

PAPEL DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA SOBRE AS ADAPTAÇÕES
ERITROPOIÉTICAS INDUZIDAS PELO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO

FLÁVIO DE CASTRO MAGALHÃES

Tese apresentada à Escola de
Educação Física e Esporte da
Universidade de São Paulo, como
requisito parcial para obtenção do
grau de Doutor em Educação Física.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. EDILAMAR MENEZES DE OLIVEIRA

MAGALHÃES, F.C. **Papel do sistema renina angiotensina sobre as adaptações eritropoiéticas induzidas pelo treinamento físico aeróbico.** Tese apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Educação Física.

Aprovado em: 05/08/2011

Banca examinadora

Prof. Dr.: Patrícia Chakur Brum

Instituição: EEFE - USP

Julgamento: aprovado

Assinatura: _____

Prof. Dr.: Fabiana Sant'Anna Evangelista

Instituição: EACH - USP Leste

Julgamento: aprovado

Assinatura: _____

Prof. Dr.: Cândido Celso Coimbra

Instituição: UFMG

Julgamento: aprovado

Assinatura: _____

Prof. Dr.: Luiz Oswaldo Carneiro Rodrigues

Instituição: UFMG

Julgamento: aprovado

Assinatura: _____

Prof. Dr.: Edilamar Menezes de Oliveira

Instituição: EEFE - USP

Julgamento: aprovado

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao povo brasileiro e mais especificamente aos paulistas por subsidiarem meus estudos.

À Capes, pela concessão de bolsa de estudos sem a qual não teria sido possível me dedicar integralmente ao doutorado.

Aos animais utilizados nos experimentos, um total de cerca de 140 animais utilizados diretamente nesse projeto, com a certeza de que foram tratados, além da óbvia ética e respeito, com muito carinho.

À banca examinadora pelo privilégio da presença e generosa contribuição ao trabalho.

Aos colegas de laboratório os quais me auxiliaram durante a execução deste trabalho. Em especial ao Tiago Fernandes, amigo muito competente que esteve presente nos momentos mais difíceis do doutorado. Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Exercício, Ursula, Natan, Marco e Stéphano por auxiliarem no treinamento dos animais.

Ao grande amigo Valério Garrone Baraúna, sempre disposto a me auxiliar nos momentos de dúvida e cujas questões me fizeram refletir e melhorar meu trabalho.

Ao grande amigo Diego Barreti pela convivência durante os anos do doutorado.

Às técnicas Katt, por realizar as cirurgias nos animais e à Glória à Marcele pelo auxílio nos momentos necessários.

Aos professores Paulo Ramires e Patrícia Brum por confiarem a mim as aulas de Termorregulação dentro da disciplina Fisiologia do Exercício do curso de graduação em Educação Física e Esporte durante 4 anos e desta forma me dar oportunidade de adquirir experiência docente.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Krieger por permitir o uso do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular.

Aos amigos do Incor, pessoas incrivelmente solícitas e competentes. Principalmente, ao Vinícius Bassaneze, pelo auxílio no uso do FACS, aos técnicos Victor e Leonardo, pela disposição em ajudar, à Samantha, pelo auxílio na sala de cultura e à Luciene por facilitar a execução dos experimentos no Incor.

Ao Dr. Fábio Marques pelo auxílio na medida da meia vida das hemácias.

À minha orientadora, Profa. Dra. Edilamar Menezes de Oliveira, por me dar a oportunidade e o privilégio de realizar meu doutoramento sob sua competente orientação, estar sempre disposta para esclarecer dúvidas e por ter me dado uma segunda chance de mostrar meu valor.

À minha família, minha mãe e minha irmã, sem as quais com certeza não teria tido condições de realizar este trabalho.

EPÍGRAFE

“Se os fatos não se adequam à teoria mude os fatos.”

Albert Einstein

RESUMO

MAGALHÃES, F.C. **Papel do sistema renina angiotensina sobre as adaptações eritropoiéticas induzidas pelo treinamento físico aeróbico.** 82 folhas. Tese de Doutorado – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O treinamento físico (TF) promove adaptações no sistema hematopoiético e o sítio NH₂-terminal da enzima conversora de angiotensina I (ECA) hidrolisa um tetrapeptídeo hemorregulador negativo, o Acetil-Seril-Aspartil-Lisil-Prolina (Ac-SDKP). O objetivo do presente estudo foi investigar se o sítio NH₂-terminal da ECA participaria nas adaptações hematopoiéticas induzidas pelo TF. Realizamos duas séries de experimentos. A primeira para determinarmos qual protocolo de TF seria o mais adequado para estudar as adaptações eritropoiéticas e a segunda para estudar o papel do sítio NH₂-terminal da ECA nessas adaptações. Série de experimentos 1: ratas Wistar foram divididas em 3 grupos: controle (C), que realizaram TF (60 min/d, 5dias/sem) de 10 semanas uma vez ao dia (T1) e que realizaram o mesmo TF por 8 semanas, seguido de uma semana 2 vezes ao dia e uma semana 3 vezes ao dia (T2). Série de experimentos 2: ratas Wistar foram divididas em 4 grupos: controle (C), controle tratadas com captopril (10 mg.kg⁻¹.dia⁻¹) (C-Cap), treinadas sob o protocolo T2 (T2) e treinadas sob o protocolo T2 tratadas com captopril (T2-Cap). Foram medidos: 1) a pressão arterial (PA) e a frequência cardíaca; 2) a hipertrofia cardíaca e atividade da citrato sintase; 3) o consumo máximo de oxigênio, o tempo de exercício e a distância percorrida em teste máximo; 4) a atividade catalítica dos terminais da ECA; 5) a concentração plasmática e na fração extracelular da medula óssea de Ac-SDKP; 6) o número e a proliferação de células tronco hematopoiéticas (CTH) no sangue e medula; 7) a reticulocitose e meia-vida das hemácias. As diferenças observadas apresentaram p<0,05. Série de experimentos 1: o protocolo T2 induziu maiores adaptações fisiológicas, morfológicas e funcionais em comparação ao T1. O protocolo T2 foi eficaz em promover adaptações no sistema eritropoiético como aumento no número e na capacidade proliferativa de CTH, no percentual de reticulócitos e redução na meia-vida das hemácias. O protocolo T2 aumentou a atividade catalítica do sítio NH₂-terminal da ECA e reduziu a concentração plasmática e na fração extracelular da medula óssea de Ac-SDKP, o que não foi observado em T1. Série de experimentos 2: o grupo T2 apresentou aumento na atividade NH₂-terminal da ECA, que foi inibido no grupo T2-Cap. A inibição do sítio NH₂-terminal da ECA não influenciou a PA nem afetou as respostas ao treinamento. O grupo T2 apresentou redução na concentração plasmática e na fração extracelular da medula óssea de Ac-SDKP, enquanto no grupo T2-Cap não houve redução do Ac-SDKP no plasma e houve atenuação da redução na fração extracelular da medula óssea. Houve aumento no número e na proliferação de CTH na medula óssea e no sangue no grupo T2 e este aumento foi parcialmente inibido no grupo T2-Cap. Houve aumento na reticulocitose no grupo T2 e inibição parcial deste aumento no grupo T2-Cap. A meia-vida das hemácias foi reduzida em 50% no grupo T2, enquanto no grupo T2-Cap houve atenuação da redução. Concluímos que o protocolo de treino T2 estimula a hematopoiese pelo aumento na atividade do sítio NH₂-terminal da ECA, aumento este que inativa o tetrapeptídeo Ac-SDKP.

