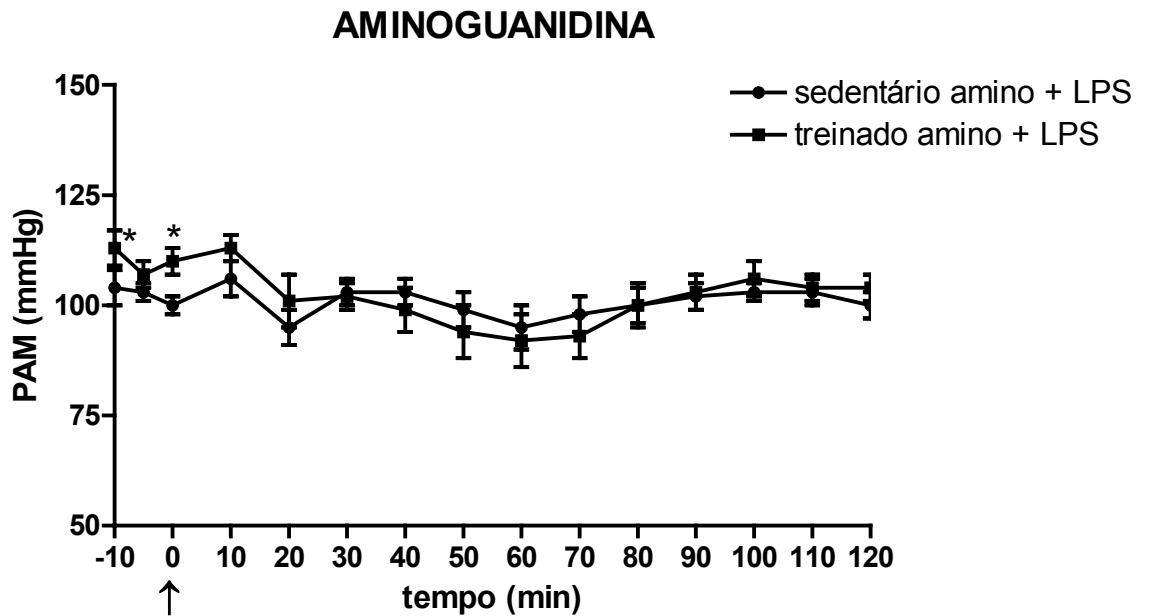


FIGURA 8 – Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B), após a administração de LPS no grupo treinado salina (n=11) e grupo treinado aminoguanidina (n=8). A seta indica o momento da administração de LPS. * Diferença entre o grupo treinado salina e grupo treinado aminoguanidina ($p < 0,05$).

A



B

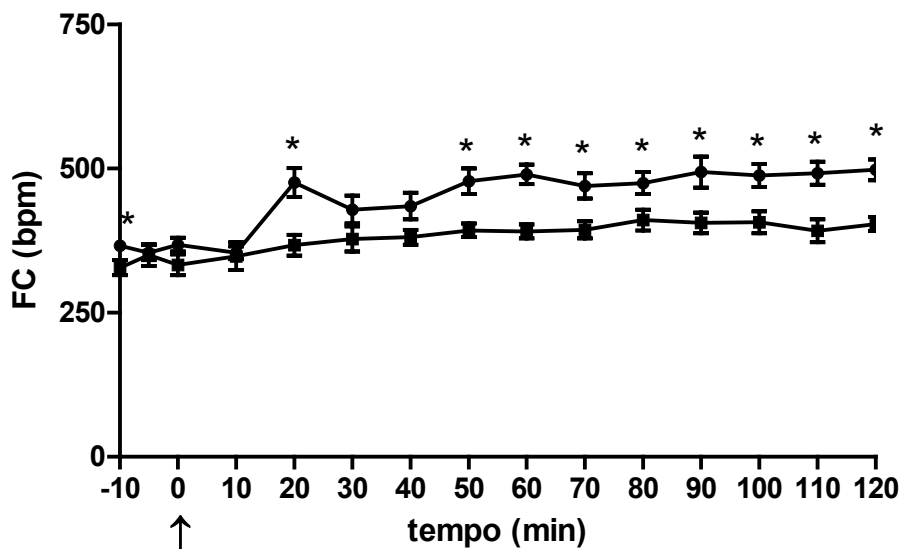


FIGURA 9 – Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B), após a administração de LPS no grupo sedentário aminoguanidina (n=9) e grupo treinado aminoguanidina (n=8). A seta indica o momento da administração de LPS. * Diferença entre o grupo sedentário aminoguanidina e grupo treinado aminoguanidina ($p < 0,05$).

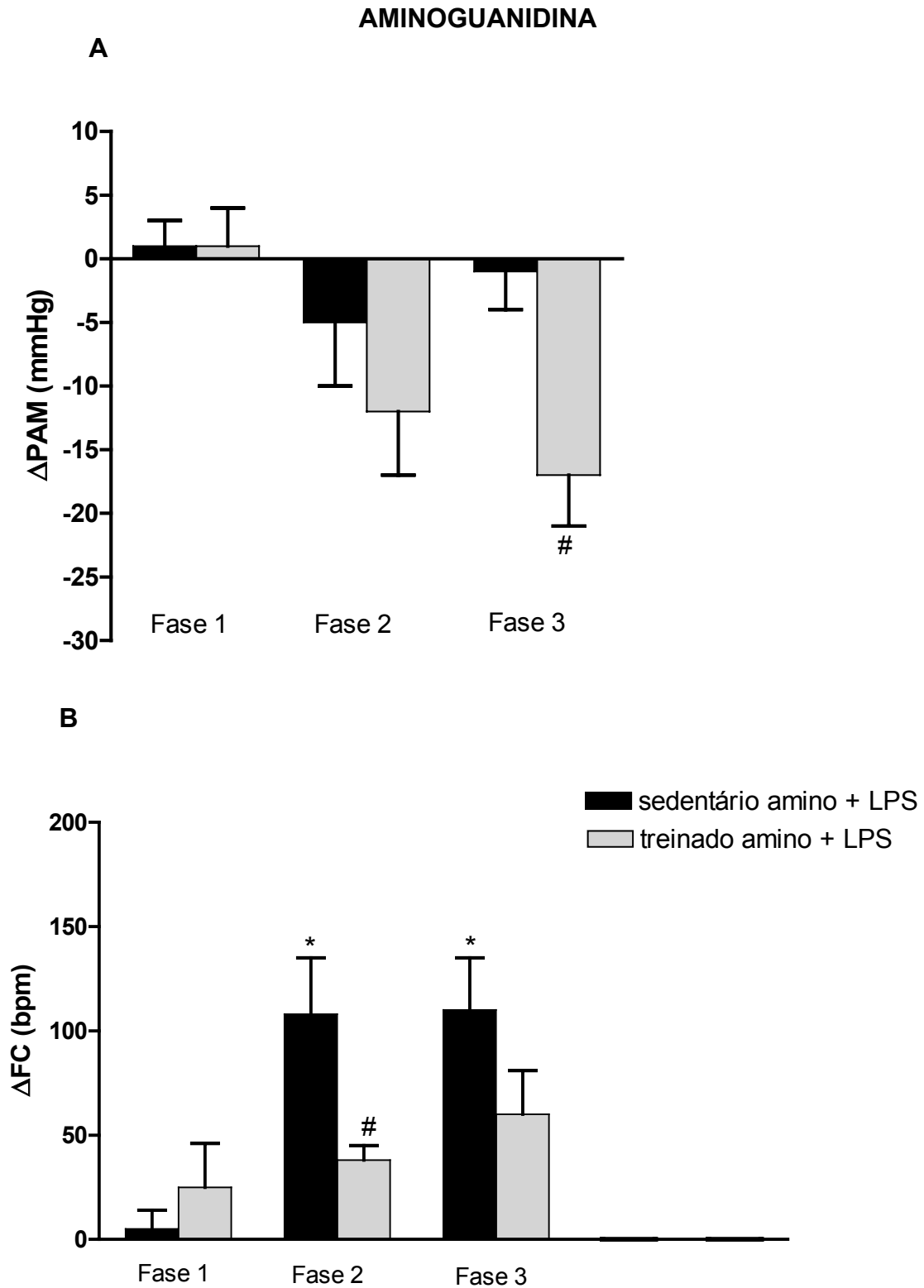


FIGURA 10 – Variação máxima da pressão arterial média (Δ PAM) (A), e da frequência cardíaca (Δ FC) (B), após a administração de LPS no grupo sedentário aminoguanidina (n=9) e no grupo treinado aminoguanidina (n=8). Fase 1 = 5 minutos, Fase 2 = 25 minutos, Fase 3 = 50 minutos. * Diferença em relação aos valores basais ($p < 0,05$). # Grupo treinado vs. grupo sedentário ($p < 0,05$).

4.3.3 Efeitos do pré-tratamento com L-NAME

As alterações cardiovasculares na PAM e FC nos grupos sedentário salina e sedentário L-NAME, após a administração de LPS podem ser vistas nas Figuras 11 A e B. A administração de L-NAME promoveu aumento significativo da PAM logo após a sua administração (antes: 110 ± 3 mmHg vs. depois: 158 ± 5 mmHg; $t = -10-0$ minutos; $p < 0,05$), que foi acompanhado de diminuição da FC (antes: 386 ± 4 bpm vs. depois: 287 ± 13 bpm; $t = -10-0$ minutos; $p < 0,05$). O efeito tônico do L-NAME sobre a PAM pode ser evidenciado durante todo o período de registro (Fig.11 A). No entanto, após a administração de LPS foi observada uma maior queda dos valores pressóricos do grupo sedentário L-NAME, quando comparado ao grupo sedentário salina, que foi acompanhado de diminuição dos valores da FC (Figs.11 A e B).

Na fase 1, houve queda significativa da PAM no grupo sedentário L-NAME (158 ± 5 mmHg vs 136 ± 8 mmHg, $p < 0,05$), quando comparado ao grupo sedentário salina (104 ± 3 mmHg vs. 89 ± 6 mmHg; $p < 0,05$), acompanhada de aumento significativo da FC somente no grupo sedentário salina (392 ± 11 bpm vs. 465 ± 30 bpm; $p < 0,05$). Em relação ao Δ PAM não houve diferença significativa entre os grupos, mas o valor do Δ FC foi significativamente maior no grupo sedentário salina (Δ FC = $+73 \pm 27$ bpm), quando comparado ao grupo sedentário L-NAME (Δ FC = $+8 \pm 11$ bpm).

Na fase 2, o grupo sedentário L-NAME apresentou queda significativa dos valores de PAM (158 ± 5 mmHg vs. 120 ± 9 mmHg), quando comparado ao grupo sedentário salina, sem alterações significativas na FC em ambos os grupos. O Δ PAM também evidenciou queda significativa nos valores de PAM no grupo sedentário L-NAME (Δ PAM = -38 ± 11 mmHg), em relação ao grupo sedentário salina (Δ PAM = -5 ± 2 mmHg), mas sem diferença significativa nos valores do Δ FC em ambos os grupos.

Na fase 3, o grupo sedentário L-NAME continuou a apresentar queda significativa nos níveis da PAM (158 ± 5 mmHg vs. 108 ± 14 mmHg), em relação ao grupo sedentário salina (104 ± 3 mmHg vs. 89 ± 5 mmHg), acompanhada de taquicardia em ambos os grupos. Os valores do Δ PAM também mostraram a queda na PAM no grupo sedentário L-NAME (Δ PAM = -50 ± 16 mmHg), em relação ao grupo sedentário salina (Δ PAM = -14 ± 4 mmHg), não havendo alterações significativas nos

valores do ΔFC .

As alterações cardiovasculares na PAM e FC observadas após a administração de LPS, no grupo treinado salina e treinado L-NAME podem ser vistas nas Figuras 12 A e B.

A administração de L-NAME no grupo treinado promoveu aumento na PAM (antes: 108 ± 2 mmHg vs. depois: 127 ± 4 mmHg; $t = -10-0$ minutos; $p < 0,05$), quando comparado ao grupo treinado salina (antes: 115 ± 0 mmHg vs. depois: 109 ± 3 mmHg; $t = -10-0$ minutos; $p < 0,05$), acompanhada de redução significativa na FC no grupo treinado L-NAME, em relação ao grupo treinado salina, sendo que estas alterações se mantiveram após a administração de LPS, durante todo o período de registro.

Na fase 1, não houve diferenças significativas nos valores de PAM entre o grupo treinado salina e treinado L-NAME, já em relação a FC, o grupo treinado salina apresentou maiores valores (304 ± 8 bpm vs. 406 ± 25 bpm; $p < 0,05$), em relação ao grupo treinado L-NAME. O ΔFC também mostrou maiores valores de FC no grupo treinado salina ($\Delta FC = +101 \pm 26$ bpm), em relação ao grupo treinado L-NAME ($\Delta FC = +0,38 \pm 17$ bpm), com $p < 0,05$.

Na fase 2, não houve alterações significativas na PAM, já o grupo treinado salina apresentou maiores valores de FC (304 ± 8 bpm vs. 378 ± 19 bpm; $p < 0,05$), em relação ao grupo treinado L-NAME, este aumento na FC também foi evidenciado no ΔFC , onde o grupo treinado salina apresentou $\Delta FC = +74 \pm 23$ bpm, enquanto o grupo treinado L-NAME, $\Delta FC = +3 \pm 21$ bpm, com $p < 0,05$.

Na fase 3, houve queda na PAM no grupo treinado salina (112 ± 2 mmHg vs 100 ± 4 mmHg; $p < 0,05$), enquanto houve um aumento na PAM no grupo treinado L-NAME (112 ± 2 mmHg vs. 129 ± 7 mmHg; $p < 0,05$), sendo que somente o grupo treinado salina apresentou um aumento significativo da FC. Em relação ao ΔPAM encontramos os seguintes valores: treinado salina $\Delta PAM = -12 \pm 3$ mmHg vs. treinado L-NAME $\Delta PAM = +6 \pm 7$ mmHg, com $p < 0,05$. O grupo treinado salina apresentou $\Delta FC = +126 \pm 20$ bpm, enquanto o grupo treinado L-NAME $\Delta FC = +36 \pm 24$ bpm, com $p < 0,05$.

As alterações cardiovasculares da PAM e da FC ao longo do tempo, no grupo sedentário L-NAME e no grupo treinado L-NAME podem ser observadas nas Figuras 13 A e B. A administração de L-NAME no grupo sedentário promoveu um aumento inicial na PAM (antes: 110 ± 3 mmHg vs. 158 ± 5 mmHg; $t = -10-0$

minutos; $p < 0,05$), seguido de queda da FC (antes: 387 ± 4 bpm vs. 294 ± 15 bpm; $t = -10-0$ minutos, $p < 0,05$). O grupo treinado L-NAME apresentou um menor aumento na PAM (antes: 108 ± 2 mmHg vs. 123 ± 5 mmHg; $t = -10-0$ minutos; $p < 0,05$), também seguido de queda da FC. A análise ao longo do tempo após a administração de LPS mostrou queda inicial da PAM no grupo sedentário L-NAME, em relação ao grupo treinado, sem alterações significativas da FC em ambos os grupos (Figs. 13 A e B).

Na fase 1, o grupo sedentário L-NAME apresentou uma queda significativa da PAM (158 ± 5 mmHg vs. 136 ± 8 mmHg; $p < 0,05$), enquanto o grupo treinado L-NAME apresentou uma atenuação importante da resposta hipotensora (123 ± 5 mmHg vs. 122 ± 6 mmHg), sem alterações significativas na FC. A atenuação da resposta hipotensora no grupo treinado L-NAME pode ser evidenciada também no Δ PAM (treinado: Δ PAM = $-0,63 \pm 4$ mmHg vs. sedentário: Δ PAM = -22 ± 8 mmHg), Fig. 14 A.

Na fase 2, houve queda na PAM no grupo sedentário L-NAME (158 ± 5 mmHg vs. 120 ± 9 mmHg; $p < 0,05$), sem alterações significativas na PAM no grupo treinado L-NAME e na FC de ambos os grupos (Figs. 13 A e B). Já em relação aos valores de Δ PAM, o grupo sedentário obteve Δ PAM = -38 ± 11 mmHg, enquanto o grupo treinado elevação do valores de PAM, com Δ PAM = $+4 \pm 6$ mmHg, Fig. 14 A.

Na fase 3, as maiores alterações foram observadas nos valores do Δ PAM. O grupo sedentário L-NAME apresentou uma queda bastante importante na PAM, com Δ PAM = -50 ± 16 mmHg, enquanto o grupo treinado L-NAME manteve os níveis pressóricos com Δ PAM = $+6 \pm 7$ mmHg, sem alterações significativas no Δ FC (Fig. 14 A e B; Figs. 20 A e B).

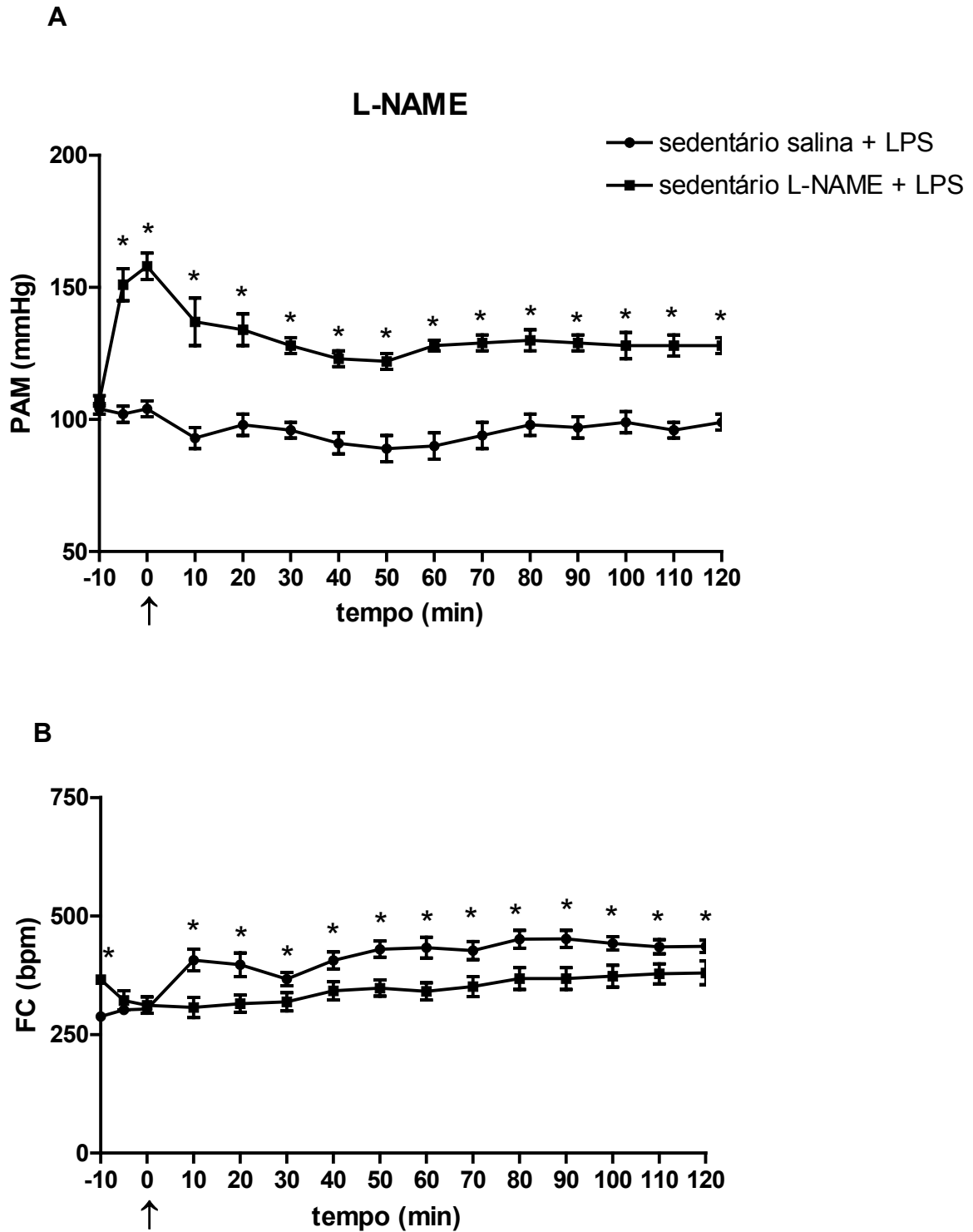


FIGURA 11 – Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B), após a administração de LPS no grupo sedentário salina (n=9) e grupo sedentário L-NAME (n=9). A seta indica o momento da administração de LPS. * Diferença entre o grupo sedentário salina e grupo sedentário L-NAME ($p < 0,05$).

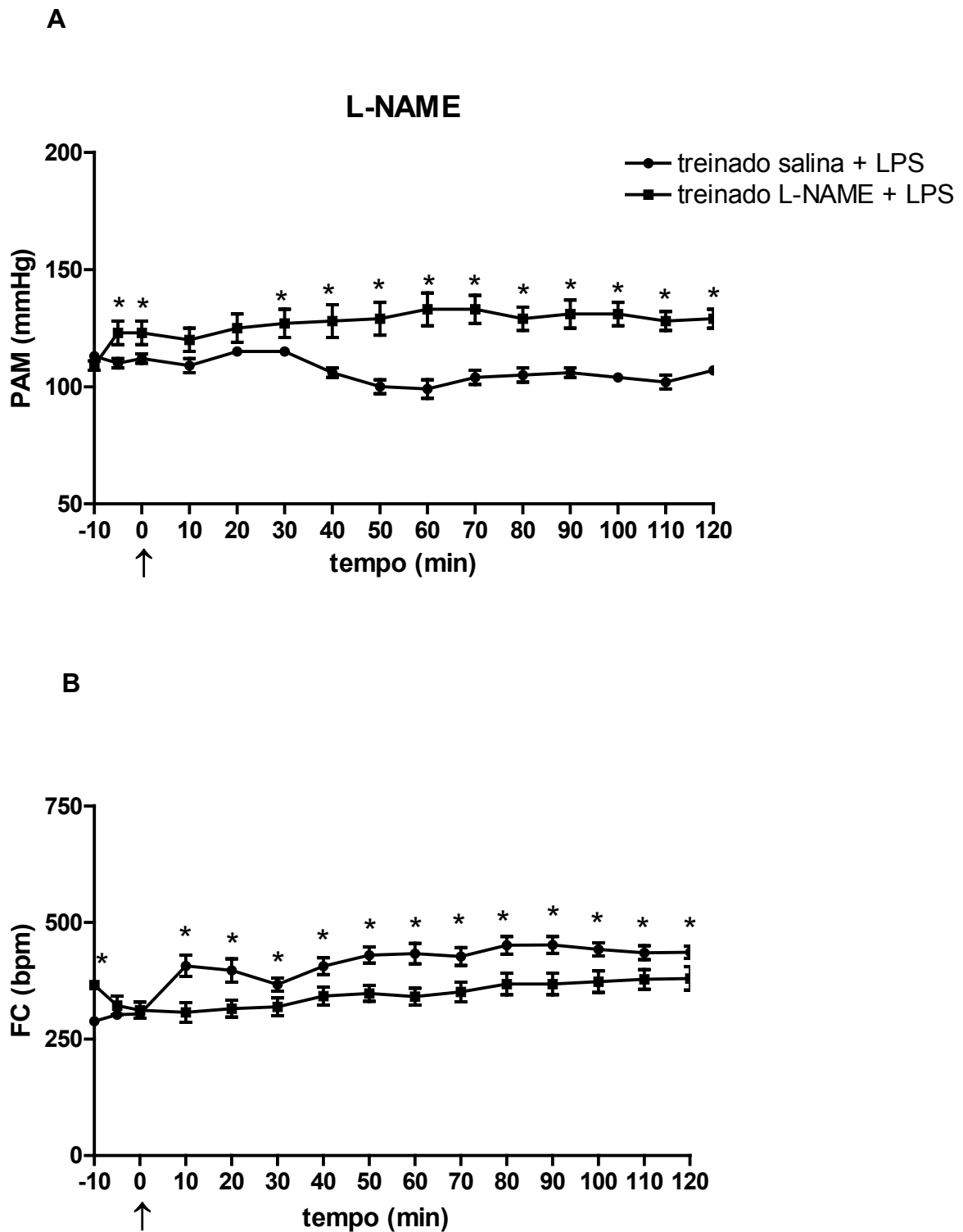


FIGURA 12 – Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B), após a administração de LPS no grupo treinado salina (n=11) e grupo treinado L-NAME (n=8). A seta indica o momento da administração de LPS. * Diferença entre o grupo treinado salina e grupo treinado L-NAME ($p < 0,05$).

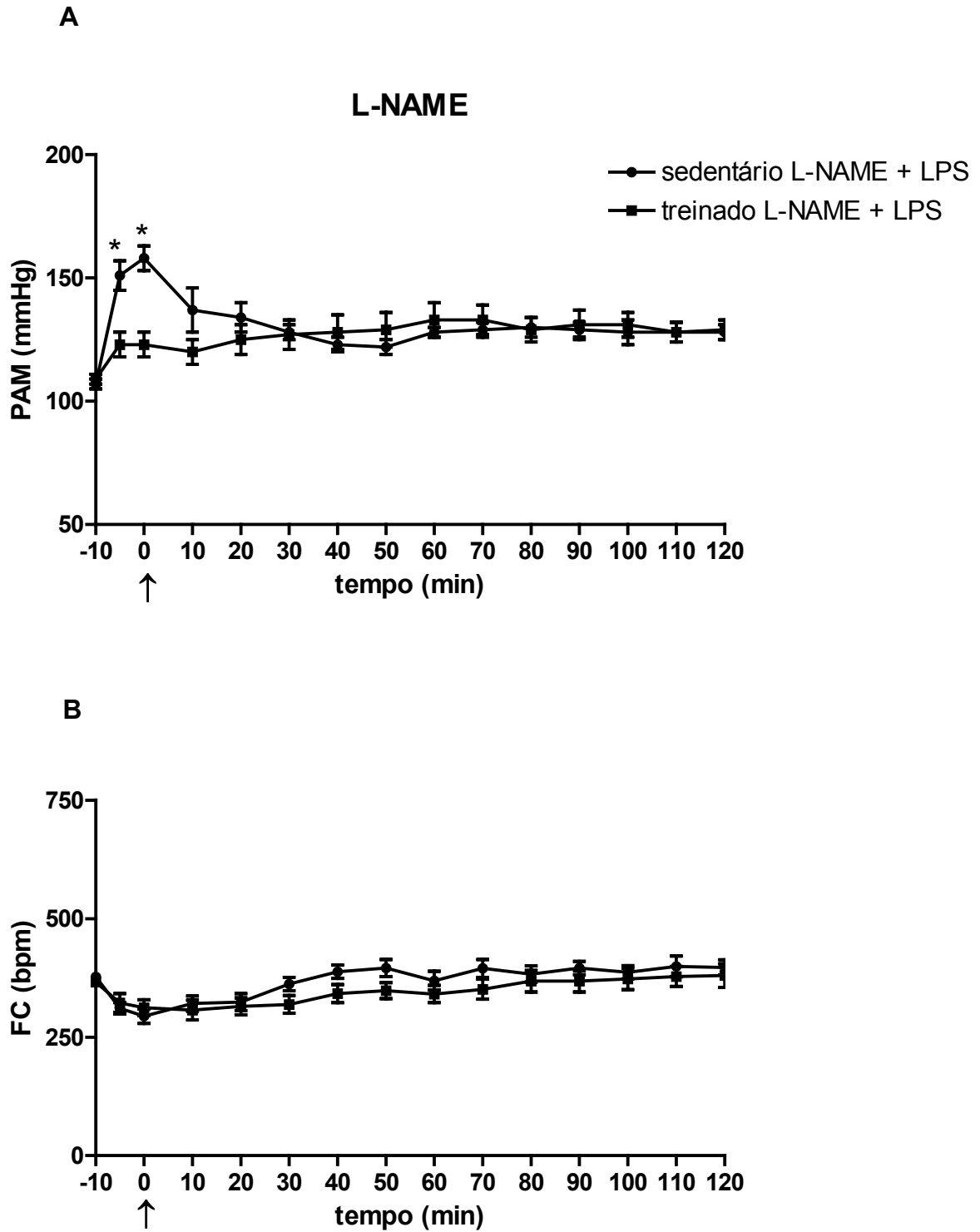


FIGURA 13 – Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B), após a administração de LPS no grupo sedentário L-NAME (n=9) e grupo treinado L-NAME (n=8). A seta indica o momento da administração de LPS. * Diferença entre o grupo sedentário L-NAME e grupo treinado L-NAME ($p < 0,05$).

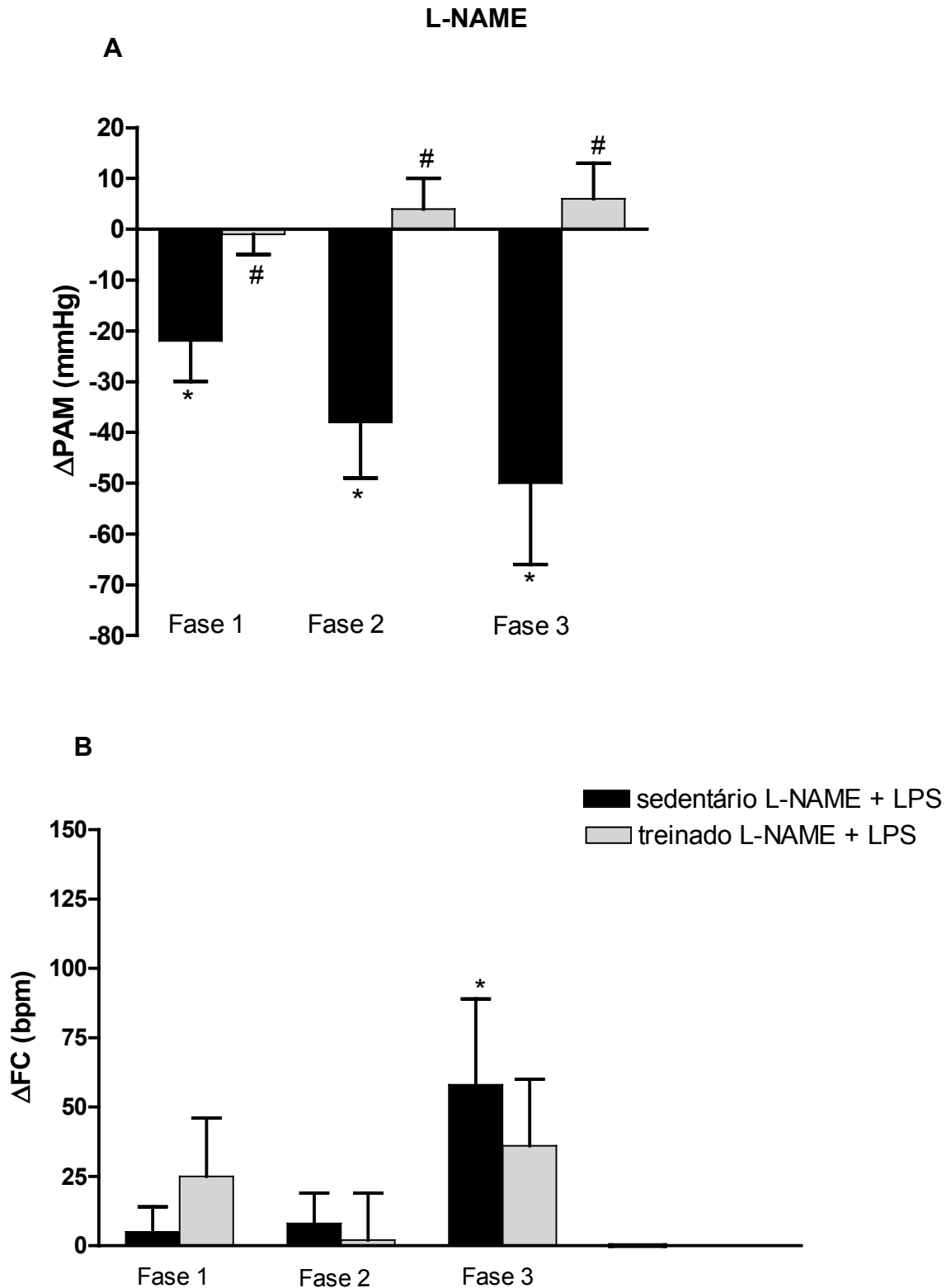


FIGURA 14 – Variação máxima da pressão arterial média (Δ PAM) (A), e da frequência cardíaca (Δ FC) (B), após a administração de LPS no grupo sedentário L-NAME (n=9) e no grupo treinado L-NAME (n=8). Fase 1 = 5 minutos, Fase 2 = 25 minutos, Fase 3 = 50 minutos. * Diferença em relação aos valores basais ($p < 0,05$). # Grupo treinado vs. grupo sedentário ($p < 0,05$).

4.3.4 Efeitos do pré-tratamento com DMSO e 7-NI

O DMSO foi utilizado como veículo de dissolução do 7-NI (inibidor da nNOS). Por esta razão, foram realizados experimentos no sentido de avaliar as possíveis alterações cardiovasculares sobre a PAM e a FC, decorrentes do uso do DMSO em animais sedentários e treinados submetidos à endotoxemia.

Na figura 15 A e B podem ser vistas as alterações cardiovasculares em função do tempo sobre a PAM e a FC dos grupos sedentário e treinado DMSO submetidos à administração de LPS. Na indução da endotoxemia nos grupos sedentário e treinado tratados com DMSO foram observadas três fases distintas durante as 2 horas de registro: uma diminuição inicial da PAM (fase1), seguida de aumento na PAM (fase 2), e uma segunda queda na PAM (fase 3). Não houve diferença estatística entre os valores de PAM do grupo sedentário DMSO, em relação ao grupo treinado DMSO (Fig. 15 A). No entanto, o grupo sedentário DMSO apresentou maiores valores de FC quando comparado ao grupo treinado DMSO (Fig. 15 B).

As Figuras 16 A e B mostram as alterações cardiovasculares sobre a PAM e FC nos grupos sedentário DMSO e sedentário 7-NI, tratados com LPS. O grupo sedentário 7-NI apresentou aumento significativo da PAM, em relação ao grupo sedentário DMSO a partir dos 90 minutos de registro ($p < 0,05$), sem alterações significativas na FC em ambos os grupos.

As figuras 17 A e B mostram as alterações cardiovasculares sobre a PAM e FC nos grupos treinado DMSO e treinado 7-NI submetidos à endotoxemia, sendo que os grupos não apresentaram alterações significativas tanto na PAM quanto na FC.

As figuras 18 A e B mostram as alterações em função do tempo dos grupos sedentário 7-NI e treinado 7-NI submetidos à endotoxemia, não havendo diferenças significativas na PAM e FC entre os grupos.

Os efeitos máximos da administração de 7-NI sobre os parâmetros cardiovasculares (Δ PAM e Δ FC), nos grupos sedentário e treinado 7-NI podem ser vistos nas Figuras 19 A e B. Não houve diferenças estatísticas entre os valores de Δ PAM e Δ FC entre ambos os grupos.

Em relação aos valores basais, na fase 1 o grupo sedentário 7-NI apresentou queda na PAM (121 ± 4 mmHg vs. 115 ± 3 mmHg; $t = 0-5$ minutos; $p < 0,05$), acompanhada de taquicardia (309 ± 12 bpm vs. 348 ± 11 bpm; $t = 0-5$ minutos; $p < 0,05$), enquanto não houve alterações significativas no grupo treinado 7-NI. Na fase 2, não houveram alterações significativas na PAM dos grupos em relação ao valor basal, havendo aumento significativo da FC em ambos os grupos. Na fase 3, houve queda significativa da PAM seguida de aumento da FC em ambos os grupos. As alterações da PAM e FC em relação aos valores basais podem ser vistas nas Figs. 19 A e B.

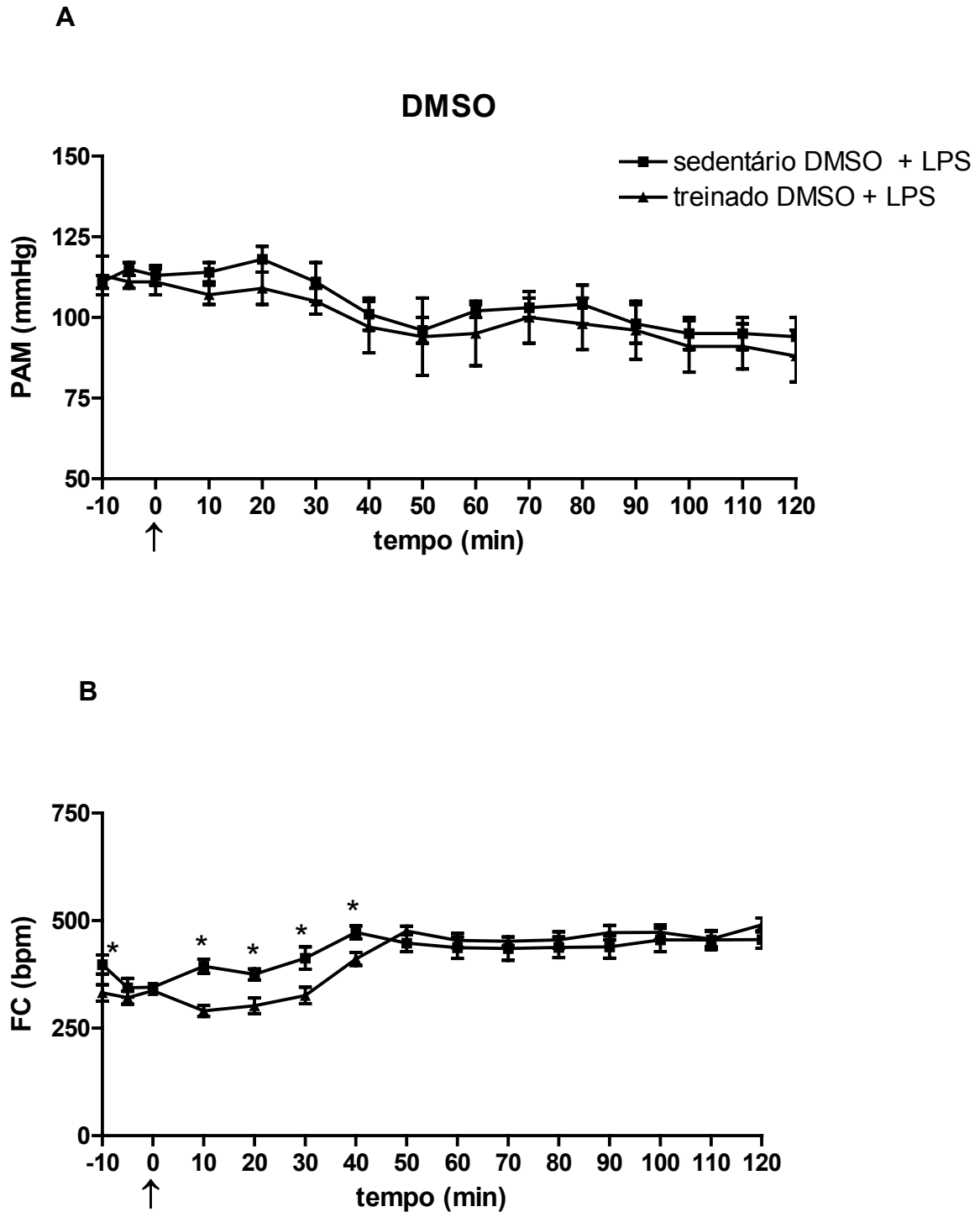
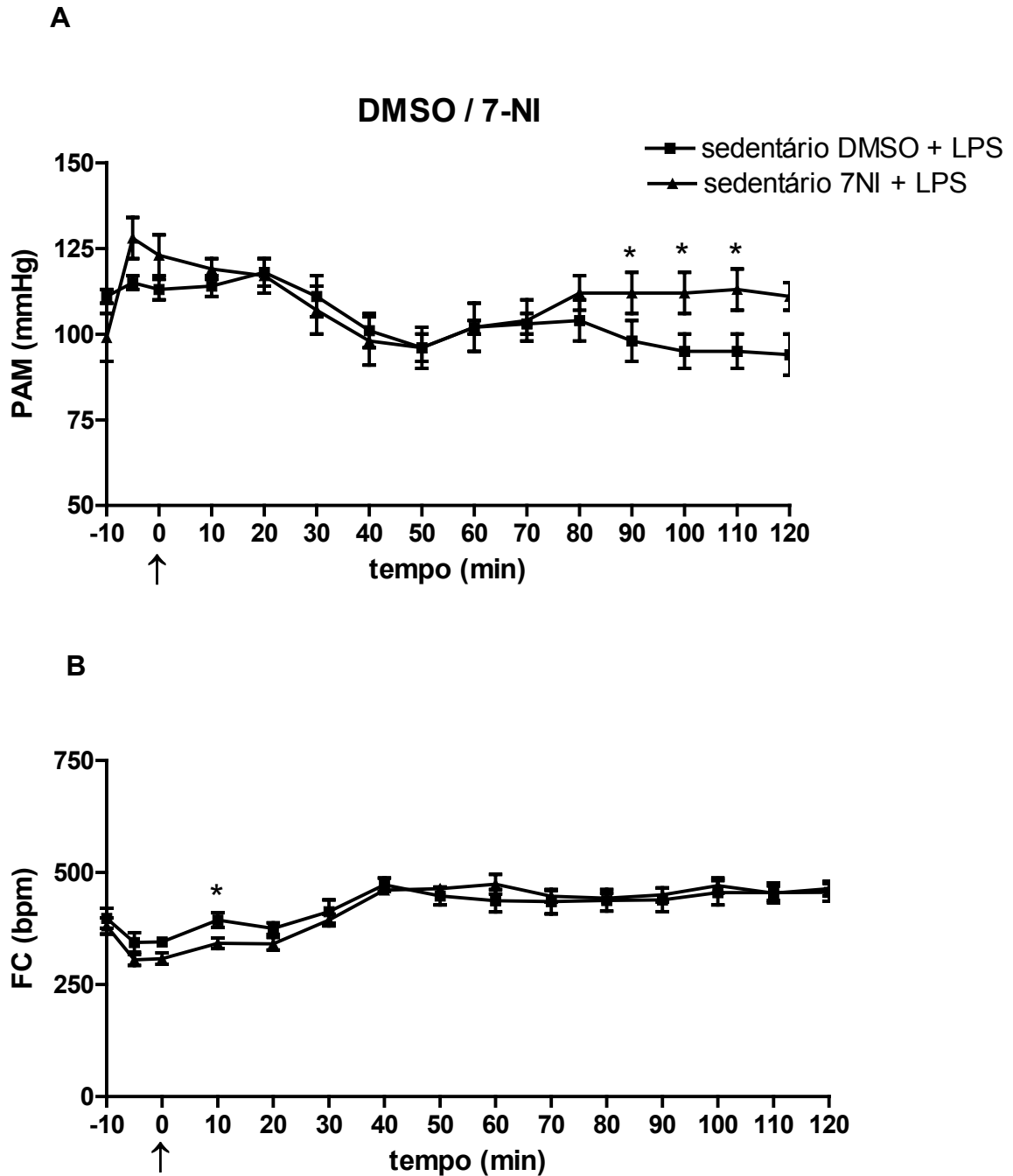
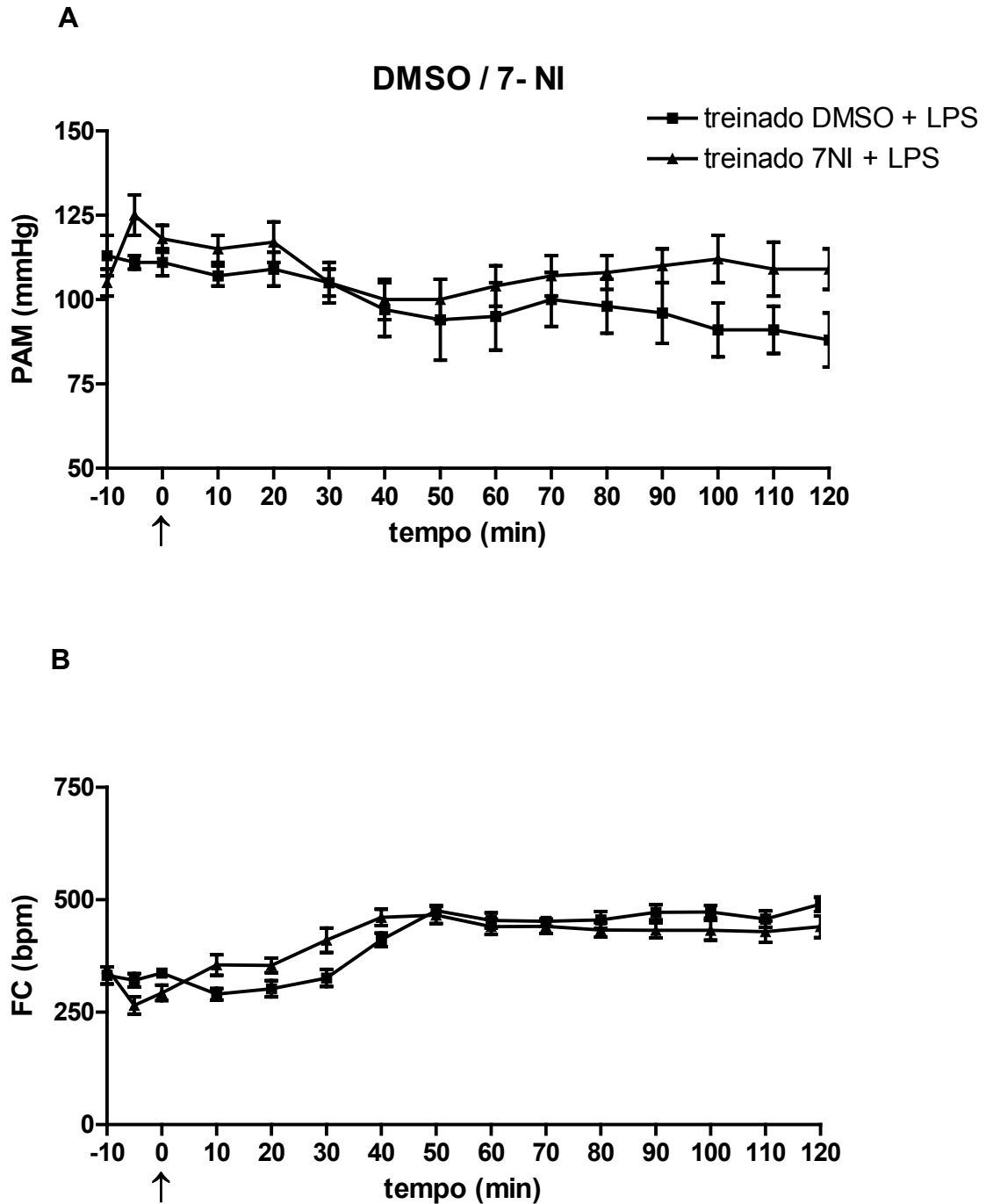