Palavras-chave: Treinamento físico; hematopoiese; sítio NH₂-terminal da ECA; Ac-SDKP.

ABSTRACT

MAGALHÃES, F.C. **Role of the renin-angiotensin system on the erythropoietic adaptations induced by aerobic exercise training.** 82 pages. Doctoral Thesis - School of Physical Education and Sport, University of São Paulo, São Paulo, 2011.

Physical training (PT) promotes changes in the hematopoietic system and the NH₂-terminal active site of angiotensin-converting enzyme I (ACE) hydrolyzes a tetrapeptide, negative hemoregulator, the acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline (Ac-SDKP). The purpose of this study was to investigate whether the NH₂-terminal active site of ACE plays a role in the hematopoietic changes induced by PT. We conducted two series of experiments. The first in order to determine which PT protocol would be more appropriate to study the erythropoietic adaptations and the second to study the role of the NH₂-terminal site of ACE in these adaptations. Experiment series 1: female Wistar rats were divided into 3 groups: control (C), submitted to PT (60 min/d, 5d/week) for 10 weeks once a day (T1) and submitted to the same TF for 8 weeks, followed by a week 2 times a day and a week 3 times a day (T2). Experiment series 2: female Wistar rats were divided into four groups: control (C), control treated with captopril (10 mg.kg⁻¹.day⁻¹) (C-Cap), trained under the protocol T2 (T2) and trained under protocol T2 treated with captopril (Cap-T2). We measured: 1) blood pressure (BP) and heart rate, 2) cardiac hypertrophy and citrate synthase activity, 3) the maximum oxygen consumption, exercise time and distance in maximal test, 4) catalytic activity ACE terminals, 5) plasma and bone marrow extracellular fraction concentration of Ac-SDKP, 6) the number and proliferation of hematopoietic stem cells (HSC) in the blood and marrow, 7) reticulocytosis and erythrocyte life-span. The observed differences presented $p < 0.05$. Experiment series 1: T2 protocol induced greater physiological, morphological and functional compared to T1. T2 protocol was effective in causing changes in the erythropoietic system such as increase the number and proliferative capacity of HSC, the percentage of reticulocytes and reduced erythrocyte life-span. The protocol T2 increased the catalytic activity of the NH₂-terminal site of ACE and decreased plasma and bone marrow extracellular fraction concentration of Ac-SDKP, which was not observed in T1. Experiment series 2: the T2 group showed an increase in the activity of the NH₂-terminal ACE, which was inhibited in group T2-Cap. Inhibition of the NH₂-terminal site of ACE did not influence or affect the BP responses to training. The T2 group showed a reduction in plasma and bone marrow extracellular fraction of Ac-SDKP, whereas in the T2-Cap there was no reduction of Ac-SDKP in plasma and there was attenuation of the reduction in the extracellular fraction of bone marrow. There was an increase in the number and proliferation of HSC in bone marrow and blood in the T2 group and this increase was partially inhibited in group T2-Cap. There was an increase in reticulocytosis in group T2 and partial inhibition of the increase in T2-Cap group. The erythrocyte life-span was reduced by 50% in T2, while in the T2-Cap group there was attenuation of the reduction. We conclude that the training protocol T2 stimulates hematopoiesis by increasing the activity of the NH₂-terminal site of ACE, an increase that inactivates the tetrapeptide Ac-SDKP.