FIGURA 15 – Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B), após a administração de LPS no grupo sedentário DMSO (n=6) e grupo treinado DMSO (n=3). A seta indica o momento da administração de LPS. * Diferença entre o grupo sedentário DMSO e grupo treinado DMSO ($p < 0,05$).





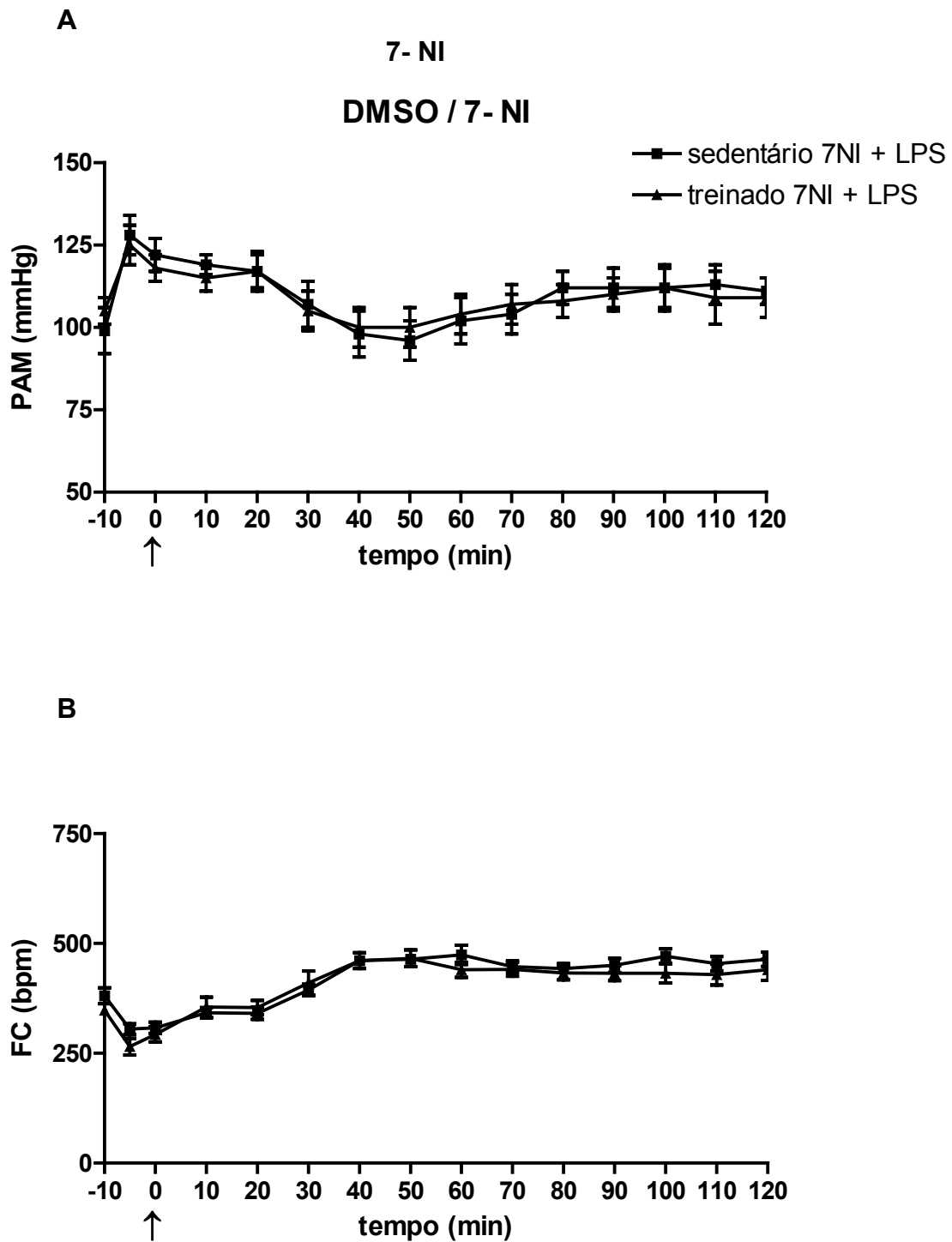


FIGURA 18 – Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B), após a administração de LPS no grupo sedentário 7-NI (n=8) e grupo treinado 7-NI (n=7). A seta indica o momento da administração de LPS. * Diferença entre o grupo sedentário 7-NI e grupo treinado 7-NI ($p < 0,05$).

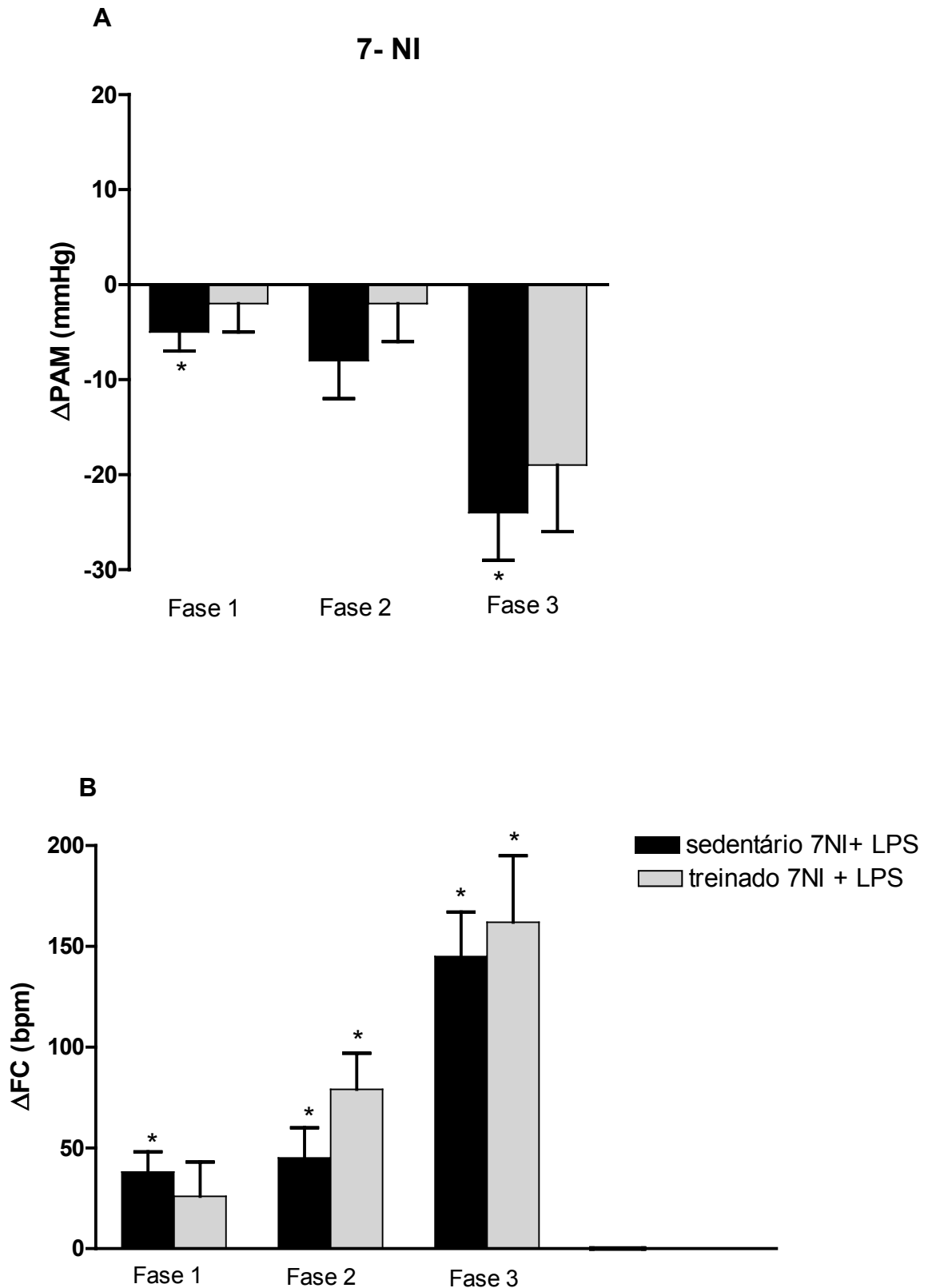


FIGURA 19 – Variação máxima da pressão arterial média (Δ PAM) (A), e da frequência cardíaca (Δ FC) (B), após a administração de LPS no grupo sedentário 7-NI ($n=8$) e no grupo treinado 7-NI ($n=7$). Fase 1 = 5 minutos, Fase 2 = 25 minutos, Fase 3 = 50 minutos. * Diferença em relação aos valores basais ($p < 0,05$).

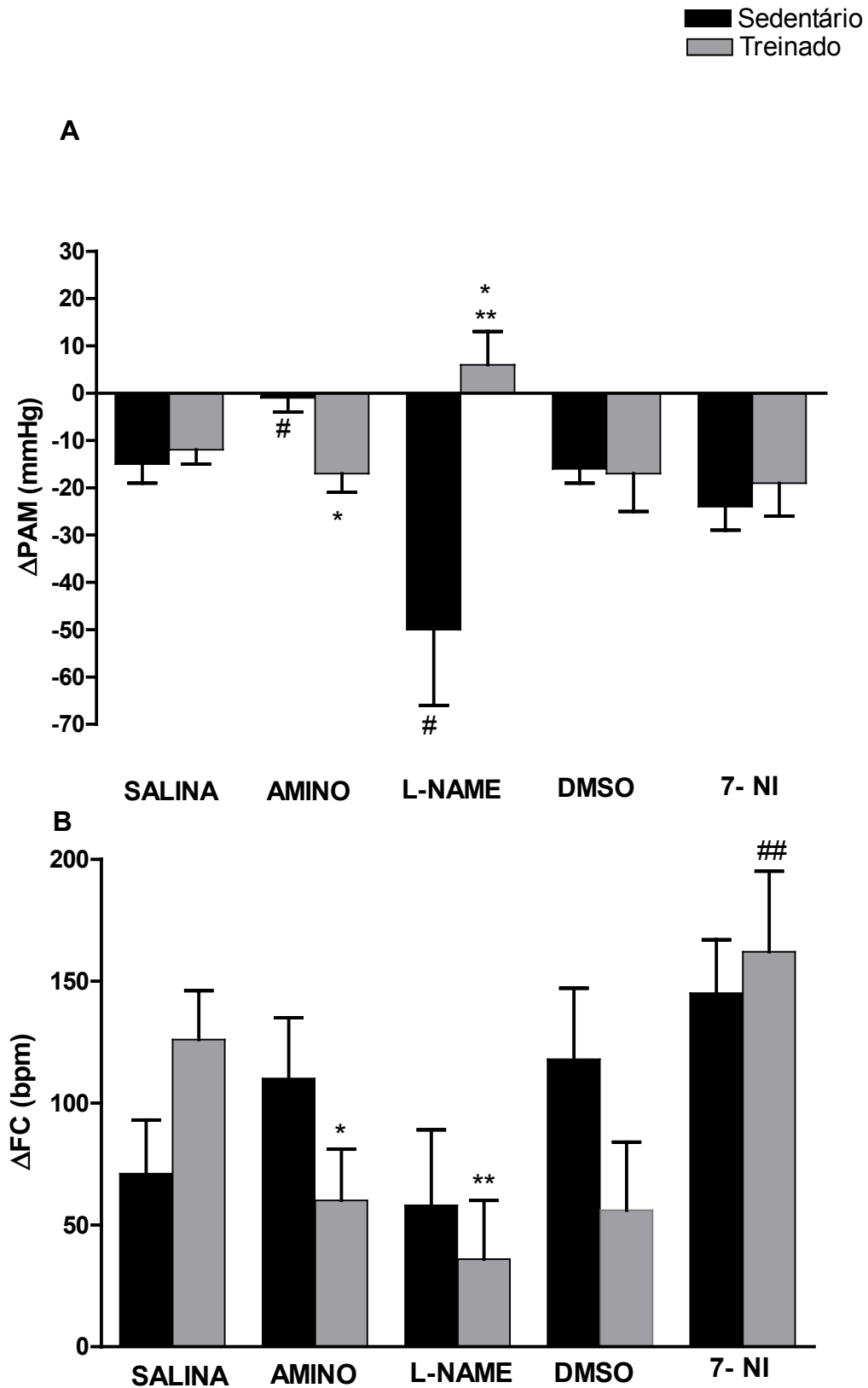


FIGURA 20 – Variação máxima da pressão arterial média (Δ PAM) (A), e da frequência cardíaca (Δ FC) (B), 50 minutos após a administração de LPS (Fase 3), nos grupos sedentários e treinados submetidos aos diferentes tratamentos (salina, DMSO, aminoguanidina, L-NAME e 7-NI). * Diferença entre grupo sedentário e grupo treinado ($p < 0,05$). # Diferença entre sedentário tratado e sedentário salina ($p < 0,05$). ** Diferença entre grupo treinado tratado e grupo treinado salina ($p < 0,05$). ## Diferença entre treinado DMSO e treinado 7-NI

4.4 ANÁLISE DO EDEMA PULMONAR E QUANTIFICAÇÃO DE TNF- α EM ANIMAIS COM ENDOTOXEMIA INDUZIDA POR LPS

A análise do edema pulmonar foi realizada em animais sedentários (SED), e em animais submetidos ao treinamento físico (TF), tratados com salina (0,9%), aminoguanidina (20mg/kg), L-NAME (20mg/kg) e 7-NI (8mg/kg) e submetidos à endotoxemia pela administração de LPS (5mg/kg).

O edema pulmonar foi uma das alterações promovidas pela administração de LPS em animais SED e TF. Entretanto, o índice de edema pulmonar (IEP) e o ganho de peso pulmonar (GPP) em animais TF foi estatisticamente baixo (IEPSED = $0,65 \pm 0,01$ vs. IEPTF = $0,60 \pm 0,02$; $p < 0,05$; GPPSED = $0,68 \pm 0,02$ vs. GPPTF = $0,38 \pm 0,09$; $p < 0,05$; Fig. 21A e B). O grupo sedentário e treinado submetido ao tratamento prévio com aminoguanidina, um inibidor da iNOS; apresentou uma diminuição do ganho de peso pulmonar e do índice de edema pulmonar em relação aos grupos sedentário e treinado tratados com salina (Fig. 22A e B). Após o bloqueio da iNOS, os valores do IEP e do GPP foram reduzidos nos grupos sedentário e treinado, sugerindo um papel da iNOS no edema pulmonar em ambos os grupos.

O tratamento prévio com L-NAME não modificou o índice de edema pulmonar no grupo sedentário, em relação ao grupo sedentário salina. Entretanto, o grupo treinado L-NAME apresentou maiores valores no IEP, quando comparado ao grupo sedentário L-NAME (Fig.22). Estes efeitos sugerem um papel protetor da cNOS no edema pulmonar em animais treinados.

A administração de 7-NI não causou alteração significativa, tanto no grupo sedentário quanto no grupo treinado (Fig. 22), sugerindo que a nNOS pode não participar no edema pulmonar induzido por LPS.

A administração de LPS aumentou as concentrações plasmáticas de TNF- α no grupo sedentário para 2980 ± 41 pg/ml após 2 horas. No grupo treinado a administração de LPS também promoveu aumento dos níveis plasmáticos de TNF- α , mas numa menor proporção: 2434pg/ml ($p < 0,01$). O tratamento prévio com L-NAME aumentou as concentrações de TNF- α induzidas pela administração de LPS em ambos os grupos, sendo que o grupo treinado apresentou as maiores concentrações (Fig. 23).