Keywords: Physical training; hematopoiesis; NH₂-terminal active site of ACE; Ac-SDKP.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,3 DPG	2,3 difosfoglicerato
Ac-SDKP	Acetil-Seril-Aspartil-Lisil-Prolina
NH ₂ -terminal	Amino-terminal
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
BFU-E	<i>Burst forming units-Erythroid</i> *
CD	<i>Cluster of differentiation</i> **
COOH-terminal	Carbóxi-terminal
CTH	Células tronco hematopoiéticas
ECA	Enzima conversora de angiotensina I
Epo	Eritropoietina
Receptor AT1	Receptor de angiotensina II do tipo I
Receptor AT2	Receptor de angiotensina II do tipo II
SRA	Sistema Renina Angiotensina
UFC-E	Unidades formadoras de colônia-eritróides
UFC-G	Unidades formadoras de colônia-granulócitos
UFC-GEMM	Unidades formadoras de colônia-granulócitos, eritrócitos, monócitos, magacariócitos
UFC-GM	Unidades formadoras de colônia-granulócitos, macrófagos
UFC-M	Unidades formadoras de colônia-macrófagos

* Embora o termo *cluster of differentiation* não seja em português, a sigla foi mantida em inglês pelo fato de não ter encontrado tradução difundida para o português e ainda pelo fato que essa sigla é comumente utilizada em textos na língua portuguesa e ser de ampla compreensão. Em tradução livre: agrupamento de diferenciação.

** Não foi encontrado tradução para o português dessa sigla (tradução livre: Unidades Formadoras de Colônias de alta capacidade proliferativa de eritróides).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 O treinamento físico e as adaptações na sistema hematopoiético.....	15
2.2 O treinamento físico e as células tronco hematopoiéticas.....	16
2.3 O sistema renina-angiotensina	17
2.4 O sistema renina-angiotensina e as células tronco hematopoiéticas.....	19
3. OBJETIVOS	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Animais	26
4.2 Série de experimentos 1.	26
4.3 Protocolos de treinamento físico.....	26
4.4 Série de experimentos 2.	27
4.5 Teste progressivo em esteira.....	27
4.6 Captação máxima de oxigênio.....	28
4.7 Medidas Cardiovasculares.....	28
4.8 Procedimentos experimentais.	28
4.9 Medida da hipertrofia cardíaca.	29
4.10 Medida da atividade da citrato sintase.	29
4.11 Atividade da ECA.	29
4.12 Medida da concentração de AcSDKP.	30
4.13 Medida da concentração de Ang II.	30
4.14 Medida da concentração de eritropoietina.....	31
4.15 Isolamento de células mononucleares da medula óssea e do sangue periférico.	31
4.16 Enumeração de células tronco hematopoiéticas por citometria de fluxo.	31
4.17 Proliferação de células tronco hematopoiéticas em meio de metilcelulose.	32
4.18 Contagem de reticulócitos e hematócrito.	32
4.19 Medida do conteúdo sanguíneo de 2,3 DPG.	32
4.20 Avaliação da meia vida das hemácias.	33
4.21 Análise estatística.....	33

5. RESULTADOS.....	35
5.1 Série de experimentos 1.....	35
5.1.2 Parâmetros hemodinâmicos.	35
5.1.3 Parâmetros de treinamento.....	35
5.1.4 Atividade da ECA.....	37
5.1.5 Medida das concentrações de Ac-SDKP e Ang II.....	38
5.1.6 Medida da concentração plasmática de Epo.	39
5.1.7 Enumeração de células tronco hematopoiéticas por citometria de fluxo....	40
5.1.8 Proliferação de células tronco hematopoiéticas em meio de metilcelulose.	41
5.1.9 Hematócrito, hemoglobina, reticulócitos e 2,3 DPG.....	42
5.1.10 Avaliação da meia vida das hemácias.....	43
5.2 Série de experimentos 2.	44
5.2.1 Parâmetros hemodinâmicos.	45
5.2.2 Parâmetros de treinamento.....	45
5.2.3 Atividade da ECA.....	47
5.2.4 Medida da concentração de Ac-SDKP	49
5.2.5 Medida da concentração de Ang II.....	49
5.2.6 Medida da concentração de Epo.....	50
5.2.7 Enumeração de células tronco hematopoiéticas por citometria de fluxo....	51
5.2.8 Proliferação de células tronco hematopoiéticas em meio de metilcelulose.	52
5.2.9 Hematócrito, reticulócitos, 2,3 DPG e meia vida das hemácias.	53
6. DISCUSSÃO.....	54
6.1 Série de experimentos 1.....	54
6.2 Série de experimentos 2.....	59
7. CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS	69

“In the fields of observation
chance favors only the
prepared mind”

Louis Pasteur

1. INTRODUÇÃO

Historicamente nosso grupo de estudos, liderado pela professora Dra. Edilamar Menezes de Oliveira, tem estudado a participação do sistema renina angiotensina (SRA) na hipertrofia cardíaca fisiológica, tanto excêntrica (induzida pelo treinamento aeróbico), quanto concêntrica (induzida pelo treinamento de força), tendo sido publicados diversos trabalhos abordando esse tema nos últimos anos^{1; 2; 3; 4; 5}.

Os estudos associados ao treinamento físico aeróbico foram, em sua maioria, realizados com treinamento de natação e com ratas. Os primeiros passos deste estudo foram iniciados pesando do coração de ratos que estavam sendo submetidos a um protocolo de treinamento com o objetivo de estudar o fenômeno do *over-training*, pelo grupo de pesquisa do Instituto de Ciência Biomédicas da USP. Grupo este liderado pelo falecido Prof. Dr. Luis Fernando Bicudo Pereira Costa Rosa (conhecido pelos amigos como GG^{*}). O fenômeno do *over-training* acomete atletas de alto nível de desempenho físico e de treinamento. Com os resultados de hipertrofia cardíaca bastante exacerbada observados naquele estudo, iniciamos a padronização de um protocolo que levasse a maior hipertrofia cardíaca, porém sem que se caracterizasse *over-training*. Nosso objetivo era chegarmos a dois graus de hipertrofia cardíaca, para estudarmos a participação do SRA na hipertrofia cardíaca induzida pelo treinamento físico aeróbico. Assim, desenvolvemos um protocolo de treinamento físico aeróbico por natação com maior frequência diária de treinamento nas duas últimas semanas do protocolo (descrito detalhadamente em **MATERIAL E MÉTODOS** – Protocolos de treinamento físico). Os animais submetidos a esse protocolo de maior frequência diária de treinamento apresentavam adaptações morfológicas e funcionais mais exacerbadas do que aqueles submetidos ao protocolo padrão. Ou seja, estavam mais treinados e sem os sinais

* O Prof. Dr. Luis Fernando Bicudo Pereira Costa Rosa faleceu aos 40 anos de idade no dia 19 de maio de 2005, vítima de um acidente enquanto pedalava numa estrada.

deletérios que poderiam caracterizar o protocolo usado como *over-training*.