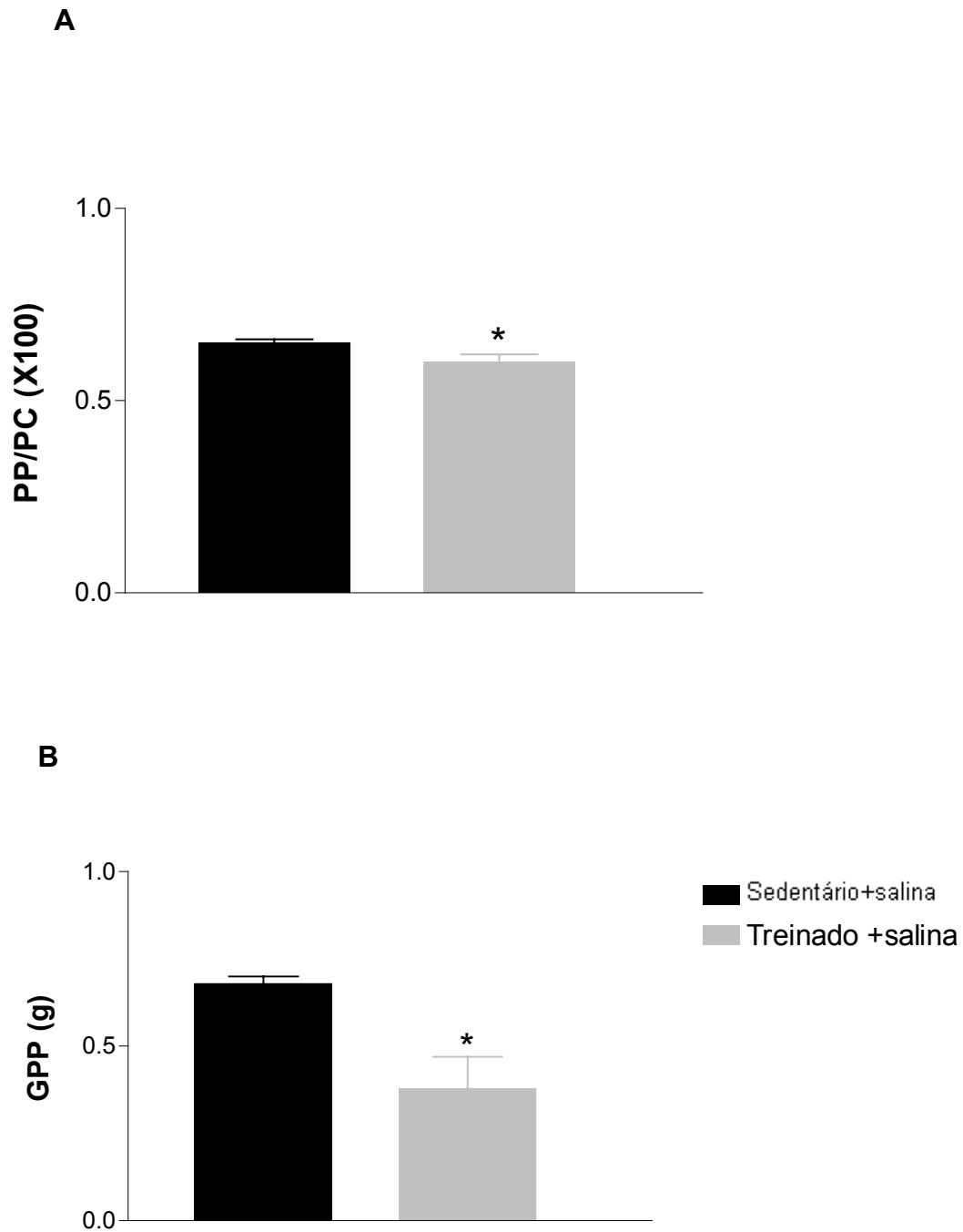


FIGURA 21 – Índice de edema pulmonar (peso pulmonar/peso corporal X 100) (A), e ganho de peso pulmonar (B), 5 horas após administração de LPS em animais sedentários (SED: n=6) e treinados (TF: n= 5). * Diferença em relação ao grupo sedentário ($p < 0,05$).

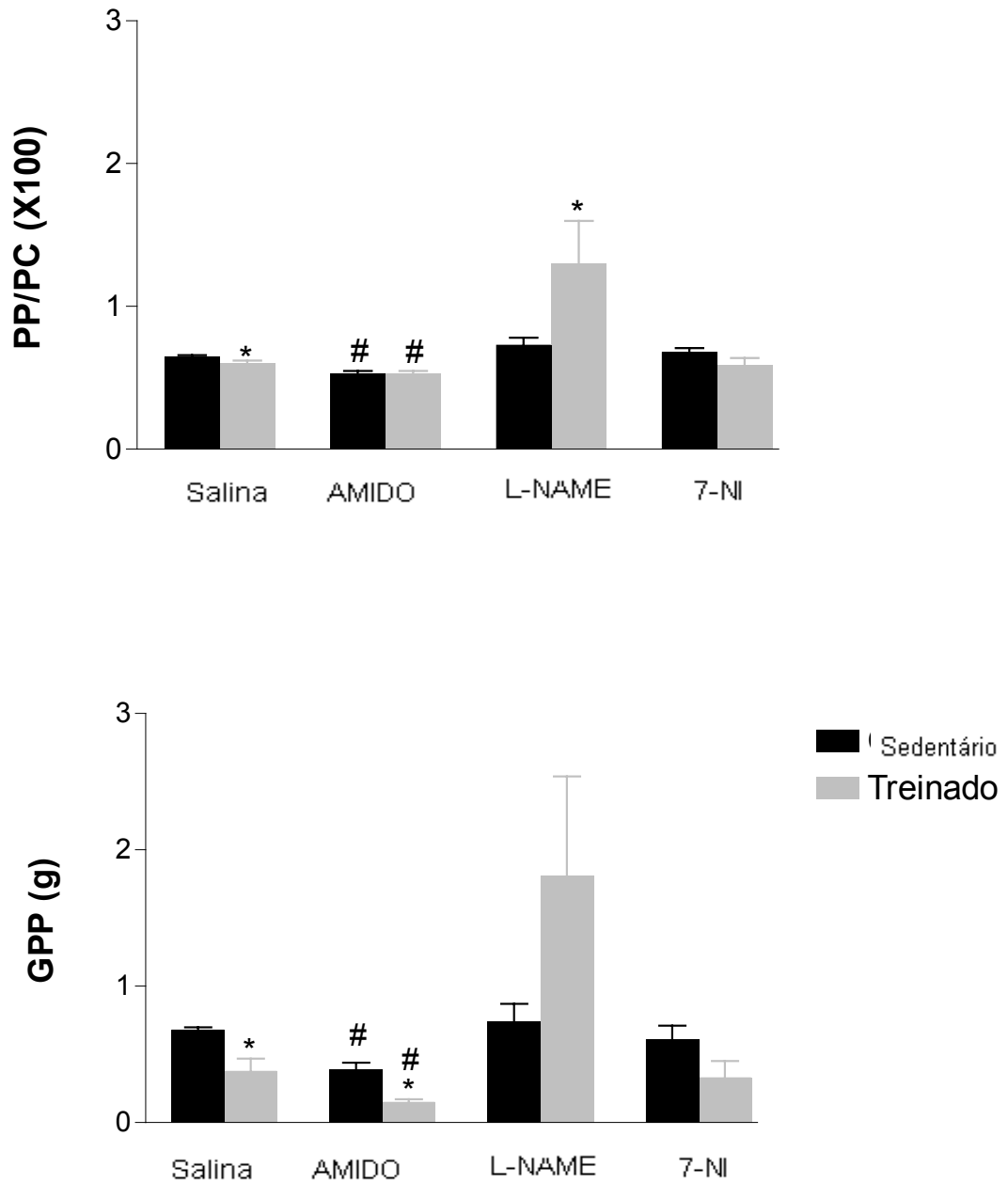


FIGURA 22 – Índice de edema pulmonar (IEP: peso pulmonar/peso corporal X 100) (A) e ganho de peso pulmonar (GPP) (B), 5 horas após a administração de LPS em animais sedentários e treinados salina (SED: n=6; TF: n=5), pré-tratados com L-NAME (20mg/kg)(SED: n=13; TF:n=11); ou aminoguanidina (Amino 20mg/kg)(SED: n=9; TF: n=6); ou 7-nitroindazol (7-NI: 8mg/kg)(SED: n=7; TF: n=5). * Diferença em relação ao sedentário ($p < 0,05$). # Diferença em relação aos grupos salina ($p < 0,05$).

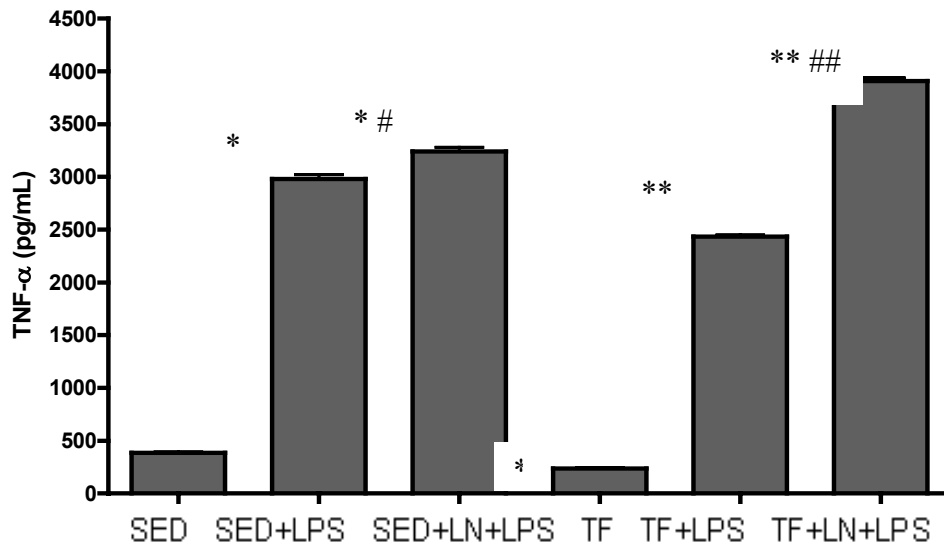


FIGURA 23 – Concentrações plasmáticas de TNF- α nos vários grupos em condições basais (Sedentário: SED, Treinado: TF), ou 2 horas após a administração de LPS. LN = L-NAME. Os valores representam a média \pm EPM e correspondem a dois experimentos independentes, utilizando 4 ratos por grupo. As diferenças entre as concentrações de TNF- α foram analisadas através do teste ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni. * Diferença em relação ao grupo sedentário; # Diferença em relação ao grupo sedentário LPS (SED + LPS); ** Diferença em relação ao grupo treinado (TF); ## Diferença em relação ao grupo treinado LPS (TF+LPS) ($p < 0,01$).

5 DISCUSSÃO

Está bem estabelecido na literatura que a endotoxemia produz falência múltipla de órgãos, a qual é causa freqüente de morte em pacientes que desenvolvem choque séptico. Em vários modelos experimentais, a endotoxina leva a um aumento da atividade da iNOS e da liberação de NO pelo endotélio (KILBOURN, 1998). O NO é produzido em grandes quantidades pela iNOS (SCHULZ *et al.*, 1992), o que pode contribuir significativamente para os efeitos deletérios da endotoxemia, como a hipotensão (THIMMERMANN & VANE, 1990), hiporesponsividade aos vasoconstritores (JULOU-SCHAEFFER *et al.*, 1990; GUC *et al.*, 1990), depressão cardíaca (RANGEL-FRAUSTO *et al.*, 1995), lesão e disfunção dos órgãos no choque séptico (ISKIT *et al.*, 1999).

Os mecanismos envolvidos nas adaptações ao exercício físico são complexos, sendo que, o equilíbrio entre seus efeitos benéficos, e prejudiciais dependem, sobretudo, da intensidade do exercício. Nossos dados mostraram que houve bradicardia de repouso, aumento do índice de massa muscular cardíaca, além de menor ganho de peso corporal nos animais treinados. Alguns estudos mostram que o treinamento físico aeróbico de baixa intensidade como a natação, leva a bradicardia de repouso que pode ser considerada um dos marcadores mais importantes de efetividade do treinamento físico. Um dos mecanismos sugeridos para a diminuição da FC nos animais treinados seria o aumento do tônus vagal cardíaco (De ANGELIS *et al.*, 2004). Segundo alguns autores, o treinamento físico está associado com menor consumo de oxigênio pelo miocárdio, além de aumento do volume de ejeção cardíaco (MEDEIROS *et al.*, 2004; WISLOFF *et al.*, 2001). Outros estudos indicam que o treinamento físico por natação em ratos, além de promover perda de peso corporal, promove aumento de 12 a 31% no índice de massa muscular cardíaca. (SCHAIBLE *et al.*, 1979; EVANGELISTA *et al.*, 2003).

Neste estudo, nós investigamos o envolvimento dos inibidores das vias indutiva e constitutiva da NOS nas respostas cardiovasculares em animais sedentários e treinados. Nossos dados mostraram uma resposta pressora tônica nos grupos sedentários e treinados tratados com L-NAME (inibidor da cNOS), onde houve um aumento nos valores da pressão arterial média em relação ao basal, acompanhados de bradicardia. No grupo treinado com a administração de L-NAME,

houve uma menor resposta hipertensiva, quando comparado ao grupo sedentário L-NAME, com uma tendência numérica a menores valores de FC. Vários estudos demonstram que a administração aguda de L-NAME promove aumento na PAM e que quando este inibidor é usado de forma crônica (STRUNK *et al.*, 2001), ocorre hipertensão em ratos normais (HUSAIN K., 2002). O treinamento físico tem como característica menores valores de frequência cardíaca (bradicardia de repouso), que é dado através de adaptações do sistema nervoso autônomo. Alguns autores propõem que estas adaptações possam ocorrer via modulação periférica da atividade simpática. Ainda não está claro, se a modulação simpática ocorre por redução do número ou da afinidade de receptores β - cardíacos ou por redução do fluxo central simpático (DIXON *et al.*, 1992; STONE *et al.*, 1985). Dados do laboratório evidenciaram que após este mesmo protocolo de treinamento físico, o fluxo simpático central estaria atenuado, caracterizado por uma menor resposta pressora ao nível do RVLm pela administração local de L-glutamato (MARTINS-PINGE *et al.*, 2005). Além disso, o treinamento físico está associado a um aumento da expressão da eNOS e da nNOS nos músculos ventilatórios e das extremidades (VASSILAKOPOULOS *et al.*, 2003), e também a um aumento da produção de óxido nítrico em vasos coronários e artérias do músculo esquelético (GREEN *et al.*, 1996). Há consideráveis evidências indicando que o NO exerce um efeito inibitório no controle simpático da função cardíaca tanto em animais controle quanto em animais treinados. Vários estudos têm sugerido, que uso de inibidores da eNOS e da nNOS aumentam a liberação de norepinefrina durante a estimulação simpática em corações isolados de ratos, sendo que este efeito persiste mesmo em preparações onde o endotélio foi retirado, sugerindo neste caso, que a possível fonte de NO possa ser proveniente da via neuronal (SCHWARZ *et al.*, 1995; SEARS *et al.*, 1998). Estes achados sugerem que o treinamento físico aumenta a produção de NO, e que este pode contribuir para a redução da atividade simpática e conseqüente atenuação das respostas pressoras observadas no grupo treinado tratado com L-NAME, quando comparado ao grupo sedentário.

Nos animais tratados com 7-NI, inibidor da nNOS, foi observado um aumento dos valores da PAM em relação ao basal, tanto no grupo sedentário quanto no grupo treinado, entretanto, não observamos diferença significativa entre os grupos. Uma das ações periféricas do NO derivado da nNOS é reduzir a liberação de norepinefrina (SCHWARZ *et al.*, 1995), e facilitar a liberação de Ach que inibe as

respostas à estimulação nervosa simpática e facilita a ação cronotrópica negativa da estimulação vagal (SEARS *et al.*, 2004). O aumento da pressão arterial média observada após a administração de 7-NI em nosso estudo seria provavelmente decorrente de um aumento da liberação de norepinefrina e da estimulação simpática.

Em relação à inibição da iNOS, o grupo sedentário aminoguanidina não apresentou alterações significativas na PAM em relação ao valor basal, o que sugere uma maior seletividade da aminoguanidina no bloqueio da iNOS, que na ausência de estímulos imunológicos não possui efeito tônico importante. Alguns estudos que utilizaram doses maiores de aminoguanidina observaram aumento significativo na PAM, provavelmente em função da inibição da atividade da cNOS (HOCK *et al.*, 1997; GRIFFITHS *et al.*, 1993). No entanto, no grupo treinado a aminoguanidina promoveu atenuação da resposta pressora tônica, em relação ao grupo sedentário. O significado fisiológico desse efeito é ainda desconhecido.

As alterações da pressão sangüínea após a administração endovenosa de LPS em ratos acordados têm sido observadas em outros estudos (LIN *et al.*, 2006). Nossos dados mostraram três fases distintas na pressão arterial média (PAM) em ratos sedentários e treinados após o LPS, onde observamos uma resposta hipotensiva atenuada no grupo de animais treinados. Um resultado similar foi obtido em um recente estudo (CHEN *et al.*, 2007), no qual os ratos foram treinados em esteira motorizada. Este estudo também mostrou que o treinamento físico promove atenuação nas concentrações plasmáticas de nitrito/nitrato e nas citocinas pró-inflamatórias.

Nossos dados mostraram que o exercício físico é benéfico, atenuando as anormalidades cardiovasculares no modelo de endotoxemia induzido pela administração de LPS. Uma das vantagens do nosso trabalho foi o uso de animais acordados, o que permitiu a avaliação sem a interferência da anestesia. A literatura tem mostrado que o uso de anestesia reduz o tempo de sobrevivência de animais submetidos ao choque séptico (SHEN *et al.*, 2004). Além disso, o uso da anestesia parece estar associado com alterações nos níveis de RNA mensageiro para a iNOS no pulmão (MARTINEZ *et al.*, 2000).

Há fortes evidências que a administração de inibidores da NOS é benéfica na restauração da pressão arterial e da reatividade vascular em humanos e em modelos experimentais de septicemia em animais. No sentido de avaliar o efeito

da inibição direta da iNOS sobre as alterações cardiovasculares induzidas pelo LPS, foi realizada a administração prévia de aminoguanidina. Estudos anteriores mostraram que a aminoguanidina é cerca de 30-40 vezes mais seletiva para a iNOS do que para a cNOS. (CORBETT *et al.*, 1992; GRIFFITHS *et al.*, 1993).

Nossos dados mostraram que houve atenuação da resposta hipotensora e da taquicardia após a administração de LPS no grupo sedentário tratado previamente com aminoguanidina, quando comparado ao grupo sedentário tratado com salina. Vários estudos têm demonstrado, que a inibição seletiva da iNOS atenua a hipotensão induzida por LPS através do aumento da resistência vascular sistêmica sem efeitos prejudiciais na função cardíaca (HAUSER *et al.*, 2005). Outros estudos demonstraram que a disfunção cardíaca e a liberação aumentada de óxido nítrico observadas na endotoxemia podem estar associadas com altas concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias, e com o aumento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no miocárdio. Animais tratados com inibidores da iNOS apresentam níveis reduzidos de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (HAUSER *et al.*, 2005; STRUNK *et al.*, 2001; ENKHBAATAR *et al.*, 2004).

O grupo treinado tratado previamente com aminoguanidina apresentou uma maior hipotensão induzida pela administração de LPS, seguida de menores variações na taquicardia, quando comparado ao grupo sedentário tratado com aminoguanidina. Esse resultado nos surpreendeu, já que a literatura tem mostrado um elevado número de trabalhos que apontam para um papel chave da iNOS na hipotensão característica da sepse, e que o bloqueio da iNOS promove atenuação da hipotensão (BONE *et al.*, 1997; THIMMERMANN & VANE, 1990; VANHOUTTE, 2001; ALBERTINI *et al.*, 2002; VONA-DAVIS *et al.*, 2002). Vários trabalhos “in vitro” e “in vivo” têm evidenciado que há uma auto-regulação das isoformas da NOS. Nestes trabalhos, o uso do bloqueio farmacológico ou de animais “knockout” para a cNOS levou a uma produção excessiva de NO via iNOS e vice-versa (SCOTT *et al.*, 2002; MARIOTTO *et al.*, 2004; PERSCHINI *et al.*, 2006). Assim, baseado nesses achados, é possível que uma vez que a via indutiva da NOS esteja bloqueada, a atividade da cNOS torne-se mais evidente, e estando aumentada pelo treinamento físico, seja responsável pela hipotensão observada nos animais treinados tratados com aminoguanidina.

O grupo sedentário L-NAME submetido à endotoxemia apresentou

maiores valores de PAM a partir do tempo 0 minuto, quando comparado ao grupo sedentário salina, caracterizando a inibição da cNOS. No entanto, embora os valores reais da PAM durante a endotoxemia em ratos tratados com L-NAME tenham sido maiores que no sedentário salina, a diminuição na PAM durante as 3 fases da endotoxemia foi acentuada após o tratamento com L-NAME, sugerindo que a via constitutiva parece proteger contra os efeitos hipotensivos da sepse. Camundongos “knockout” para cNOS apresentam aumento na pressão arterial basal (SHESELY *et al.*, 1996). Segundo STRUNK *et al.* (2001), o L-NAME restaura os valores da PAM na sepse via inibição da eNOS, aumentando a resistência vascular periférica. Além disso, foi encontrado que em ratos normais sedentários, o L-NAME diminui a vasodilatação endotélio-dependente de Ach, a qual pode ser resultado direto da inibição da eNOS (VARGAS *et al.*, 1994). Em experimentos realizados com cães submetidos à endotoxemia, o tratamento com inibidores da cNOS restaurou a resistência vascular sistêmica, mas reduziu a força de ejeção cardíaca e o fluxo sanguíneo na artéria femoral (KLABUNDE *et al.*, 1991). Vários estudos demonstraram que o bloqueio da cNOS através do L-NAME reverte a hipotensão, mas também altera o fluxo sanguíneo nos órgãos e reduz a oxigenação e a força de ejeção cardíaca em modelos de septicemia (AVOUNTUUR *et al.*, 1995; PETROS *et al.*, 1994).

O pré-tratamento com L-NAME nos animais treinados bloqueou totalmente os efeitos hipotensivos observados nas 3 fases da endotoxemia por LPS. Esse resultado nos permite concluir que neste modelo de sepse, a via constitutiva, ao contrário do que ocorre nos animais sedentários, parece ter um papel relevante na manutenção dos valores pressóricos nos animais treinados. Uma possível explicação para esse resultado seria baseada nas evidências de que camundongos transgênicos com superexpressão de eNOS mostraram-se resistentes à hipotensão induzida pela administração de LPS (YAMASHITA *et al.*, 2000), e que animais submetidos a diferentes protocolos de treinamento físico, apresentaram aumento na expressão das enzimas constitutivas da NOS em diferentes tecidos e órgãos (SESSA *et al.*, 1994; McALLISTER & LAUGHLIN, 2006; HUSAIN, 2004; ZHENG *et al.*, 2005). Além disso, dados encontrados na literatura mostram que existe uma auto-regulação na expressão das isoformas da NOS, onde agentes liberadores de NO como o nitroprussiato de sódio, previnem a expressão da iNOS em neutrófilos de ratos tratados com LPS (MARIOTTO *et al.*, 2004; PERSCHINI *et al.*, 2006).

Assim, é possível que haja um aumento da expressão da cNOS no animal treinado, e os níveis de NO aumentados possivelmente levariam à atenuação da expressão da iNOS. Embora nós não tenhamos dosado as concentrações de NO no sangue dos nossos animais, nossos dados utilizando bloqueio farmacológico com baixas doses dos inibidores, sugerem que após treinamento físico a expressão da cNOS esteja aumentada, enquanto a iNOS esteja atenuada.

Nossos dados mostraram que o pré-tratamento com 7-NI não modificou as respostas pressoras dos animais sedentários, comparados com animais tratados com salina ou com DMSO, e que nos animais treinados também não foram observadas alterações na pressão arterial pelo 7-NI. No entanto, a resposta de frequência cardíaca nos animais treinados e tratados com 7-NI se mostrou acentuada para a taquicardia durante as fases 2 e 3 quando comparados com o veículo DMSO. Dados da literatura corroboram esses achados. Em camundongos “knockout” para nNOS, foi evidenciado um aumento da frequência cardíaca em relação aos controle selvagens, sendo indicativo de uma atenuação da atividade vagal cardíaca. Dessa forma, parece que o NO derivado da nNOS tem um papel importante no controle vagal como modulador da frequência cardíaca (SEARS *et al.*, 2004; JUMRUSSIRIKUL *et al.*, 1998). Este papel modulatório do NO sobre as respostas autonômicas cardíacas parece ser importante em situações onde há aumento de expressão da nNOS, como no exercício físico. Camundongos submetidos ao treinamento físico apresentaram um aumento de 73% da expressão da nNOS e aumento da bradicardia vagal, a qual foi inibida através do uso de um inibidor específico da nNOS (DANSON & PATERSON, 2003).

A literatura tem mostrado que todas as isoformas da NOS estão presentes no trato respiratório (ASANO *et al.*, 1994). A eNOS está localizada nas células endoteliais dos vasos sanguíneos pulmonares, a nNOS nos nervos das vias aéreas de animais e humanos e a iNOS em vários tipos celulares como macrófagos, células epiteliais alveolares do tipo II, mastócitos, células endoteliais, neutrófilos e condrócitos (RICCIARDOLO *et al.*, 2003). As isoformas trabalham em conjunto para regular o tônus da musculatura lisa aérea e as respostas imunes e inflamatórias.

No presente estudo, nós também analisamos o edema pulmonar como efeito da endotoxemia, e a participação das vias constitutiva e indutiva de produção de óxido nítrico, em animais sedentários (SED) e treinados (TF). A escolha da dose de LPS foi baseada em estudos prévios, onde 5mg/kg promoveu um

aumento significativo no índice de edema pulmonar (IEP) (LEE et al., 2001). Nossos dados sugerem que o bloqueio da iNOS pela aminoguanidina (20mg/kg), é importante na redução do IEP em ratos acordados, pelo menos na fase inicial da endotoxemia (MEHANNA *et al.*, 2007). Embora nós não tenhamos observado qualquer diferença no índice de edema pulmonar entre SED e TF quando a aminoguanidina foi utilizada, o ganho de peso pulmonar (GPP), foi reduzido mais intensamente em animais treinados. Nossos dados junto com outros na literatura, sugerem que o NO derivado da iNOS atua como um importante mediador no edema pulmonar agudo induzido por endotoxemia. Por outro lado, a cNOS parece proteger o pulmão contra o edema, pois houve um aumento do índice de edema pulmonar após o L-NAME (inibidor da cNOS) no grupo treinado, e um aumento numérico no grupo sedentário. No nosso estudo também avaliamos a participação da nNOS no edema pulmonar por endotoxemia. No entanto, nós não observamos qualquer efeito após a administração de 7-NI anterior ao LPS em nenhum dos grupos estudados, sugerindo que a nNOS não participe do edema pulmonar agudo induzido por LPS. Dessa forma, é possível especular que o bloqueio com L-NAME poderia estar mais relacionado ao bloqueio da eNOS do que da nNOS. Embora, em nosso estudo não foi mensurada a expressão da eNOS nos pulmões, é possível que o efeito diferencial do L-NAME no IEP de animais treinados possa estar relacionado com a produção basal aumentada do óxido nítrico pela eNOS nestes animais. De fato, foi observado após o treinamento físico de curto período, um aumento da expressão da eNOS no tecido arterial pulmonar (JOHNSON *et al.*, 2001).

Nosso estudo demonstrou que 2 horas após a administração de LPS, houve um aumento dos níveis plasmáticos de TNF- α em ambos os grupos SED e TF, mas esse aumento foi menor nos treinados. Nossos dados também mostraram que as alterações induzidas pelo LPS no TNF- α plasmático foram aumentadas pelo L-NAME, e este efeito foi maior nos ratos treinados. A possível implicação destes achados é que as citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , geralmente precedem a ativação da iNOS sob condições sépticas. Após a inibição da cNOS, mais TNF- α seria produzido, e desta forma mais iNOS poderia ser ativada. É possível que o treinamento físico possa influenciar muitos aspectos da endotoxemia através de ações antiinflamatórias e o NO proveniente da cNOS parece exercer um papel importante.

É possível que nos ratos treinados, esta proteção dada pela cNOS

possa ser uma adaptação característica do exercício físico que protege contra o edema pulmonar. A literatura tem mostrado que o exercício físico aumenta a expressão da eNOS em muitos tecidos (VASSILAKOPOULOS *et al.*, 2003; LAUGHLIN *et al.*, 2004; GREEN *et al.*, 2004). Nossos dados com L-NAME em ratos treinados, estão em concordância com o aumento da expressão da eNOS nos pulmões pelo treinamento físico. A razão para este efeito ainda é desconhecida, mas resultados similares foram obtidos com camundongos transgênicos acordados com superexpressão da eNOS, após a administração de LPS (YAMASHITA *et al.*, 2000).

Nossos dados sobre o papel da iNOS no edema pulmonar induzido por LPS estão de acordo com a literatura, onde tem sido sugerido que muitos aspectos da lesão pulmonar são melhorados pelos inibidores da iNOS e os efeitos da sepse são agravados pelos inibidores da cNOS, como o L-NAME (MEHTA, 2005). Entretanto, a literatura tem mostrado também uma atenuação do edema pulmonar e do NO exalado em pulmões isolados e perfundidos “in vivo” após o tratamento com aminoguanidina e L-NAME (LEE *et al.*, 2001), ou em ratos acordados após L-NAME (LIU *et al.*, 2007). A discrepância com os nossos dados pode ser dada pelo uso de anestesia, a qual é conhecida por ativar a via da iNOS (LOSONCZY *et al.*, 1997) ou no caso de ratos acordados pelo uso de diferentes doses de LPS ou L-NAME (LIU *et al.*, 2007).

A inibição da cNOS pode levar a outros efeitos nos vasos pulmonares. A pressão arterial pulmonar aumentada após a inibição da cNOS tem sido demonstrada em vários modelos experimentais (MEYER *et al.*, 1994; HINDER *et al.*, 1998, 1999). Este aumento pode afetar o balanço de fluidos pulmonares. Embora nós não possamos descartar a possibilidade de que o L-NAME aumente a pressão pulmonar, o aumento do IEP foi observado somente no grupo treinado, sugerindo que este efeito pode não ser relacionado somente ao tônus vascular pulmonar.

O tempo após o LPS onde nós observamos as alterações no IEP está de acordo com a literatura, que tem demonstrado que a expressão do RNA mensageiro da iNOS após o LPS em ratos acordados alcançam um pico no coração, pulmão, baço e fígado entre 3 e 6 horas e retorna ao nível basal em 24 horas (LIN *et al.*, 2006).

Em resumo, as adaptações cardiopulmonares promovidas pelo treinamento físico parecem ser benéficas, se contrapondo às anormalidades

observadas na fase inicial da sepse induzida por LPS. Acreditamos que o NO da via constitutiva deve participar desse processo. O presente estudo avaliou pela primeira vez o papel das vias enzimáticas no desenvolvimento do edema pulmonar e nas respostas cardiovasculares em ratos acordados e submetidos à endotoxemia e os efeitos preventivos do treinamento físico. Para isso foram usados diferentes inibidores da NOS como ferramentas farmacológicas. Embora baixas concentrações de inibidores tenham sido usadas para garantir seletividade, nós acreditamos que seria importante analisar a expressão da NOS nos tecidos durante a endotoxemia nos animais sedentários e treinados para melhor elucidar o fenômeno. Para tanto, estudos futuros serão necessários para alcançar esse objetivo.

6 CONCLUSÕES

As alterações promovidas pelo treinamento físico mostraram-se benéficas, no sentido de se contrapor às anormalidades cardiovasculares, pulmonares e imunológicas observadas na fase inicial da endotoxemia induzida pelo LPS.

As análises cardiovasculares revelaram papéis diferentes durante a endotoxemia para as isoformas da NOS, onde a iNOS parece ser predominante nos animais sedentários, enquanto a cNOS nos animais treinados.

Além disso, a inibição da cNOS pelo L-NAME revelou um papel protetor desta via sobre o edema pulmonar e a produção de TNF- α durante a endotoxemia nos animais sedentários e especialmente nos treinados.

REFERÊNCIAS

AARON, S.D.; VALENZA, F.; VOLGYESI, G.; MULLEN, J.B.; SLUTSKY, A.S.; STEWART, T.E. Inhibition of exhaled nitric oxide production during sepsis does not prevent lung inflammation. **Critical Care Medicine** v.26, p.309-314. 1998.

ALBERT, C; BRUN-BUISSON, C.; BURCHARDI, H.; et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicenter cohort study. **Intensive Care Medicine** v.28, p.108-121, 2002.

ALBERTINI, M.; LAFORTUNA, C.L.; CLEMENT, M.G.; MAZZOLA, S.; RADICE, S.; HUSSAIN, S.N.A. effect of No synthase inhibition on cardiovascular and pulmonary dysfunction in a porcine short-term model of endotoxic shock. Prostaglandins, Leukotrienes and Essencila Fatty Acids v. 67, n.6, p. 365-372, 2002.

ANNANE, D.; TRABOLD, F.; SHARSHAR, T.; JARRIN, I.; BLANC, A.S.; RAPHAEL, J.C.; GAJDOS, P. Inappropriate sympathetic activation at onset shock: a spectral analysis approach. **American Journal of Respiratory and Critical care Medicine** v.160, p.458-465, 1999.

ARANOW, J.S.; ZHUANG, J.; WANG, H.; et al. A selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase prolongs survival in a rat model of bacterial peritonitis: comparison with two nonselective strategies. **Shock** v.5, p.116-121, 1996.

ARBABI, S e MAIER, R.V. Mitogen-actived protein kinases. **Critical Care Medicine** v.30 (suppl 1), p.S74-S79, 2002.

ASANO, K; CHEE, C.B.E; GASTON, B.; LILLY, C.M.; GERARD, C.; DRAZEN, J.M.; STAMLER, J.S. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation and activity in human lung epithelial cells. **Proceeding of National Academic of Science USA** v.91, p.10089-10093, 1994.

AVONTUUR, J.A.; BRUINING, H.A.; INCE, C. Inhibition of nitric oxide synthesis causes myocardial ischemia in endotoxemic rats. **Circulation Research** v.76, p.418-425, 1995.

BALON, T. W. ; NADLER, J. L. Evidence that oxide nitric increases glucose transport in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology** v.82, p.359-363, 1997.

BALON, T.W. e NADLER, J.L. Nitric oxide release is present from incubated is present in incubated skeletal muscle preparations. **Journal of Applied Physiology** v.77, n.6, p.2519-2521, 1994.

BLAIR, S.N.; CHENG, Y.; HOLDER, J.S. Is physical activity or physical fitness more important in defining health benefits? **Medicine & Science in Sports & Exercise** v.33, p.S379-S399, 2001.

BONE, R.C.; GRODZIN, C.J.; BALK, R.A. Sepsis, a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. **Chest**. v.112, p. 235-243, 1997.

BRADLEY, S.J., KINGWELL, B.A., McCONNELL, G.K. Nitric oxide synthase inhibition reduces leg glucose uptake but not blood flow during dynamic exercise in humans. **Diabetes** v.48, n.9 , p.1815-1891, 1999.

BRIX-CHRISTENSEN, V; ANDERSEN, SK; ANDERSEN, R; et al. Acute Hyperinsulinemia restrains endotoxin-induced systemic inflammatory response. **Anesthesiology** v.100, p. 861-870, 2004.

BURNEY, S.; CAUFIELD, J.L.; NILES, J.C; .et al. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrate. **Mutation Research** v.424, p.37-49, 1999.

CARTEE, G. D.; YOUNG, M.D.; SLEEPER, M. D.; ZIERATH, H.; HENRIKSSON, W. ; HOLLOSZY, J. O. Prolonged increase in insulin stimulated glucose transport in muscle after exercise. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**. v. 256, n. 19, p.E494-E499,1989.

CHEN H.I.; CHIANG I.P.; JEN C.J. Exercise training increases acetylcholine-stimulated endothelium-derived nitric oxide release in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Biomedical Science** v.3, p.454-460, 1996

CHEN, H.I. e LI, H.T. Physical conditioning can modulate endothelium-dependent vasorelaxation in rabbits. **Arteriosclerosis and Thrombosis** v.13, p.852-856, 1993.

CHEN, H.I.; HSIEH, S.Y.; YANG, F.L.; HSU, Y.H.; LIN, C.C. Exercise training attenuates septic responses in conscious rats. **Medicine & Science in Sports & Exercise** v.39, n.3, p. 435-442, 2007.

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, p.970-975, 1994.

COHEN, RI; SHAPIR, Y; CHEN, L; et al. Right ventricular overload causes the drop in cardiac output following nitric oxide synthesis inhibition in endotoxemia. **Critical Care Medicine** v.26, p.738-747, 1998.

COLASANTI, M e SUZUKI, H. The dual personality of NO. **Trends of Pharmacology Science** v.21, p.249-252, 2000.

COMINI, L.; BORASO, A.; BACHETTI, T.; BERNOCCHI, P.; PASINI, E.; BASTIANON, D.; CURELLO, S.; TERRACCIANO, C.M.; CECONI, C.; FERRARI R.. Effects of endotoxic shock on neuronal NOS and calcium transients in rat cardiac myocytes. **Pharmacological Research** v.51, p.409-417, 2005.

CORBETT, J.A.; TILTON, K.; CHANG, K.S.; HASAN, Y.I.; WANG, J.L.SWEETLAND, J.R.; LANCASTER, J.R.; WILLIAMSON, J.R.; McDANIEL, M.L. Aminoguanidine a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. **Diabetes** v. 41, p.552-556, 1992.

CSONT, T.; VIAPPIANI, S.; SAWICKA, J.; SLEE, S.; ALTAREJOS, J.Y.; HARBELE, I. B.; SHULZ, R. The involvement of superoxide and iNOS-derived NO in cardiac dysfunction induced by pro-inflammatory cytokines. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** v. 39, p. 833-840, 2005.

DANSON, E.J.F. e PATERSON, D. J. Enhanced neuronal nitric oxide synthase expression is central to cardiac vagal phenotype in exercise-trained mice. **Journal of Physiology** v. 546, n.1, p.225-232, 2003.

De ANGELIS, K.; WICHI, R.B.; JESUS, W.R.; MOREIRA, E.D.; MORRIS, M.; KRIEGER, E.M. Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice. **Journal of Applied Physiology** v.96, p. 2174-2178, 2004.

DELP, M.D.; MCALLISTER, R.M.; LAUGHLIN, M.H. Exercise training alters endothelium-dependent vasoreactivity of rat abdominal aorta. **Journal of Applied Physiology** v.75, p.1354-1363, 1993.

DIXON, E.M.; KAMATH, M.V.; McCARTNEY, N.; FALLEN, E.L. Neural regulation of heart variability in endurance athletes and sedentary controls. **Cardiovascular Research** v.26, p.713-719, 1992.

ENKHBAATAR, P.; TRABER, D. Role of neuronal nitric oxide synthase in cardiopulmonary lesions of sepsis. In: Vincent J.L., ed **Yearbook of intensive care and emergency medicine** 2004. Berlin, Germany: Springer, 2004: 85-92.

ESCH, T.; STEFANO, G.B.; FRICCHIONE, G.L.; BENSON, H. Stress-related diseases: a potential role for nitric oxide. **Medical Science Monitor: international medical journal of experimental and clinical research** v.8, p.RA 103- RA118, 2002.

EVANGELISTA, F.S.; BRUN, P.C.; KRIEGER, J.E. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v.52, P.1751-1759, 2003.

EVANS, T.; CARPENTER, A.; KINDERMAN, H.; COHEN, J. Evidence of increased nitric oxide production in patients with the sepsis syndrome. **Circulatory Shock** v.41, p.77-81, 1993.

GIULIVI, C.; PODEROSO, J.J.; BOVERIS A. Production of nitric oxide by mitochondria. **Journal of Biological Chemistry** v.273, p.11038-11043, 1998.

GREEN, D.J.; BLANKSBY, B.A.; TAYLOR, R.R.. Control of skeletal muscle derived blood flow during dynamic exercise: contribution of endothelium derived nitric oxide. **Sports Medicine** v. 21, p.119-146, 1996.

GREEN, D.J.; MAIORANA, A.; O`DRISCOLL, G.; TAYLOR, R. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. **Journal of Physiology** v.561, p.1-25, 2004.

GRIFFITS, M.J.; MESSENT, R.J.; MacALLSITER; EVANS, T.W. Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. **British Journal of Pharmacology** v.110, p.963-968, 1993.

GUC, M.O.; FURMAN, B.L.; PARRATT, J.R. Endotoxin-induced impairment of vasodepressor responses in the pithed rat. **British Journal of Pharmacology** v.101, p.913-919, 1990.

HAUSER, B.; BRACHT, H.; MATEJOVIC, M. Nitric oxide inhibition in sepsis? Lessons learned from large animals studies. **Critical Care and Trauma** v. 101, p.488-498, 2005.

HINDER, F.; MEYER, J.; BOOKE, M.; EHARDT, J.S.; SALSBURY, J.R.; TRABER, L.D.; TRABER, D.L. Endogenous NO and the pulmonary microvasculature in healthy sheep and during systemic inflammation. **American journal of Respiratory and Critical Care Medicine** v.157, p.1542-1549, 1998.

HINDER, F.; STUBBE, H.D.; AKEN, H.V.; WAURICK, R.; BOOKE, M.; MEYER, J. Role of nitric oxide in sepsis-associated pulmonary edema. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** v.159, p.252-257, 1999.

HIRAI, T.; VISNESKI, M. D.; KEARS, , K. J. ; ZELIS, R.; MUSCH, T. I. Effects of NO synthase inhibition on the muscular blood flow response to treadmill exercise in rats. **Journal Applied Physiology** v.77, p.1288-1293, 1994.

HOCK, C.E.;YIN, K.; YUE, G.; WONG, P.Y.K. Effects of inhibition of nitric oxide synthase by aminoguanidina in acute endotoxemia. **American Journal of Physiology** v. 272 , p. H843-H85, 1997.

HUSAIN, K. Physical conditioning modulates rat cardiac vascular endothelial growth factor gene expression in nitric oxide-deficient hypertension. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v.320, p.1169-1174, 2004.

ISKIT, A.B.; SUNGUR, A.; GEDIKOGLU, G.; GUC, M.O. The effects of bosentan, aminoguanidine and L-canavanine on mesenteric blood flow, spleen and liver in endotoxaemic mice. **European Journal of Pharmacology** v.379, p.73-80, 1999.

JEAN-BAPTISTE, E. Celular mechanisms in sepsis. **Journal of Intensive Care Medicine** v.22, p.63-72, 2007.

JIA, Y.X.; PAN, C.S.; YANG, J.H.; LIU, X.H.; YUAN, W.J.; ZHAO, J.; TANG, C.S.; QI, Y.F. Altered L-arginine/nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in the vascular adventitia of rats with sepsis. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** v.33, p.1202-1208, 2006.

JOHNSON, L.R.; RUSH, J.W.E.; TURK, J.R.; PRICE, E.M.; LAUGHLIN, M.H. Short-term exercise training increases Ach-induced relaxation and eNOS protein in porcine pulmonary arteries. **Journal of Applied Physiology** v.90, p.1102-1110, 2001.

JULO-SCHAEFFER, G.; GRAY G.A.; FLEMING I.; SCHOTT C.; PARRATT J.R., STOCLET J.C. Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-arginine pathway. **American Journal of Physiology** v.259, p.H1038-1043,1990.

JUMRUSSIRIKUL, P.; DINERMAN, J.; DAWSON, V.L.; EKELUND, U.; GEORGAKOPOULOS, D.; SCHRAMM, L.P.; CALKINS, H.; SNYDER, S.H.; HARE, J.M.; BERGER, R.D. Interaction between neuronal nitric oxide synthase and inhibitory G protein activity in heart rate regulation in conscious mice. **Journal of Clinical Investigation** v. 102, p. 1279-1285, 1998.