Desta forma, desenvolvemos dois protocolos de treinamento (com dois diferentes volumes de treinamento), que resultavam em dois diferentes graus de hipertrofia cardíaca. Nosso passo seguinte foi investigar se essa hipertrofia cardíaca ainda seria fisiológica – aquela induzida pelo treinamento físico e que melhora a função cardíaca – ou patológica – causada por estados patológicos como a insuficiência cardíaca e a hipertensão arterial. Em um desses estudos, o da dissertação de mestrado da aluna Nara Hashimoto, cujos resultados foram utilizados para a publicação de estudo em periódico nacional e para complementar outro estudo publicado em periódico internacional⁵, foi realizada a análise da expressão de alguns marcadores de hipertrofia patológica. Naquele estudo foi observado que esses marcadores estavam extremamente reduzidos no grupo de animais submetidos ao treinamento com maior frequência diária, mostrando que a hipertrofia era de fato fisiológica.

Ainda naquele estudo, realizamos a análise da atividade da enzima conversora de angiotensina I (ECA) tanto no coração quanto no soro desses animais, pois o estudo anterior do nosso grupo havia mostrado que o uso de inibidores da ECA inibia a hipertrofia cardíaca induzida pelo treinamento com maior frequência diária, o que sugeria que o SRA local participava nas adaptações cardíacas induzidas pelo treinamento físico². Portanto, investigamos se a atividade da ECA cardíaca ou sérica estaria alterada por esse protocolo de treinamento, o que poderia ajudar a explicar os resultados encontrados anteriormente. Observamos que a atividade da ECA cardíaca estava reduzida aproximadamente 70% em relação aos valores do grupo controle e que no soro a atividade da ECA estava aumentada em 23,5% no grupo submetido à maior frequência de treinamento diário. É nesse momento histórico que se encaixa a frase de Pasteur, “nas áreas de observação a oportunidade favorece somente a mente preparada”, pois naquele determinado momento não estávamos tão interessados na atividade sérica da ECA, mas, efetivamente, na atividade cardíaca desta enzima, uma vez que os objetivos eram entender a participação do SRA nas adaptações do coração induzidas pelo treinamento. Este resultado poderia ter sido visto de forma periférica e ter se perdido ao longo do tempo, mas nos chamou a atenção. E foi a partir do dado do aumento na atividade sérica da ECA encontrado naquele estudo, que começou-se a fundar os pilares do que viria a ser o presente estudo.

A ECA é uma enzima central do SRA e é responsável por clivar o decapeptídeo angiotensina I (Ang I) em angiotensina II (Ang II), que é o octopeptídeo efetor do SRA. A

ECA é encontrada em duas isoformas, sendo uma delas presente apenas nos testículos. A outra isoforma tem cerca de 180 kDa de peso molecular e está presente ancorada às membranas celulares de diversos tecidos, mas também pode ser encontrada na circulação. Esta isoforma de 180 kDa apresenta dois sítios ativos, um mais próximo a sua porção carbóxi (COOH)-terminal e o outro mais próximo a sua porção amino (NH₂)-terminal. Ambos os sítios apresentam grande homologia interna o que sugere uma duplicação de um gene ancestral. Embora esses sítios sejam muito semelhantes, existem algumas características que os diferenciam, por exemplo, a dependência de zinco para seu funcionamento e a efetividade em hidrolisarem seus substratos. É possível, portanto, testar a atividade desses sítios separadamente utilizando substratos sítio-específicos. Estes substratos são disponíveis no Brasil, pois foram desenvolvidos pelo grupo da UNIFESP e foram gentilmente doados pela Profa. Dra. Adriana Carmona^{6;7}.

Assim, nós tivemos como objetivo, no primeiro momento, investigar se o aumento da atividade sérica da ECA seria devido a maior atividade do sítio COOH-terminal ou do sítio NH₂-terminal. Observamos que ambos os sítios tinham atividade elevada. Portanto, a partir deste resultado, nos voltamos para dados da literatura para investigarmos as diferenças existentes entre esses dois sítios da ECA, principalmente no que concerne a suas funções *in vivo*. Ficou claro a partir da revisão que fizemos, que a atividade COOH-terminal estava muito relacionada com a síntese de Ang II *in vivo*⁸, embora o sítio NH₂-terminal também tenha a capacidade de clivar a Ang I, o que não era muito empolgante, pois não diferenciava a função dos sítios. O que foi interessante, e de fato muito entusiasmante, foi encontrar uma série de estudos acerca do papel único do sítio NH₂-terminal da ECA na hidrólise do tetrapeptídeo, de ocorrência natural em diversos tecidos do organismo, o Acetil-Seril-Aspartil-Lisil-Prolina (Ac-SDKP)⁹. Estudos mostravam que o sítio NH₂-terminal da ECA hidrolisava este tetrapeptídeo cerca de 50 vezes mais rápido do que o sítio COOH-terminal¹⁰, fazendo deste tetrapeptídeo um substrato natural e único do sítio NH₂-terminal da ECA. Mas o que, com efeito, fez com que direcionássemos nossas atenções a esse tetrapeptídeo, era sua função.