KAO, S.J.; YANG, F.L.; HSU Y.H., CHEN, H.I. Mechanism of pulmonary edema caused by enterovirus 71. **Clinical Infectious Diseases** v.38, p.1784-1788, 2004.

KELLEY, D. E.; GOODPASTER, B.H. Effects of exercise on glucose homeostasis in type 2 diabetes mellitus. **Medicine & Science in Sports & Exercise** v.33, p.S495-S501, 2001.

KENGATHAVAN, K.M.; DE KIMPE, S.J.; THIEMERMANN, C. Role of nitric oxide in the circulatory failure and organ injury of a rodent model of gram-positive shock. **British Journal of Pharmacology** v.119, p.1411-1421, 1996.

KILBOURN R. The discovery of nitric oxide as key mediator in septic shock. **Sepsis** v.1, p.85-91, 1998.

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

KLABUNDE, R.E., RITGER, R.C. NG-monomethyl-L-arginine (NMA) restores arterial blood pressure but reduces cardiac output in a canine model of endotoxemic shock. **Biochemical and Biophysical Research Communication** v.178, n. 3, p.1135-1140, 1991.

KOHL, H.W., III. Physical activity and cardiovascular disease: evidence for a dose response. **Medicine & Science in Sports & Exercise** v.33, p.S472-S483, 2001.

KOIZUMI, T.; OGASAWARA, H.; YAMAMOTO, H.; TSUSHIMA, K.; RUAN, Z.; JIAN, M.; FUJIMOTO, K.; KUBO, K. Effect of ONO1714, a specific inducible nitric oxide synthase inhibitor, on lung lymph filtration and gas exchange during endotoxemia in unanesthetized sheep. **Anesthesiology** v.101, p.59-65, 2004.

LASZLO, F.; WHITLLE, B.J.; EVANS, S.M.; MONCADA, S. Association of microvascular leakage with induction of nitric oxide synthase: effects of nitric oxide synthase inhibitors in various organs. **European Journal of Pharmacology** v.283, p. 47-53, 1995.

LAUGHLIN, M.H.; WOODMAN, C.R.; SCHRAGE, W.G.; GUTE, D.; PRICE, E.M. Interval sprint training enhances endothelial function and eNOS content in some arteries that perfuse white gastrocnemius muscle. **Journal of Applied Physiology** v.96, p.233-244, 2004.

LEE, C.C.; LIN, N.T.; HSU, Y.H.; CHEN, H.I. Inducible nitric oxide synthase inhibition potentiates multiple organ dysfunction induced by endotoxin in conscious rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology** v.45, p. 396-403, 2005.

LEE, R. P.; WANG, D. ; LIN, N. T.; CHEN, H. I. Physiological and chemical indicators for early and late stages of sepsis in conscious rats. **Journal of Biomedical Science** v.9, p.613-621, 2002.

LEE, R.P.; WANG, D.; KAO, S.J.; CHEN, H.I. The lung is the major site that produces nitric oxide to induce acute pulmonary oedema in endotoxin. **Shock** v.28, p.315-320, 2001.

LI, X.Y.; DONALDSON, K.; MACNEE, W. Lipopolysaccharide-induced alveolar epithelial permeability – the role of nitric oxide. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine** v.157, p.1027-1033, 1998.

LIN, N.T.; YANG, F.L.; LEE, R.P.; PENG, T.C.; CHEN, H.I. Inducible nitric oxide synthase mediates cytokine release: the time course in conscious and septic rats. **Life Sciences** v.78, p.1038-1043, 2006.

LIU, D.D.; HSU, Y.H.; CHEN, H.I. Endotoxin-induced acute lung injury is enhanced in rats with spontaneous hypertension. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** v.34, p.61-69, 2007.

LOSONCZY, G.; BLOCH, J.F.; SAMSELL, L.; SCHOENL, M.; VENUTO, R.; BAYLIS, C. Impact of surgery on nitric oxide in rats: evidence for activation of inducible nitric oxide synthase. **Kidney International** v.51, p.1943-1949, 1997.

LU, Q.; CEDDIA, M.A.; PRICE, E.A.; YE, S.M.; WOODS, J.A. Chronic exercise increases macrophage-mediated tumor cytotoxicity in young and old mice. **American Journal of Physiology** v.276, p.R482-489, 1999.

MACKINNON, L.T. Current challenges and future expectations in exercise immunology: back to the future. **Medicine & Science in Sports & Exercise** v.26, p.191-194, 1994.

MARIK, P.E.; ZALOPA G.P.. Therapeutic selection: has its time come? **Critical Care Medicine** v.30, p.949-952, 2002.

MARIOTTO, S.; MENEGAZZI, M.; SUZUKI, H. Biochemical aspects of nitric oxide. **Current Pharmaceutical Design** v.10, p.1627-1645, 2004.

MARIX, P.E.; RAGHAVAN, M. Stress-hyperglycemia, insulin and immunomodulation in sepsis. **Intensive Care Medicine** v.30, p.748-756, 2004.

MARTINEZ, F.E.; HARABOR, A.; AMANKWAH, E.K.; HART, D.A.; BELIK, J. Urethane suppresses rat lung inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase mRNA levels. **Inflammation Research** v.49, p.727-731, 2000.

MARTINS-PINGE, M.C.; BECKER, L.K.; GARCIA, M.R.L; ZOCCAL, D.B.; NETO, R.V.; BASSO, L.S.; SOUZA, H.C.D.; LOPES O.U. Attenuated pressor responses to amino acids in the rostral ventrolateral medulla after swimming training in conscious rats. **Autonomic Neuroscience : Basical & Clinical** v.112, p.21-28, 2005

MAYER, B., ANDREW, P. Nitric oxide synthases : catalytic function and progress towards selective inhibition. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology** v.358, n.1, p.127-133, 1998.

MAYEUX, P.R. Pathobiology of lipopolysaccharide. **Journal of Toxicology and Environmental Health** v.51, p. 415-435, 1997.

MCALLISTER, R.M; LAUGHLIN, M.H. Vascular nitric oxide: effects of physical activity, importance for health. **Essays in Biochemistry** v.42, p. 119-131, 2006.

McMICKING, J.D.; NATHAN, C; HOM, G; CHARTRAIN, N; FLETCHER, D.S.; TRUMBAUER, M; et al. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Cell** v.81, p.641-650, 1995.

MEDEIROS, A.; OLIVEIRA, E. M.; GIANOLLA, R.; CASARINI, D.E.; NEGRÃO, C. E.; BRUM, P.C. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hipertrophy in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 34, p. 1909-1917, 2004.

MEHANNA, A; VITORINO, D.C.; PANIS, C; BLANCO, E.E.A.; PINGE-FILHO, P; MARTINS-PINGE, M.C. Cardiovascular and pulmonary effects of NOS inhibition in endotoxemic conscious rats subjected to swimming training. **Life Sciences**, v.81, p.1301-1308, 2007.

MEHTA S.. The effects of nitric oxide in acute lung injury. **Vascular Pharmacology** v.43, p.390-403, 2005.

MEYER, J.; LENTZ, C.W.; STOTHERT, J.C.; TRABER, L.D.; HERNDON, D.N., TRABER, D.L. Effects of nitric oxide synthesis inhibition in hyperdynamic endotoxemia. **Critical Care Medicine** v.22, p.306-312, 1994.

MITCHELL, J.A.; GRAY, P.; ANNING, P.D.; WOODS, M.; WARNER, T.D.; EVANS, T.W. Effects of nitric oxide- modulating amino acids on coronary vessels: a relevance to sepsis. **European Journal of Pharmacology** v.389, p.209-215, 2000.

MOHAN, R.M., CHOATE, J.K., GOLDING, S., HERRING, N., CASADEI, B., PATERSON, D.J.. Peripheral pre-synaptic pathway reduces the heart rate response to sympathetic activation following exercise training: role of NO. **Cardiovascular Research** v.47, p.90-98, 2000.

MONCADA S. e HIGGS, E.A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **New England Journal of Medicine** v.329, p.2002-2012, 1993.

MONCADA, S e HIGGS, E.A. The Discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British Journal of Pharmacology** v.47, n1, p.S193-S201, 2006.

NAVA, L; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. Role of nitric oxide in endotoxic shock: effects of L-NMA. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.20, p.S132-S134, 1992.

NIEMAN, D.C.; HENSON, H.; GUSEWITCH, et al. Physical activity and immune function in elderly women. **Medicine & Science in Sports & Exercise** v.25, p.823-831, 1993.

NUMATA, M.; SUZUKI, S.; MIYAZAWA, N.; MIYASHITA, A.; NAGASHIMA, Y.; INOUE, S.; KANEKO, T.; OKUBO, T.. Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents LPS-induced acute lung injury in dogs. **Journal of Immunology** v.160, p.3031-3037, 1998.

PARKER, J.L. ;OLTMAN, C.L.; MULLER, J.M.; MYERS, P.R.; ADAMS, H.R.; LAUGHLIN, M.H. Effects of exercise training on regulation of tone in coronary arteries and arterioles. **Medicine and Science in Sports and Exercise** v.26, p.1252-1261, 1994.

PARRAT, J.R. Nitric Oxide in sepsis and endotoxaemia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v.41, Suppl. A, p.31-39, 1998.

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

PERSICHINI, T.; CANTONI, O.; SUZUKI, H.; COLASANTI, M.. Cross-talk between constitutive and inducible NO synthase: An update. **Antioxidants & Redox Signaling** v.8, n..5-6, p.949-954, 2006.

PETROS, A.; LAMB, G.;LEONO, A.; et al. Effects of a nitric oxide inhibitor in humans with septic shock. **Cardiovascular Research** v.28, p. 34-39, 1994.

PHENG, L.H.; FRANCOEUR, C.; DENIS, M. The involvement of nitric oxide in a mouse model of adult respiratory distress syndrome. **Inflammation** v.19, p.599-610, 1995.

PRICE, S.; EVANS, T.W.; MITCHELL, J.A. Nitric oxide supports atrial function in sepsis: relevance to side effects of inhibitors of shock. **European Journal of Pharmacology** v.449, p.279-285, 2002.

RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** v.87, p.10043-10047, 1990.

RANGEL-FRAUSTO, M.S.; PITTET, D.; COSTIGAN, M.; HWANG, T.; DAVIS, C.; WENZEL, R.P. The natural history of systemic inflammatory response syndrome (SIRS). **Journal of American Medical Association** v.273, p.117-123, 1995.

REES, D.D.; CELLEK, S.; PALMER, R.M.; MONCADA,S. Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone: an insight into endotoxin shock. **Biochemical and Biophysical Research Communication** v.173, n.2, p. 541-547, 1990.

RICCIARDOLO, F.L.M.; STERK, P.J.; GASTON, B.; FOLKERTS, G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. **Physiological Reviews** v.84, p.731-765, 2003.

ROBERTS, C. K. ; BARNARD, R. J. ; JASMAN, A.; BALON, T. W. Acute exercise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism** v.277, p.E390-E394, 1999.

ROBERTS, C. K.; BARNARD R. J.; SCHECK, S. H. ; BALON, T. W. Exercise-stimulated glucose transport in skeletal muscle is nitric oxide dependent. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism** v.273, n.36, p. E220-E225, 1997.

RUSSEL, J.C.; AMY, R.M.; MANICHAVAL, V.; DOLPHIN, P.J.; EPLING, W.F.; PIERCE, D.; BOER, D.P.. Prevention of myocardial disease in JCR: LA-corpulent rats by running. **Journal of Applied Physiology** v.66, p.1649-1655, 1989.

SCHAIBLE, T.F.; SCHEUER, J. Effects of physical training by running or swimming on ventricular performance of rat hearts. **Journal of Applied Physiology** v. 65, p. 116-123, 1979.

SCHULZ, R.; NAVA, E.; MONCADA, S. Induction and potential biological relevance of a Ca^{2+} independent nitric oxide synthase in the myocardium. **British Journal of Pharmacology** v.105, p.575-580, 1992.

SCHWARZ, P.; DIEM, R.; DUN, N.J.; FORSTERMANN, U. Endogenous and exogenous nitric oxide inhibits norepinephrine release from rat heart sympathetic nerves. **Circulation Research** v. 77, p.841-848, 1995.

SCOTT, J. A.; MEHTA, S. DUGGAN, M.; BIHARI, A., McCORMACK, D. Functional inhibition of constitutive nitric oxide synthase in a rat model of sepsis **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** v. 165, p. 1426-1432, 2002.

SCUMPIA, P.O.; SARCIA, P.J.; DEMARCO, V.G.; STEVENS, B.R.; SKIMMING, J.W. Hypothermia attenuates iNOS, CAT-1, CAT-2, and nitric oxide expression in lungs of endotoxemic rats. **American Journal of Physiology, Lung Cellular and Molecular Physiology** v.283, p.L1231-L1238, 2002.

SEARS, C.E.; ASHLEY, E. A.; CASADEI, B. Nitric oxide control in cardiac function: is neuronal nitric oxide a key component? **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Science** v. 359, p. 1021-1044, 2004.

SEARS, C.E.; CHOATE, J.K.; PATERSON, D.J. Effect of nitric oxide synthase inhibition on the symphato-vagal control of heart rate. **Journal of Autonomic Nervous system** v. 73, p.63-73, 1998.

SESSA, W.C.; PRITCHARD, K.; SEYED, N.; WANG, J.; HINTZE, T.H.; Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide synthase production and endothelial cell nitric oxide .synthase gene expression. **Circulation Research** v.74, p.349-353, 1994.

SHAPIRO, L. e GELFAND, J.A.; Cytokines and sepsis: pathology and therapy. **New Horizons** v.1, p.13-22, 1993.

SHARSHAR, T; GRAY, F; DE LA GRANDMAISON, G; HOPKINSON, NS; ROSS, E; DORANDEU, A; ORLIKOWSKI, D; RAPHAEL, J.C.; GAIDOS, P; ANNANE, D. Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock. **Lancet** v.362, n.9398,p. 1799-1805, 2003.

SHEN, F. M.; GUAN, Y. F.; XIE, H. H.; SU, D. F. Arterial Baroreflex function determines survival time in lipopolysaccharide induce shock in rats. **Shock** 21, n. 6, p. 556-560, 2004.

SHEN, F.M.; GUAN, Y.F.; XIE, H.H.; SU, D.F. Arterial baroreflex functiion determines survival time i lipopolysaccharide- induced shock in rats. **Shock**, v.21, p.556-560, 2004.

SHEPHARD, R.J., BALADY, G.J.. Exercise and cardiovascular therapy. **Circulation** v.99, p.963-972, 1999.

SHESELY, E. G.; MAEDA, N.; KIM, H.S.; DESAI, K.M.; KREGE, J.H.; LAUBACH, V.E.; SHERMAN, P.A.; SESSA, W.C.; SMITHIES, O. Elevated blood pressure in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America** v.93, n. 23, p. 13176-13181, 1996.

STONE, H.L.; DORMER, K.J.; FOREMAN, R. D.; THIES, R; BLAIR, R.W. Neural regulation of cardiovascular system during exercise. **Federation Proceedings** v.44; p.2271-2278, 1985.

STRUNK, V.; HAHNENKAMP, K. ; SCHMEUING, M.; FISCHER, L.G.; RICH, G. F. Selective inhibition prevents hypotension in septic rats while preserving endothelium-dependent vasodilation. **Anesthesia and Analgesia** v.92, p.681-687, 2001.

SU, C.H.; YANG, F.L.; CHEN, H.I. Inhibition of inducible nitric oxide synthase attenuates acute endotoxin-induced lung injury in rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** v.34, p.339-346, 2007

TATCHUM-TALOM, R. T.; SCHUTZ, R.; MCNEILL, J. R.; KHADOUR, F. H. Upregulation of neuronal nitric oxide synthase in skeletal muscle by swim training. **American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology** v.279, p.H1757-H1766, 2000.

THIERMERMANN, C.; VANE, J.R. Inhibition of nitric oxide synthesis reduces the hypotension induced by bacterial lipopolysaccharide in the rat. **European Journal of Pharmacology** v.182, p.591-595, 1990.

TIPTON C.M., SEBASTIAN L.A., OVERTON J.M., WOODMAN C.R., WILLIAMS S.B. Chronic exercise and its hemodynamic influences on resting blood pressure of hypertensive rats. **Journal of Applied Physiology** v.71, p.2206-2210, 1991.

UNNO, N; WANG, H; MENCONI, M.J. et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates endotoxin-induced gut mucosal barrier dysfunction in rats. **Gastroenterology** v.113, p.1246-1257, 1997.

VANHOUTTE, P.M. Endothelium –derived free radicals: for worse and for better. **Journal of Clinical Investigation** v. 107, n. 1, p. 23-25, 2001.

VARGAS, F.; SABIO, J.M.; LUNA, J.D. Contribution of endothelium derived relaxing factors to acetylcholine induced vasodilatation in the rat kidney. **Cardiovascular Research** v.28, p.1373-1377, 1994.

VASSILAKOPOULOS T.; DECKMAN G.; KEBBEWAR M.; RALLIS G.; HARFOUCHE R.; HUSSAIN S.N.A.. Regulation of nitric oxide production in limb and ventilatory muscles during chronic exercise training. **American Journal of Physiology, Lung Cellular Molecular Physiology** v.284, p.452-457, 2003.

VISINTIN, A.; MAZZONI, A.; SPITZER, J.A.; et al. Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to toll-like receptor 4. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America** v.98, p.12156-12161, 2001.

VONA-DAVIS, L.; WEARDEN, P.; HILL, J. HILL, R. Cardiac response to nitric oxide synthase inhibition using aminoguanidine in a rat model of endotoxemia. **Shock** v. 17, n. 5, p. 404-410, 2002.

WANG, H.; VISHNUBHAKAT, J.M.; BLOOM, O; et al. Proinflammatory cytokines (tumor necrosis factor and interleukin 1 β) stimulate release of high mobility group protein-1 by pituicytes. **Surgery** v.126, p.389-392, 1999.

WISLOFF, U.; LOENNECHEN, J.P.; FALCK, G.; BELSVAG, V.; CURRIE, S.; SMITH, G.; ELLINGSEN, O. Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. **Cardiovascular Research** v. 50; p.495-508, 2001.

WOLKOW, P.P. Involvement and dual effects of nitric oxide in septic shock. **Inflammation Research** v.47, p.152-166, 1998.

WRIGHT, S.D. CD14 and innate recognition of bacteria. **Journal of Immunology** v.155, p. 6-8, 1995.

YAMASHITA, T.; KAWASHIMA, S.; OHASHI, Y.; OZAKI, M.; UEYAMA, T.; ISHIDA, T.; INOUE, N.; HIRATA, K.I.; AKITA, H.; YOKOYAMA, M. Resistance to endotoxin shock in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. **Circulation** v.101, p.931-937, 2000.

YANG, A.L.; TSAI, S.J.; JIANG, M.J.; JEN, C.J.; CHEN, H.I. Chronic exercise increases both inducible and endothelial nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells of rat aorta. **Journal of Biomedical Science** v.9, p.149-155, 2002.

YANG, A.L; CHEN, H.I.. Chronic exercise reduces adhesion molecules/iNOS expression and partially reverses vascular responsiveness in hypercholesterolemic rabbit aortae. **Atherosclerosis** v.169, p.11-17, 2003.

ZHENG, H.; LI, Y.F.; CORNISH, K.G.; ZUCKER, I.H.; PATEL, K.P. Exercise training improves endogenous nitric oxide mechanisms within the paraventricular nucleus in rats with heart failure. **American Journal of Physiology, Heart Circulatory Physiology** v.288, p.H2332-2341, 2005.

ANEXO
ARTIGO PUBLICADO

Available online at www.sciencedirect.com

Life Sciences 81 (2007) 1301–1308

Life Sciences

www.elsevier.com/locate/lifescie

Cardiovascular and pulmonary effects of NOS inhibition in endotoxemic conscious rats subjected to swimming training

Aida Mehanna^a, Daniele Cristina Vitorino^a, Carolina Panis^b, Eleonora Elisia Abra Blanco^a,
Phileno Pinge-Filho^b, Marli Cardoso Martins-Pinge^{a,*}

^a Department of Physiological Sciences, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil^b Pathological Sciences, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

Received 8 March 2007; accepted 12 September 2007

Abstract

Sepsis is characterized by systemic hypotension, hyporeactivity to vasoconstrictors, impaired tissue perfusion, and multiple organ failure. During exercise training (ET), dynamic cardiovascular adjustments take place to maintain proper blood pressure and adjust blood supply to different vascular beds. The aim of this study was to investigate whether ET protects against the cardiovascular abnormalities induced by LPS, a model of experimental endotoxemia, and to evaluate the role of nitric oxide (NO) in pulmonary edema.

Wistar rats were subjected to swimming training (up to 1 h/day, 5 days/week for 4 weeks) after which their femoral artery and vein were catheterized. LPS (5 mg/kg, i.v.), injected in control (C) and trained animals (ET), promoted 3 distinct phases in mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR). After ET the alterations in MAP were attenuated. The ET animals showed a lower pulmonary edema index (PEI) after LPS ($C=0.65 \pm 0.01$; $ET=0.60 \pm 0.02$), which was attenuated after treatment with aminoguanidine in both groups ($C=0.53 \pm 0.02$; $ET=0.53 \pm 0.02$, $p < 0.05$). After L-NAME, PEI was enhanced numerically in the C and was statistically higher in the ET group ($C=0.73 \pm 0.05$; $ET=1.30 \pm 0.3$, $p < 0.05$). 7-nitroindazole did not promote any alteration in either group.

The adaptations promoted by ET seem to be beneficial, counteracting the cardiovascular abnormalities and pulmonary edema seen in septicemia induced by LPS. The results suggest that iNOS aggravates and cNOS protects against this pulmonary edema.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Pulmonary edema; L-NAME; Aminoguanidine; Arterial pressure; Exercise training

Introduction

Sepsis is associated with profound cardiovascular abnormalities characterized by hypotension, decreased systemic vascular resistance, increased cardiac output, altered vascular reactivity to contractile agents, and a high mortality rate (Parrilo, 1993). Cardiovascular abnormality in severe sepsis is a secondary effect derived of the release of various inflammatory mediators that include nitric oxide (NO).

NO, a multifunctional second messenger with numerous biological functions, is synthesized from L-arginine by a group of hemoproteins known as nitric oxide synthases (NOS). To date, three isoforms of NOS have been identified. Neuronal NOS (nNOS, NOS I) and endothelial NOS (eNOS, NOS III) are calcium-dependent isoforms that are expressed constitutively under physiological conditions (Moncada and Higgs, 1993). In contrast, the activity of NOS II (iNOS), the expression of which is induced by immunological stimuli, is calcium independent (Moncada and Higgs, 1993). Other reports suggest the presence of a mitochondrial isoform of NOS with characteristics intermediate between constitutive (cNOS) and inducible NOS (Giulivi et al., 1998).

The iNOS isoform can be stimulated in inflammatory conditions (Szabo et al., 1995; Camussi et al., 1998; Lee et al., 2002). The sources of iNOS may be endothelial cells,

* Corresponding author. Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380, Campus Universitário, CEP 86055-900 Londrina, PR, Brazil. Tel.: +55 43 3371 4307; fax: +55 43 3371 4407.

E-mail addresses: martinspinge@uel.br, pinge@sercomtel.com.br (M.C. Martins-Pinge).

epithelial cells, macrophages, neutrophils, vascular smooth muscle and fibroblasts (Kengathavan et al., 1996; Wang et al., 1999; Lee et al., 2002; Kao et al., 2004). It has been shown that synthesis of iNOS leads to production of NO and free radicals, resulting in systemic hypotension and tissue injury in septicemia (Kirkeboen and Strand, 1999; Vanhoutte, 2001; Chen et al., 2003). NO from iNOS may cause myocardial dysfunction and thus contribute to systemic hypotension and shock (Herberstson et al., 1996, 1997; Suffredini, 1998). iNOS activation is also involved in pulmonary edema induced by endotoxemia (Wang et al., 1999).

It is generally accepted that NO contributes significantly to the key pathophysiologic features of acute lung injury (ALI), such as protein-rich pulmonary edema, oxidative stress, and surfactant dysfunction. Many authors have reported that increased iNOS activity mediates microvascular injury and protein-rich pulmonary edema in a variety of animal models of ALI, such as endotoxemia induced by lipopolysaccharide (LPS) administration (Laszlo et al., 1995; Pheng et al., 1995; Li et al., 1998; Numata et al., 1998; Scumpia et al., 2002; Koizumi et al., 2004). On the other hand, the role of cNOS in sepsis seems controversial, as L-NAME can inhibit the increase in exhaled NO from the lungs of septic rats, but does not reduce lung inflammation, and may even worsen it (Aaron et al., 1998).

An appreciable number of experimental studies have shown that cNOS and iNOS are inversely regulated, either in a cell or in tissues. In this respect, it has been noted that many compounds that either stimulate the catalytic activity of cNOS, or upregulate the expression of the enzyme, are reported to act as downregulators, or suppressors, of iNOS expression (Colasanti and Suzuki, 2000; Mariotto et al., 2004; Persichini et al., 2006). In a recent study (Comini et al., 2005), it was observed that nNOS and eNOS in cardiac myocytes were downregulated in response to LPS treatment, while iNOS was upregulated. The cytosolic calcium seems to be affected by LPS, but probably not through endogenous NO production. The study suggests that all NO isoforms are altered by endotoxemia and in different ways. It is well known that regular exercise has protective effects against cardiovascular diseases (Russel et al., 1989; Tipton et al., 1991; Shephard and Balady, 1999). One possible underlying mechanism for this is the alteration of endothelium-dependent vascular responses in favor of vasorelaxation. Indeed, previous studies have demonstrated that chronic exercise increases Ach-induced endothelium-dependent vasorelaxation and decreases norepinephrine-induced vasoconstriction by increasing NO production (Chen and Li, 1993; Delp et al., 1993; Parker et al., 1994; Chen et al., 1994, 1996).

Exercise has been implicated as an important factor in the upregulation of both eNOS (Sessa et al., 1994) and nNOS (Mohan et al., 2000) expression. Alongside this, various patterns of iNOS expression have been observed: a decrease in the iNOS activation in rabbit aortae by 8 weeks of treadmill exercise training (Yang and Chen, 2003), no change in limb and ventilatory muscles after 4 weeks of treadmill training (Vassilakopoulos et al., 2003) or even an increase in iNOS in endothelial cells of rat aorta after 10 weeks of running (Yang et al., 2002). The fact is that the NO metabolism in the exercised

subjects seems to be altered. The actual change may depend on the kind or intensity of exercise and may contribute to the cardiovascular conditioning due to exercise training. In a very recent paper (Chen et al., 2007), the septic responses to exercise training were evaluated in conscious rats. However, the involvement of nitric oxide after exercise training in cardiovascular and pulmonary effects induced by endotoxemia has still not been evaluated.

The aim of our study is to investigate a possible protective mechanism promoted by exercise training against the cardiovascular and pulmonary effects induced by endotoxemia in conscious rats, and to evaluate how nitric oxide from constitutive, neuronal and inducible pathways (cNOS, nNOS and iNOS) participates in pulmonary edema in this model. Our model of exercise training is swimming, which promotes bradycardia as an index of effective adaptation by exercise training (Martins-Pinge et al., 2005).

Materials and methods

Animal care

All experiments were performed in conscious, freely moving, adult male Wistar rats ($n=86$) supplied by the central animal house of the State University of Londrina in Brazil. The animals were housed individually in Perspex cages in a room with a 12:12-hour light/dark cycle. Food and water were freely available at all times, except during the experiments. All experimental protocols were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Ethical Principles for Animal Experimentation established by the Brazilian Committee for Animal Experimentation (COBEA) and were approved by the animal experimentation Ethics Committee of the State University of Londrina (CEEA/UDEL).

Swimming training

The weight of the rats at the start of the training was between 210 and 230 g. Control and training rat groups were matched in weight, but after training, the body weights of control and trained rats were statistically different, showing a reduced weight gain in trained rats (Fig. 1). The swimming training (ST) was performed

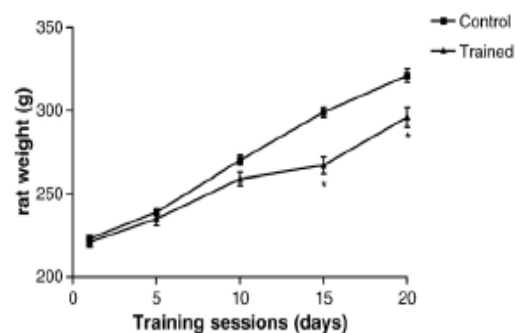


Fig. 1. Time-course of changes in body weight of control and swimming training rats. *Different from control group ($p < 0.05$).

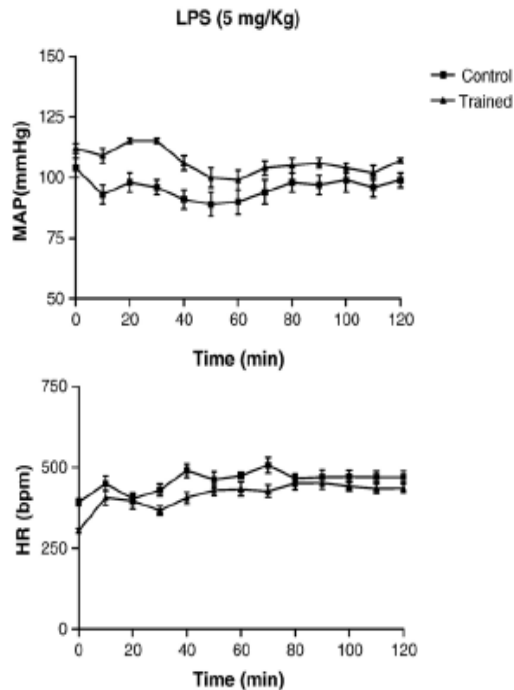


Fig. 2. Time-course of changes in mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) after i.v. injection of LPS in control ($n=9$) or trained ($n=11$) conscious rats.

at the same time every day (between 11:00 a.m. and 1:00 p.m.) in a glass tank with vertical sides filled with lukewarm water ($31 \pm 1^\circ\text{C}$) of 4000 cm^2 surface and 60 cm depth. The ST consisted of twenty swimming sessions of up to one hour (5 days a week for 4 weeks). During the first week, the training was graded, beginning with 15 min on the first day, rising to 60 min on the last day, as previously described (Martins-Pinge et al., 2005).

Animal preparation

Twenty-four hours before the experiments, under anesthesia (sodium pentobarbital, 40 mg/kg IP), the femoral artery and vein were cannulated, and the catheters were dorsally externalized to record arterial pressure (AP) and drug administration, respectively, in a conscious rat preparation. On the day of the experiment, the animals were kept in their cages, and basal recordings were taken for at least 30 min. The mean arterial blood pressure (MAP) and heart rate (HR), were recorded by a MLT0380 blood pressure transducer connected to a Powerlab system 4/20 T (ADInstruments).

Experimental protocol

After the basal recording, a dose of 5 mg/kg of lipopolysaccharides (LPS) of *Escherichia coli* (Serotype 026:B6) was administered as a bolus injection (i.v.). The cardiovascular effects of endotoxin were analysed for two hours in control (C) and exercise training (ET) rats. Rats were pretreated by infusion with an iNOS inhibitor, aminoguanidine (Amg, 20 mg/kg), a cNOS inhibitor, N^G -Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME,

20 mg/kg) an nNOS inhibitor, 7-nitroindazole (7NI, 8 mg/kg) or physiological saline, 10 min before the LPS injection. The choice of dose for the NOS inhibitors was based on previous studies (Gardiner et al., 1990; Zagvazdin et al., 1996). The rats were observed until 5 h after LPS injection, when they were sacrificed with an overdose of sodium pentobarbital.

Pulmonary edema index and lung weight gain

After a thoracotomy, the chest was opened and the lungs removed and weighed. The pulmonary edema index (PEI) was calculated as: $\text{PEI} = \text{LW}/\text{BW} \times 100$, where LW is lung weight, BW is body weight.

Lung weight gain (LWG) was calculated as follows:

$$\text{LWG} = (\text{final LW} - \text{initial LW})/\text{initial LW}.$$

Final lung weight was determined after the experiments had finished. The initial lung weight was estimated from an equation relating it to body weight (Lee et al., 2001), as follows. BW and LW were measured in 30 rats killed by decapitation. The LW values were then plotted against BW to obtain the following regression equation:

$$\text{LW}(\text{g}) = 0.0015 \times \text{BW}(\text{g}) + 0.034.\text{g}$$

Examination of plasma TNF- α

Blood samples (1.5 mL) were taken before and 2 h after the administration of LPS, or LPS+L-NAME. Blood was

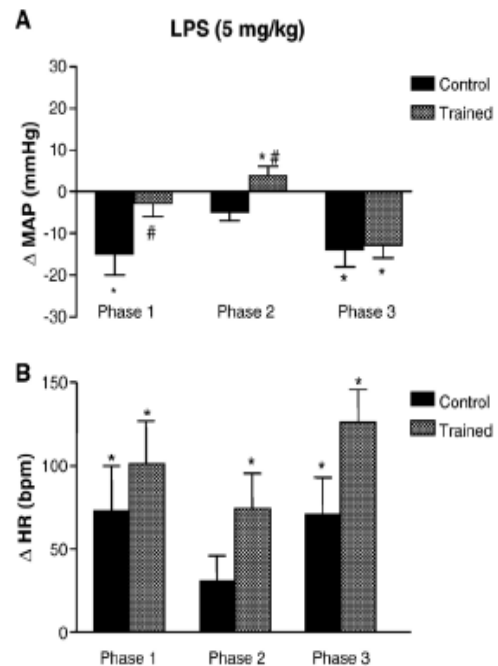


Fig. 3. Changes in mean arterial pressure (MAP) (A) and heart rate (HR) (B) after LPS injection in control ($n=9$) and trained rats ($n=11$). Phase 1=5 min; phase 2=25 min; phase 3=50 min. *Different from baseline ($p<0.05$). #Different from control group ($p<0.05$).

centrifuged at $4500 \times g$ for 10 min. The supernatant was used for measurement of TNF- α by antibody enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using a commercial antibody pair, recombinant standards and an avidin–peroxidase detection system (Invitrogen, Carlsbad, CA). All reagents, samples and working standards were prepared according to the manufacturer's instructions. The optical density was measured at 405 nm with an automated ELISA reader.

Drugs

Just before infusion, all drugs were dissolved in physiological saline, with the exception of 7NI, which was diluted in DMSO. Sodium pentobarbital, aminoguanidine, L-NAME, 7-nitroindazole and LPS were obtained from Sigma Chemical Co.

Data analysis

All data are reported as mean \pm SEM. Differences related to group and time were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni's test. Student's *t* test was used to compare the effects in different groups. The criterion for statistical significance was $p < 0.05$.

Results

The baseline values for mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) for each group were taken as the mean value of the period of basal recording (± 30 min) for each animal. In the C group, the baseline values were: MAP: 105 ± 2 mm Hg; HR: 371 ± 8 bpm ($n = 9$). In the ET group, the baseline values were: MAP: 115 ± 1 mm Hg; HR: 294 ± 8 bpm ($n = 11$). Our data

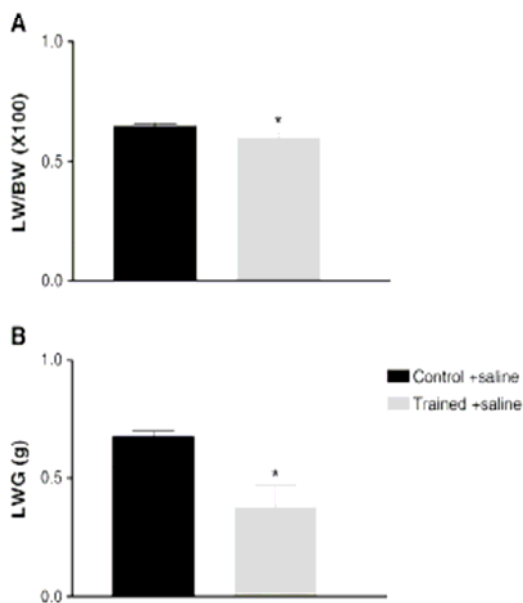


Fig. 4. Bar graphs showing the pulmonary edema index (lung weight/body weight $\times 100$) (A) and lung weight gain (LWG) (B) 5 h after LPS injection in control ($n = 6$) and trained rats ($n = 5$). *Different from the control ($p < 0.05$).

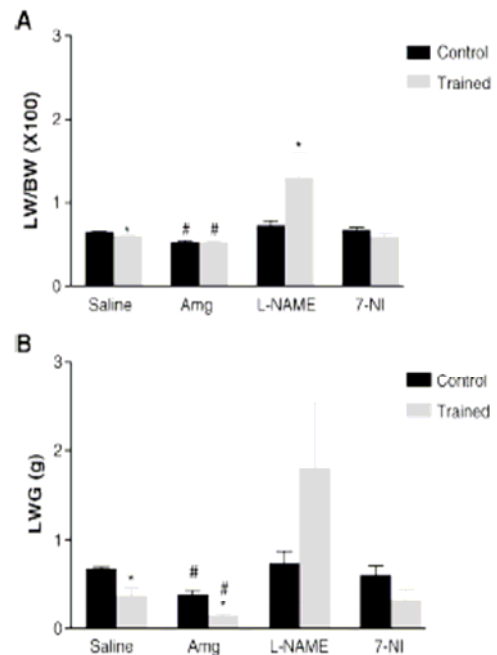


Fig. 5. Bar graphs showing the pulmonary edema index (lung weight/body weight $\times 100$) (A) and lung weight gain (LWG) (B) 5 h after LPS injection in saline control and trained rats (C: $n = 6$; T: $n = 5$), pretreated with L-NAME (20 mg/kg) (C: $n = 13$; T: $n = 11$), or aminoguanidine (Amg, 20 mg/kg) (C: $n = 9$; T: $n = 6$), or 7-nitroindazole (7-NI, 8 mg/kg) (C: $n = 7$; T: $n = 5$). *Different from the control ($p < 0.05$). #Different from the saline groups ($p < 0.05$).

shows a bradycardia for the ET group, relative to the control group ($p < 0.05$). These data, together with the lower body weight gain of the trained group (Fig. 1), indicate the effectiveness of the ST as exercise training.

The cardiovascular effects promoted by LPS injection in control and trained rats are shown in Fig. 2. After LPS injection, we observed 3 distinct phases in arterial pressure parameters during the first two hours: an initial decrease in MAP (phase 1); a rebound recovery in MAP (phase 2) and a second long-lasting decrease in MAP (phase 3). After ET, we observed a similar pattern, although the alterations in MAP were attenuated in phases 1 and 2. In the HR data, tachycardia was observed in both groups after LPS and it was not statistically different between C and ET rats. The peak in MAP and HR responses observed in the 3 phases after LPS are shown in Fig. 3.

Pulmonary edema was one of the alterations promoted by injection of LPS in C and in ET rats. However, the pulmonary edema index (PEI) and the lung weight gain (LWG) of ET rats were statistically lower (CPEI: 0.65 ± 0.01 , TPEI: 0.60 ± 0.02 , $p < 0.05$; CLWG: 0.68 ± 0.02 , TLWG: 0.38 ± 0.09 , $p < 0.05$; Fig. 4). Pretreatment with aminoguanidine, an iNOS inhibitor, led to a decrease in the PEI and LWG of both groups, in comparison with rats untreated with Amg (Fig. 5). After iNOS blockade, the PEI and LWG values were attenuated in C and ET groups, suggesting a role of iNOS in pulmonary edema in both situations.

The pretreatment with L-NAME did not modify the pulmonary edema in the control group, compared with the

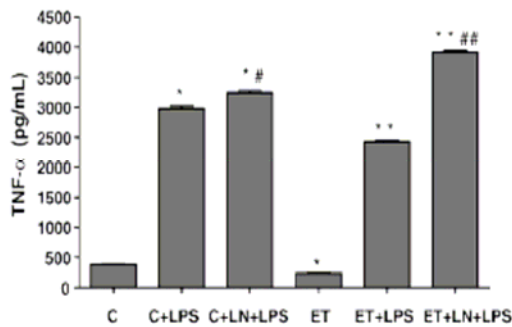


Fig. 6. Plasma TNF- α concentrations in various groups in basal conditions (Control: C, Exercise training: ET) or 2 h after LPS administration. LN=L-NAME. Values represent the means \pm SEM and are representative of two independent experiments, using 4 rats per group. Differences in TNF- α levels were analysed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test. * = different from C group; # = different from C+LPS group; ** = different from ET group; ## = different from ET+LPS group ($p < 0.01$).

saline-treated control. However, in the pretreated ET group, PEI was statistically higher than in the control group treated with L-NAME (Fig. 5). These effects suggest a protective role of cNOS in pulmonary edema in the trained rats.

Infusion of 7NI before LPS did not modify PEI, in control or in trained rats (Fig. 5), suggesting that nNOS may not participate in pulmonary edema induced by LPS.

Injection of LPS increased plasma concentration of TNF- α in the control group to 2980 ± 41 pg/mL at 2 h. In the ET group LPS also promoted an increase in TNF- α , but of lower magnitude: 2434 ± 16 pg/mL ($p < 0.01$). Pretreatment with L-NAME enhanced the LPS-induced changes in the TNF- α concentration in both groups, but the effect was higher in the ET group (Fig. 6).

Discussion

It is widely accepted that endotoxin produces multiple organ failure, which is a frequent cause of death among patients who succumb to endotoxic shock. In several experimental models, endotoxin has been shown to increase the release of nitric oxide by endothelium and the activity of iNOS (Kilbourn, 1998). Nitric oxide, produced in copious amounts by iNOS (Schulz et al., 1992), may contribute significantly to the deleterious effects of endotoxin such as hypotension (Thiermermann and Vane, 1990), vascular unresponsiveness (Julou-Schaeffer et al., 1990; Guc et al., 1990), cardiodepression (Rangel-Frausto et al., 1995), organ injury and dysfunction in septic shock (Iskit et al., 1999).

Published work has shown that all isoforms of NOS are present in the respiratory tract (Asano et al., 1994). The eNOS isoform is localized in the endothelial cells of pulmonary blood vessels, nNOS in the airway nerves of humans and animals and iNOS in many cell types, including macrophages, alveolar type II epithelial cells, mast cells, endothelial cells, neutrophils and condrocytes (Ricciardolo et al., 2003). The isoforms may work cooperatively to regulate airway smooth muscle tone and immune/inflammatory responses.