O Ac-SDKP foi primeiramente isolado da medula óssea de fetos de bezerros e mostrou ter a função de inibir a entrada das células tronco hematopoiéticas (CTH) na fase S** do ciclo

** O ciclo celular é dividido em 4 fases. A fase M é a de mitose, e é seguida pela fase G1 (do inglês *Gap 1*) que se localiza entre a fase M e S, que é a de síntese do DNA. A fase S é seguida pela fase G2, que antecede a fase M,

celular, mantendo-as em fase G0.

Em estudos posteriores, observou-se que o uso de inibidores da ECA, notadamente aqueles com maior afinidade pelo sítio catalítico NH₂-terminal da ECA (como é o caso do captopril), era capaz de elevar as concentrações plasmáticas desse tetrapeptídeo¹¹ e que essa inibição da ECA, com conseqüente aumento nas concentrações da Ac-SDKP, reduzia a proliferação de progenitores hematopoiéticos *in vivo*¹². Com base nos resultados desses estudos, começamos a compreender a importância deste tetrapeptídeo para a hematopoiese.

O que estabelecemos como hipótese neste ponto foi que se o treinamento físico com maior frequência diária de treino aumenta a atividade do sítio NH₂-terminal da ECA, e esse sítio hidrolisa com exclusividade o tetrapeptídeo Ac-SDKP, que é um importante regulador negativo da hematopoiese, seria possível que este tipo de treinamento estivesse atuando na hematopoiese. Nosso próximo passo, foi então investigar se alguns parâmetros sanguíneos, que podem ser alterados com o treinamento físico, apresentariam diferenças que poderiam nos ajudar a trilhar novos caminhos.

Mensuramos então o hematócrito, que é o percentual de células vermelhas (hemácias ou eritrócitos) em relação a um volume plasmático, o qual é quantificado do sangue total em tubo para micro-hematócrito após centrifugação. Ainda, quantificamos também a reticulocitose, que é o percentual de reticulócitos (eritrócitos jovens) presentes na circulação em relação ao total de eritrócitos e representa a estimulação da medula óssea para fins de hematopoiese. Enquanto o hematócrito normalmente é diminuído em atletas, os reticulócitos encontram-se aumentados. Observamos que nos animais submetidos ao protocolo com maior frequência diária de treinamento, não havia diferença no valor do hematócrito quando comparados ao controle, entretanto a reticulocitose estava aumentada em cerca de 4 vezes. Esses resultados sugeriram que este protocolo de treinamento era capaz de alterar este importante parâmetro sanguíneo.

O mais interessante era o fato destes resultados virem ao encontro de resultados obtidos para a atividade do sítio NH₂-terminal da ECA, que estava aumentada. Eis o que pensamos! Uma vez que o treinamento físico com maior frequência diária de treinamento aumentava a

reiniciando o ciclo. Sob algumas circunstâncias, como ocorre quando da presença do Ac-SDKP em células tronco hematopoiéticas, o ciclo é temporariamente interrompido na fase G1 e as células ficam em estado quiescente, ou em fase G0.

atividade do sítio NH₂-terminal da ECA, a concentração de Ac-SDKP poderia diminuir. Sendo este tetrapeptídeo um hemorregulador negativo, uma redução na sua concentração levaria a uma redução na inibição sobre as CTH, que estariam agora liberadas para proliferar. Este aumento na proliferação resultaria em aumento na reticulocitose, resultado este que havíamos acabado de observar.

Outro ponto interessante, que surgiu a partir desses resultados, foi que havendo maior estimulação da medula óssea, isto se traduziria em aumento da reticulocitose, ou seja, maior entrada de células vermelhas jovens na circulação, entretanto não foi observado aumento no hematócrito. Assim, estes resultados nos levaram a concluir que a retirada de células vermelhas da circulação deveria estar aumentada, pois, caso contrário, o hematócrito deveria aumentar. Se esse raciocínio estivesse correto, a meia-vida das hemácias deveria estar diminuída, uma vez que haveria maior entrada de células jovens na circulação, juntamente com maior retirada de células mais velhas.

A partir desses resultados e as hipóteses levantadas com os resultados obtidos deram a sustentação para a execução da presente investigação.

Em resumo, nosso modelo teórico era que o treinamento com maior frequência diária de treino elevava a atividade sérica do sítio NH₂-terminal da ECA, o que reduzia a concentração do tetrapeptídeo Ac-SDKP, o que por sua vez, retirava a inibição sobre as CTH e permitia a aumento na proliferação dessas células. Esse efeito se traduziria em maior número de células vermelhas jovens na circulação e, em conjunto com o hematócrito inalterado, redução na meia-vida das hemácias.

Portanto, no presente estudo, demonstramos esse mecanismo. Num primeiro momento reproduzimos os resultados já encontrados pelo nosso grupo, no que concerne às adaptações com o protocolo de treinamento com maior frequência diária de treino, e complementamos esses resultados com dados que dessem maior suporte a nossa hipótese de estudo. Num segundo momento, nos utilizamos de ferramentas farmacológicas para inibir o aumento da atividade do sítio NH₂-terminal da ECA, o qual acontecia com o treinamento de maior frequência diária, com a finalidade de investigar se nossa hipótese inicial estava correta.

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 O treinamento físico e as adaptações no sistema hematopoiético

O treinamento físico tem efeitos sobre diversos sistemas do organismo, dentre eles o hematopoiético. Sabe-se que o treinamento de alta intensidade causa aumento no volume sanguíneo total, em função do aumento tanto no volume plasmático quanto no número de eritrócitos¹³. O aumento do volume sanguíneo é considerado uma adaptação benéfica em resposta ao treinamento físico devido a diversos fatores. Maior volume sanguíneo aumenta o retorno venoso e, por conseqüência, aumenta o volume de ejeção (de acordo com a lei de Frank-Starling)¹⁴; durante um exercício físico a uma mesma intensidade relativa, um indivíduo treinado, que apresente maior volume sanguíneo, desenvolverá maior potência do que um indivíduo controle, devido a possibilidade de aumento no suprimento sanguíneo para a musculatura em atividade¹⁵; durante um exercício em uma mesma intensidade absoluta, um indivíduo treinado, que apresente maior volume sanguíneo, poderá apresentar maior fluxo sanguíneo cutâneo para fins de termorregulação, sem prejudicar o fluxo sanguíneo para a musculatura em atividade¹⁶.

Entretanto, esse aumento não é proporcional, sendo o aumento no volume plasmático cerca de 3 vezes maior do que o aumento no número de eritrócitos circulantes¹³. Por conta dessa desproporção, ocorre hemodiluição, ou seja, redução do hematócrito, característica encontrada em atletas de *endurance*^{17; 18;19; 20;21; 22}. Essa hemodiluição também é considerada uma adaptação benéfica em resposta ao treinamento físico, pois reduz a viscosidade sanguínea, e, de acordo com a lei de Poiseuille ($Q = P\pi R^4/(8l\eta)$, onde Q = fluxo; P = pressão; π = Pi (~3,141592); R = raio; l = comprimento; η = viscosidade), quanto menor a viscosidade, mantidas as outras variáveis constantes, maior o fluxo. A hemodiluição é benéfica, pois melhora a hemodinâmica durante o exercício físico.

O treinamento físico aumenta a renovação de eritrócitos circulantes por meio do aumento na produção de eritrócitos e pela eliminação acelerada de eritrócitos velhos^{13; 21; 23; 24; 25; 26}. Embora nenhum desses dois efeitos estejam completamente compreendidos²⁷, em conjunto eles levam a uma redução na meia-vida dos eritrócitos e aumento no número de eritrócitos jovens circulantes. Eritrócitos jovens apresentam maior conteúdo de 2,3 difosfoglicerato (DPG), um metabólito da glicólise, que enfraquece a ligação oxigênio-hemoglobina,

facilitando a liberação deste gás em tecidos com baixa pressão parcial de oxigênio²⁸. Além disso, eritrócitos mais jovens têm maior concentração de hemoglobina intacta, o que melhora a fluidez na membrana celular e facilita a troca de gases e íons nos tecidos²⁹.

O indicador mais comumente utilizado para avaliar a estimulação da medula óssea, ou seja, a produção de eritrócitos, é a reticulocitose³⁰. Reticulócitos são eritrócitos jovens e a reticulocitose é o percentual de reticulócitos no total de eritrócitos na circulação. O treinamento físico aumenta a reticulocitose^{13; 31}.

1.2 O treinamento físico e as células tronco hematopoiéticas

Embora seja conhecido que o treinamento físico estimula a produção de eritrócitos na medula óssea, uma vez que vários estudos observaram alterações no sistema hematopoiético em resposta ao treinamento físico, como o aumento na reticulocitose, apenas recentemente os pesquisadores voltaram os olhares para os efeitos do treinamento físico sobre as células que dão origem aos eritrócitos, as CTH.

Aproximadamente 2×10^{11} de eritrócitos (que equivale a um volume sanguíneo de ~40 mL por dia em humanos, o que leva a renovação de 5 L de sangue entre 100 a 120 dias) e 1×10^{10} de leucócitos devem ser repostos por dia para manter a hematopoiese adulta. Essas células devem ser repostas pela proliferação e diferenciação de células menos diferenciadas, as CTH³². As CTH são células, portanto, que dão origem às células sanguíneas adultas. Durante a vida adulta, as CTH na medula óssea produzem megacariócitos e plaquetas, eritrócitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, macrófagos, pelo menos dois tipos de células dentríticas, vários sub-tipos de linfócitos B e T e células *natural killer*³³.

As CTH são identificáveis através de alguns marcadores de membrana, como o *cluster of differentiation* (CD) 34, que é um marcador expresso em células progenitoras hematopoiéticas primitivas. Este marcador é o mais utilizado e aceito como marcador das CTH e comumente utilizado em conjunto com a co-expressão ou ausência de expressão de outros marcadores de membrana para a identificação dessa população de células. Um marcador utilizado para identificar células ainda mais imaturas da linhagem hematopoiética é o CD133 (ou AC133). A ausência de expressão de marcadores como o CD38, que é um marcador de ativação de linfócitos B e T, e a baixa expressão de CD45, que é expresso na maior parte das células hematopoiéticas adultas, também são usadas em conjunto com a expressão de CD34 para caracterizar as CTH^{32; 34; 35}.

Estudos que observaram os efeitos do treinamento físico sobre as CTH foram iniciados em 2002, quando Bonsignore et al. mediram o número circulante de CTH em repouso em atletas e compararam com sujeitos controle e observaram que essas células estavam elevadas de 3 a 4 vezes³⁶. Naquele estudo também foram medidos alguns fatores de crescimento que sabidamente têm efeito sobre as CTH, entretanto, não foram encontradas diferenças na concentração plasmática desses fatores na comparação dos atletas com os sujeitos controle. Em pacientes com infarto agudo do miocárdio tratados com implantação de *stent* o número de células CD34+CD133+ era aumentado após 3 meses de treinamento³⁷, enquanto não foi observado efeito do estado de treinamento em sujeitos saudáveis sobre o número circulante de células CD34+³⁸. Entretanto, nesse último estudo, os voluntários foram classificados de acordo com o número de horas de exercício aeróbico realizado por semana, além de serem agrupados homens e mulheres na mesma análise, o que dificulta a interpretação dos resultados e enfraquece sobremaneira a conclusão do trabalho.