Our data indicated that exercise training is beneficial, buffering the cardiovascular abnormalities promoted by LPS injection, a model of endotoxemia. One of the advantages of our work was the use of a conscious animal preparation, which provided an evaluation without the interference of anesthesia. The literature has shown that the use of anesthesia reduces the survival time of animals subjected to septic shock (Shen et al., 2004). Also, the use of anesthesia seems to be associated with alterations in iNOS mRNA levels in the lung (Martinez et al., 2000).

The blood pressure effects after LPS administration (i.v.) in conscious rats, have been observed by others (Lin et al., 2006). Our data showed three distinct phases in MAP in control and trained rats after LPS and we observed an attenuated hypotensive response in the ET group. A similar result was obtained in a recent study (Chen et al., 2007) in which rats were trained on a treadmill. That study also showed an ET-promoted attenuation in plasma nitrite/nitrate and pro-inflammatory cytokines.

Nitric oxide has been studied in many aspects of biological systems. It has been shown that exercise training increases eNOS expression in many tissues (Sessa et al., 1994; McAllister and Laughlin, 2006). Other studies have pointed to an influence on several pathologies, which can be benefited by an increase in NO observed after exercise training. In most studies, the increase of NO after exercise training is related to an increase in the activity of eNOS and/or nNOS isoforms (Husain, 2004; Zheng et al., 2005). Consistently with our study, swimming training for 4 weeks promoted an increase in nNOS protein expression in the left quadriceps femoris muscle of rats (Tatchum-Talom et al., 2000). However, increased iNOS activity after exercise training was also observed in basal conditions (Lu et al., 1999; Yang et al., 2002).

In the present study, we analyzed the pulmonary edema as an effect of endotoxemia and the participation of inducible and constitutive pathways for nitric oxide production, in C and ET groups of rats. The choice of dose for LPS was based on a previous study where 5 mg/kg promoted a significant increase in the pulmonary edema index (PEI) (Lee et al., 2001). Our data suggest that iNOS blockade is important in the reduction of PEI in conscious rats, at least in the early phase. Although we did not observe any difference in PEI between C and ET animals when aminoguanidine was used, LWG was decreased by aminoguanidine more strongly in ET animals. Our data, together with others in the literature, pointed to iNOS as an important mediator of acute endotoxin-induced pulmonary edema. On the other hand, cNOS seems to protect the lung against edema, as there was an increase in PEI after L-NAME in the trained group, and a numerical increase in the control group. Also, we did not observe any effect after 7NI administration before LPS in any of the groups, suggesting that nNOS does not participate in the LPS-induced pulmonary edema. In addition, we may speculate that the cNOS blockade promoted by L-NAME could be more related to eNOS blockade than nNOS. Although in our study we did not measure eNOS expression in the lungs, it is possible that the differential effect of L-NAME on the PEI of trained rats may be related with an increased

production of nitric oxide by eNOS in these animals, in basal conditions. In fact, it was also observed after short-term exercise training, an increase in eNOS protein expression in pulmonary arterial tissue (Johnson et al., 2001).

Our study demonstrated that 2 h after LPS administration, the plasma TNF- α increased in both C and ET groups, but was lower in the ET group. Our data also showed that LPS-induced changes in plasma TNF- α are increased by L-NAME, and this effect is enhanced in the ET rats. The possible implication of these findings is that pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , may precede iNOS activation under septic conditions. After eNOS inhibition, more TNF is produced, and in this way more iNOS could be activated. It is possible that ET may influence many aspects of endotoxemia through anti-inflammatory actions and nitric oxide from eNOS seems to have a role.

It is possible that in the exercised rats, this protection by eNOS may be the feature of exercise training that protects against pulmonary edema. The literature has shown that exercise training increases eNOS expression in many tissues (Vassilakopoulos et al., 2003; Laughlin et al., 2004; Green et al., 2004). Our data with L-NAME in exercise-trained rats are in line with the upregulation of eNOS in the lungs by ET. The reason for this effect is still unknown, but in another study with transgenic conscious mice with overexpression of eNOS, similar results were observed after LPS injection (Yamashita et al., 2000), when the authors attributed the inhibition of thrombus formation in microvessels to overproduced NO from the endothelium.

Our data regarding the role of iNOS in pulmonary edema induced by sepsis are in accordance with the literature, where it has been suggested that many aspects of lung injury are improved by iNOS inhibitors and the effects of sepsis are aggravated by eNOS inhibitors, such as L-NAME (Mehta, 2005). However, the literature has also shown an attenuation of pulmonary edema and exhaled NO in isolated and *in vivo* blood-perfused lungs after treatment with aminoguanidine and L-NAME (Lee et al., 2001) or in conscious rats after L-NAME (Liu et al., 2007). The discrepancy with our data may be due to the use of anesthesia, which is known to activate the iNOS pathway (Losonczy et al., 1997) or, in the case of conscious rats, the different doses of LPS and L-NAME utilized (Liu et al., 2007).

Inhibition of eNOS may, however, elicit side effects on the pulmonary vasculature. Increased pulmonary artery pressure after inhibition of eNOS have been demonstrated in various experimental models (Meyer et al., 1994; Hinder et al., 1998, 1999). These increases may also affect the pulmonary fluid balance. Although we cannot rule the possibility that L-NAME increases pulmonary pressure, the increase in PEI was observed only in the trained group, suggesting that its effect may be related not only to pulmonary vascular tone.

The time after LPS when we observed the alterations in PEI are in line with the literature, as it has been demonstrated that iNOS mRNA expression after LPS in conscious rats reached a peak in heart, lungs, spleen and liver between 3 and 6 h and reverted to basal level within 24 h (Lin et al., 2006).

In summary, the cardiopulmonary adaptations promoted by ET seem to be beneficial, counteracting the abnormalities seen in the early phase of septicemia induced by LPS, and constitutive NO

seems to participate in this process. This study provides for the first time the roles of NOS enzymes in pulmonary edema in endotoxemic rats and preventive effects of exercise training. For this purpose we used different NOS inhibitors as pharmacological tools and although we had used low concentrations of the inhibitors to guarantee selectively, we believe that it would be important to analyze NOS expression in the tissues during endotoxemia in control and trained animals to better elucidate the phenomenon. Further studies need to be done to reach this goal.

References

- Aaron, S.D., Valenza, F., Volgyesi, G., Mullen, J.B., Slutsky, A.S., Stewart, T.E., 1998. Inhibition of exhaled nitric oxide production during sepsis does not prevent lung inflammation. *Critical Care Medicine* 26, 309–314.
- Asano, K., Chee, C.B.E., Gaston, B., Lilly, C.M., Gerard, C., Drazen, J.M., Stamler, J.S., 1994. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation and activity in human lung epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 10089–10093.
- Camussi, G., Ronco, C., Montrucchio, G., Piccole, G., 1998. Role of soluble mediators in sepsis and renal failure. *Kidney International. Supplement* 66, S38–S42.
- Chen, H.I., Li, H.T., 1993. Physical conditioning can modulate endothelium-dependent vasorelaxation in rabbits. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 13, 852–856.
- Chen, H.I., Li, H.T., Chen, C.C., 1994. Physical conditioning decreases norepinephrine-induced vasoconstriction in rabbits: possible roles of norepinephrine-evoked endothelium-derived relaxing factor. *Circulation* 90, 970–975.
- Chen, H.I., Chiang, I.P., Jen, C.J., 1996. Exercise training increases acetylcholine-stimulated endothelium-derived nitric oxide release in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Biomedical Science* 3, 454–460.
- Chen, H.I., Kao, S.J., Wang, D., Lee, R.P., Su, C.F., 2003. Acute distress syndrome. *Journal of Biomedical Science* 10, 588–592.
- Chen, H.I., Hsieh, S.Y., Yang, F.L., Hsu, Y.H., Lin, C.C., 2007. Exercise training attenuates septic responses in conscious rats. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 39 (3), 435–442.
- Colasanti, M., Suzuki, H., 2000. The dual personality of NO. *Trends in Pharmacological Sciences* 21, 249–252.
- Comini, L., Boraso, A., Bachetti, T., Bernocchi, P., Pasini, E., Bastianon, D., Curello, S., Terracciano, C.M., Ceconi, C., Ferrari, R., 2005. Effects of endotoxic shock on neuronal NOS and calcium transients in rat cardiac myocytes. *Pharmacological Research* 51, 409–417.
- Delp, M.D., McAllister, R.M., Laughlin, M.H., 1993. Exercise training alters endothelium-dependent vasoreactivity of rat abdominal aorta. *Journal of Applied Physiology* 75, 1354–1363.
- Gardiner, S.M., Campton, A.M., Kemp, P.A., Bennett, B.S., 1990. Regional and cardiac haemodynamic effects of N^G -nitro-L-arginine methyl ester in conscious Long Evans rats. *British Journal of Pharmacology* 101, 625–631.
- Giulivi, C., Poderoso, J.J., Boveris, A., 1998. Production of nitric oxide by mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 273, 11038–11043.
- Green, D.J., Maiorana, A., O'Driscoll, G., Taylor, R., 2004. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *Journal of Physiology* 561, 1–25.
- Gue, M.O., Furman, B.L., Parratt, J.R., 1990. Endotoxin-induced impairment of vasodepressor responses in the pithed rat. *British Journal of Pharmacology* 101, 913–919.
- Herberstson, M.J., Wemer, H.A., Walley, K.R., 1996. Nitric oxide inhibition partially prevents decreased LV contractility during endotoxemia. *American Journal of Physiology* 270, H1979–H1984.
- Herberstson, M.J., Wemer, H.A., Walley, K.R., 1997. Platelet-activation factor antagonism improves ventricular contractility in endotoxemia. *Critical Care Medicine* 25, 221–226.
- Hinder, F., Meyer, J., Booke, M., Ehardt, J.S., Salisbury, J.R., Traber, L.D., Traber, D.L., 1998. Endogenous NO and the pulmonary microvasculature in healthy sheep and during systemic inflammation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 157, 1542–1549.

- Hinder, F., Stubbe, H.D., Aken, H.V., Waurick, R., Booke, M., Meyer, J., 1999. Role of nitric oxide in sepsis-associated pulmonary edema. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 159, 252–257.
- Husain, K., 2004. Physical conditioning modulates rat cardiac vascular endothelial growth factor gene expression in nitric oxide-deficient hypertension. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320, 1169–1174.
- Iskit, A.B., Sungur, A., Gedikoglu, G., Guc, M.O., 1999. The effects of bosentan, aminoguanidine and L-canavanine on mesenteric blood flow, spleen and liver in endotoxaemic mice. *European Journal of Pharmacology* 379, 73–80.
- Johnson, L.R., Rush, J.W.E., Turk, J.R., Price, E.M., Laughlin, M.H., 2001. Short-term exercise training increases Ach-induced relaxation and eNOS protein in porcine pulmonary arteries. *Journal of Applied Physiology* 90, 1102–1110.
- Julou-Schaeffer, G., Gray, G.A., Fleming, I., Schott, C., Parratt, J.R., Stoclet, J. C., 1990. Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-arginine pathway. *American Journal of Physiology* 259, H1038–H1043.
- Kao, S.J., Yang, F.L., Hsu, Y.H., Chen, H.I., 2004. Mechanism of pulmonary edema caused by enterovirus 71. *Clinical Infectious Diseases* 38, 1784–1788.
- Kengathavan, K.M., De Kinpe, S.J., Thiernemann, C., 1996. Role of nitric oxide in the circulatory failure and organ injury of a rodent model of gram-positive shock. *British Journal of Pharmacology* 119, 1411–1421.
- Kilbom, R., 1998. The discovery of nitric oxide as key mediator in septic shock. *Sepsis* 1, 85–91.
- Kirkeboen, K.A., Strand, O.A., 1999. The role of nitric oxide in sepsis: an overview. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 43, 275–288.
- Koizumi, T., Ogasawara, H., Yamamoto, H., Tsushima, K., Ruan, Z., Jian, M., Fujimoto, K., Kubo, K., 2004. Effect of ONO1714, a specific inducible nitric oxide synthase inhibitor, on lung lymph filtration and gas exchange during endotoxemia in unanesthetized sheep. *Anesthesiology* 101, 59–65.
- Laszlo, F., Whittle, B.J., Evans, S.M., Moncada, S., 1995. Association of microvascular leakage with induction of nitric oxide synthase: effects of nitric oxide synthase inhibitors in various organs. *European Journal of Pharmacology* 283, 47–53.
- Laughlin, M.H., Woodman, C.R., Schrage, W.G., Gute, D., Price, E.M., 2004. Interval sprint training enhances endothelial function and eNOS content in some arteries that perfuse white gastrocnemius muscle. *Journal of Applied Physiology* 96, 233–244.
- Lee, R.P., Wang, D., Kao, S.J., Chen, H.I., 2001. The lung is the major site that produces nitric oxide to induce acute pulmonary oedema in endotoxin. *Shock* 28, 315–320.
- Lee, R.P., Wang, D., Lin, N.T., Chen, H.I., 2002. Physiological and chemical indicators for early and late stages of sepsis in conscious rats. *Journal of Biomedical Science* 9, 613–621.
- Li, X.Y., Donaldson, K., Macnee, W., 1998. Lipopolysaccharide-induced alveolar epithelial permeability — the role of nitric oxide. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine* 157, 1027–1033.
- Lin, N.T., Yang, F.L., Lee, R.P., Peng, T.C., Chen, H.I., 2006. Inducible nitric oxide synthase mediates cytokine release: the time course in conscious and septic rats. *Life Sciences* 78, 1038–1043.
- Liu, D.D., Hsu, Y.H., Chen, H.I., 2007. Endotoxin-induced acute lung injury is enhanced in rats with spontaneous hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 34, 61–69.
- Losonczy, G., Bloch, J.F., Samsell, L., Schoenl, M., Venuto, R., Baylis, C., 1997. Impact of surgery on nitric oxide in rats: evidence for activation of inducible nitric oxide synthase. *Kidney International* 51, 1943–1949.
- Lu, Q., Ceddia, M.A., Price, E.A., Ye, S.M., Woods, J.A., 1999. Chronic exercise increases macrophage-mediated tumor cytotoxicity in young and old mice. *American Journal of Physiology* 276, R482–R489.
- Mariotto, S., Menegazzi, M., Suzuki, H., 2004. Biochemical aspects of nitric oxide. *Current Pharmaceutical Design* 10, 1627–1645.
- Martínez, F.E., Harabor, A., Amankwah, E.K., Hart, D.A., Belik, J., 2000. Urethane suppresses rat lung inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase mRNA levels. *Inflammation Research* 49, 727–731.
- Martins-Pinge, M.C., Becker, L.K., Garcia, M.R.L., Zoccal, D.B., Neto, R.V., Basso, L.S., Souza, H.C.D., Lopes, O.U., 2005. Attenuated pressor responses to amino acids in the rostral ventrolateral medulla after swimming training in conscious rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 112, 21–28.
- McAllister, R.M., Laughlin, M.H., 2006. Vascular nitric oxide: effects of physical activity, importance for health. *Essays in Biochemistry* 42, 119–131.
- Mehta, S., 2005. The effects of nitric oxide in acute lung injury. *Vascular Pharmacology* 43, 390–403.
- Meyer, J., Lentz, C.W., Stothert, J.C., Traber, L.D., Hemdon, D.N., Traber, D.L., 1994. Effects of nitric oxide synthesis inhibition in hyperdynamic endotoxemia. *Critical Care Medicine* 22, 306–312.
- Mohan, R.M., Choate, J.K., Golding, S., Herring, N., Casadei, B., Paterson, D. J., 2000. Peripheral pre-synaptic pathway reduces the heart rate response to sympathetic activation following exercise training: role of NO. *Cardiovascular Research* 47, 90–98.
- Moncada, S., Higgs, A., 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *New England Journal of Medicine* 329, 2002–2012.
- Numata, M., Suzuki, S., Miyazawa, N., Miyashita, A., Nagashima, Y., Inoue, S., Kaneko, T., Okubo, T., 1998. Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents LPS-induced acute lung injury in dogs. *Journal of Immunology* 160, 3031–3037.
- Parker, J.L., Oltman, C.L., Muller, J.M., Myers, P.R., Adams, H.R., Laughlin, M.H., 1994. Effects of exercise training on regulation of tone in coronary arteries and arterioles. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 26, 1252–1261.
- Pamilo, J.E., 1993. Pathogenic mechanisms of septic shock. *New England Journal of Medicine* 328, 1471–1477.
- Persichini, T., Cantoni, O., Suzuki, H., Colasanti, M., 2006. Cross-talk between constitutive and inducible NO synthase: an update. *Antioxidants & Redox Signalling* 8 (5–6), 949–954.
- Pheng, L.H., Francoeur, C., Denis, M., 1995. The involvement of nitric oxide in a mouse model of adult respiratory distress syndrome. *Inflammation* 19, 599–610.
- Rangel-Frausto, M.S., Pittet, D., Costigan, M., Hwang, T., Davis, C., Wenzel, R.P., 1995. The natural history of systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Journal of American Medical Association* 273, 117–123.
- Ricciardolo, F.L.M., Sterk, P.J., Gaston, B., Folkerts, G., 2003. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiological Reviews* 84, 731–765.
- Russel, J.C., Amy, R.M., Manichavel, V., Dolphin, P.J., Epling, W.F., Pierce, D., Boer, D.P., 1989. Prevention of myocardial disease in JCR: LA-corpulent rats by running. *Journal of Applied Physiology* 66, 1649–1655.
- Schulz, R., Nava, E., Moncada, S., 1992. Induction and potential biological relevance of a Ca²⁺ independent nitric oxide synthase in the myocardium. *British Journal of Pharmacology* 105, 575–580.
- Scumpia, P.O., Sarcia, P.J., DeMarco, V.G., Stevens, B.R., Skimming, J.W., 2002. Hypothermia attenuates iNOS, CAT-1, CAT-2, and nitric oxide expression in lungs of endotoxemic rats. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 283, L1231–L1238.
- Sessa, W.C., Pritchard, K., Seyed, N., Wang, J., Hintze, T.H., 1994. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide synthase production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circulation Research* 74, 349–353.
- Shen, F.M., Guan, Y.F., Xie, H.H., Su, D.F., 2004. Arterial baroreflex function determines survival time in lipopolysaccharide-induced shock in rats. *Shock* 21, 556–560.
- Shephard, R.J., Balady, G.J., 1999. Exercise and cardiovascular therapy. *Circulation* 99, 963–972.
- Suffredini, A.F., 1998. Myocardial dysfunction in sepsis: clinical and experimental investigations. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* 128, 1444–1452.
- Szabo, C., Salzman, A.L., Ischiropoulos, H., 1995. Endotoxin triggers the expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in the rat aorta in vivo. *FEBS Letters* 363, 253–258.
- Tachum-Talom, R., Schulz, R., McNeill, J.R., Khadour, F.H., 2000. Upregulation of neuronal nitric oxide synthase in skeletal muscle by swim training. *American Journal of Physiology* 279, H1757–H1766.
- Thiermann, C., Vane, J.R., 1990. Inhibition of nitric oxide synthesis reduces the hypotension induced by bacterial lipopolysaccharide in the rat. *European Journal of Pharmacology* 182, 591–595.
- Tipton, C.M., Sebastian, L.A., Overton, J.M., Woodman, C.R., Williams, S.B., 1991. Chronic exercise and its hemodynamic influences on resting blood pressure of hypertensive rats. *Journal of Applied Physiology* 71, 2206–2210.

- Vanhoutte, P.M., 2001. Endothelium-derived free radicals: for worse and for better. *Journal of Clinical Investigation* 107, 23–25.
- Vassilakopoulos, T., Deckman, G., Kebbewar, M., Rallis, G., Harfouche, R., Hussain, S.N.A., 2003. Regulation of nitric oxide production in limb and ventilatory muscles during chronic exercise training. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 284, 452–457.
- Wang, D., Wei, J., Hsu, K., Jau, J., Lieu, M.W., Chao, T.J., Chen, H.L., 1999. Effects of nitric oxide inhibitors on systemic hypotension, cytokines and inducible nitric oxide synthase expression and lung injury following endotoxin administration in rats. *Journal of Biomedical Science* 6, 28–35.
- Yamashita, T., Kawashima, S., Ohashi, Y., Ozaki, M., Ueyama, T., Ishida, T., Inoue, N., Hirata, K.I., Akita, H., Yokoyama, M., 2000. Resistance to endotoxin shock in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 101, 931–937.
- Yang, A.L., Chen, H.I., 2003. Chronic exercise reduces adhesion molecules/iNOS expression and partially reverses vascular responsiveness in hypercholesterolemic rabbit aortae. *Atherosclerosis* 169, 11–17.
- Yang, A.L., Tsai, S.J., Jiang, M.J., Jen, C.J., Chen, H.I., 2002. Chronic exercise increases both inducible and endothelial nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells of rat aorta. *Journal of Biomedical Science* 9, 149–155.
- Zagyzdin, Y., Sancesario, G., Wang, Y.X., Share, L., Fitzgerald, M.E., Reiner, A., 1996. Evidence from its cardiovascular effects that 7-nitroindazole may inhibit endothelial nitric oxide synthase in vivo. *European Journal of Pharmacology* 303, 61–69.
- Zheng, H., Li, Y.F., Comish, K.G., Zucker, L.H., Patel, K.P., 2005. Exercise training improves endogenous nitric oxide mechanisms within the paraventricular nucleus in rats with heart failure. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 288, H2332–H2341.