Esses estudos apontam para um possível efeito do treinamento físico sobre a liberação de células tronco provenientes da medula óssea. Apesar disso, diversos autores ressaltaram que os mecanismos e as vias intracelulares que envolvem essa regulação ainda são pouco conhecidos.

1.3 O sistema renina-angiotensina

Os efeitos do SRA sobre a regulação da pressão arterial foram primeiramente descritos em 1898 pelo fisiologista Robert Tigerstedt, a partir de observações que a pressão arterial era elevada em animais anestesiados pela infusão de extratos de rim. A compreensão do SRA desde então foi extremamente expandida. Atualmente, o SRA é entendido como um complexo sistema hormonal cujo papel fundamental está relacionado com o controle da pressão arterial e homeostasia hidroeletrolítica do organismo^{39; 40}. O SRA clássico envolve a clivagem de angiotensinogênio pela renina para produzir Ang I, que é convertida para Ang II pela ECA. As ações do SRA são mediadas principalmente pelo octapeptídeo Ang II através de dois tipos de receptores, o receptor de Ang II do tipo I (AT1) e do tipo II (AT2).

Essa visão do SRA, onde o sistema seria essencialmente dependente da existência do hormônio circulante para produzir seus efeitos fisiológicos, tem sido profundamente modificada nos últimos anos. Hoje, o SRA é visto de forma mais ampla, onde a multiplicidade de funções do sistema é produto também da ação “parácrina” e “autócrina” dos produtos desse

sistema produzidos localmente em vários tecidos⁴¹. A utilização de métodos bioquímicos aliados a técnicas modernas de biologia molecular permitiu evidenciar a existência de muitos componentes do SRA em tecidos periféricos. A detecção de um ou mais mRNAs destes componentes (angiotensinogênio, renina, enzima conversora e receptores de Ang II) em vários tecidos como glândulas adrenais, rins, coração, vasos e cérebro deram suporte à existência de SRA locais⁴². Hoje é amplamente aceito que os componentes do SRA são sintetizados localmente em diversos tecidos do organismo, que a síntese desses componentes é sensível a agentes farmacológicos e é, portanto, de relevância fisiológica e terapêutica potencial.

Entre os diversos componentes do SRA, a ECA parece particularmente importante como mediadora e reguladora da produção de Ang II. A ECA (kininase II, dipeptidil carboxipeptidase I, EC 3.4.15.1) é uma glicoproteína integral de membrana ancorada na bicamada lipídica através de uma sequência de aminoácidos hidrofóbicos (17 aminoácidos), localizados na extremidade COOH-terminal (Figura 1). A orientação da enzima na membrana ocorre de tal forma que seus sítios catalíticos, presentes na porção NH₂-terminal, estejam expostos na superfície extracelular^{43; 44; 45}. O cDNA desta enzima consiste de 4142 nucleotídeos que codifica para 1313 aminoácidos⁴⁶. A principal característica observada ao analisar a sequência de aminoácidos da enzima é o alto grau de homologia interna, com a presença de dois sítios ativos, sugerindo uma possível duplicação de um gene ancestral durante a evolução⁴⁵.

A ECA está envolvida no metabolismo de dois dos principais peptídeos vasoativos. Ela converte o decapeptídeo inativo Ang I no octapeptídeo ativo Ang II e inativa o peptídeo vasodilatador bradicinina, portanto participando sobremaneira na regulação da pressão arterial e homeostase hidroeletrolítica^{47; 48; 49}. Embora os substratos principais da ECA sejam a Ang I e a bradicinina, esta enzima também hidrolisa outros peptídeos, como a substância P, o hormônio liberador do hormônio luteinizante e o tetrapeptídeo, Ac-SDKP.

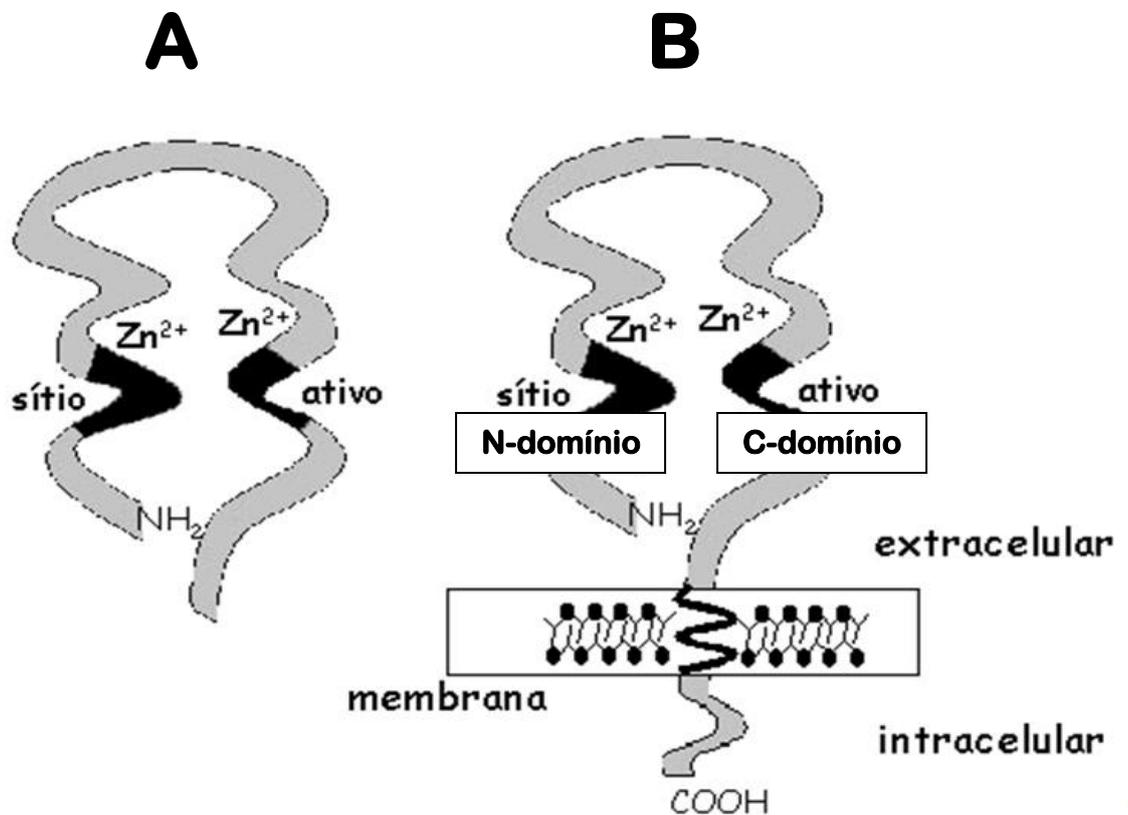


Figura 1 - Representação da estrutura e conformação da ECA derivada da circulação (A) e da ECA ancorada a membrana celular (B), mostrando os sítios catalíticos, os sítios de ligação de zinco, as extremidades amino (NH_2)- e carboxi ($COOH$)-terminais.

2.4 O sistema renina-angiotensina e as células tronco hematopoiéticas

O grupo de Haznedaroglu foi o primeiro que sugeriu a existência do SRA na medula óssea de forma ativa e que ele afetaria o crescimento de colônias hematopoiéticas, assim como a produção, proliferação e diferenciação dessas células^{50; 51; 52; 53; 54; 55; 56; 57}. Entretanto, as evidências da existência do SRA na medula óssea começaram a aparecer na literatura aos poucos. Inicialmente, o primeiro indício objetivo e direto a essa hipótese foi dada por Wulf et al., em 1996, que demonstraram a presença de uma atividade similar à renina convertendo angiotensinogênio em Ang I em células que apresentavam leucemia⁵⁸. No ano seguinte, Mrug et al. detectaram a presença do mRNA do receptor AT1 em CTH, além de demonstrar que a adição de Ang II ao meio de cultura dessas células aumentava a sua diferenciação⁵⁹. Este efeito era completamente bloqueado com o uso de bloqueadores específicos do receptor AT1. Este trabalho estabeleceu a base para experimentos futuros que viriam a avaliar os efeitos

autócrinos/parácrinos da Ang II e outros peptídeos do SRA sobre a eritropoiese. Posteriormente, Rodgers et al. observaram que Ang II incubada com células CD34+CD38-humanas provenientes da medula óssea aumentava proliferação dessas células, efeito também completamente bloqueado com o uso de bloqueadores do AT1R⁶⁰. A presença da ECA em células da medula óssea de humanos saudáveis e com leucemia mielóide crônica também foi observada⁶¹ e mais recentemente, Zambidis et al. identificaram que a ECA (CD143) é um marcador de hemangioblastos embriônicos primitivos em humanos⁶².

Em 2003, Haznedaroglu e Ozturk publicaram uma extensa revisão acerca das evidências que davam suporte à existência de um SRA localmente ativo na medula óssea que teria efeitos sobre a hematopoiese⁶³. Mas foi somente em 2004 que a presença e funcionalidade do SRA na medula óssea foram confirmadas. Strawn et al. observaram que todos os componentes do SRA estavam presentes em células da medula óssea de ratos, além disso, Ang II foi detectada no meio de cultura após incubação dessas células, sugerindo a capacidade de produção deste peptídeo por essas células e um possível mecanismo de ação autócrino/parácrino para regulação da hematopoiese regulada pelo SRA⁶⁴. Atualmente, é amplamente aceito que o sistema hematopoiético é um nicho de atuação do SRA e que este sistema tem papel na hematopoiese normal e patológica^{65; 66}.

A maior parte dos estudos que investigaram o efeito do SRA sobre a hematopoiese relata os efeitos da Ang II sobre as CTH. Entretanto, outras moléculas que fazem parte do SRA também participam de maneira importante na hematopoiese.

A ECA já é reconhecida como uma enzima central para pelo menos dois sistemas hormonais, o já descrito SRA e o sistema calicreína-cinina. Além disso, há alguns anos observou-se outra peculiaridade desta enzima quando se descobriu sua capacidade única e exclusiva de hidrolisar um tetrapeptídeo hemorregulador negativo, o Ac-SDKP.

O tetrapeptídeo Ac-SDKP, isolado inicialmente da medula óssea de feto de bezerro⁶⁷, inibe a entrada de CTH na fase S do ciclo celular, a fase de síntese do DNA, mantendo-as na fase G₀^{68; 69} (figura 2). O Ac-SDKP é produzido pela clivagem NH₂-terminal de seu precursor, a timosina beta 4 (assim conhecida pelo fato de ter sido inicialmente isolada do timo), proteína também encontrada na medula óssea, pela enzima endoproteínase Asp-N⁷⁰. A ação deste tetrapeptídeo parece ser via um receptor de membrana⁷¹ e reduz a proliferação celular via regulação de moduladores do ciclo celular como p53, p27^{kip1} e p21^{cip1}⁷². Tanto a

timosina beta 4 e, portanto, o Ac-SDKP são ubíquos (encontrados em vários tecidos corporais) e constitutivos (a expressão ocorre sem um agente indutor)⁷³.

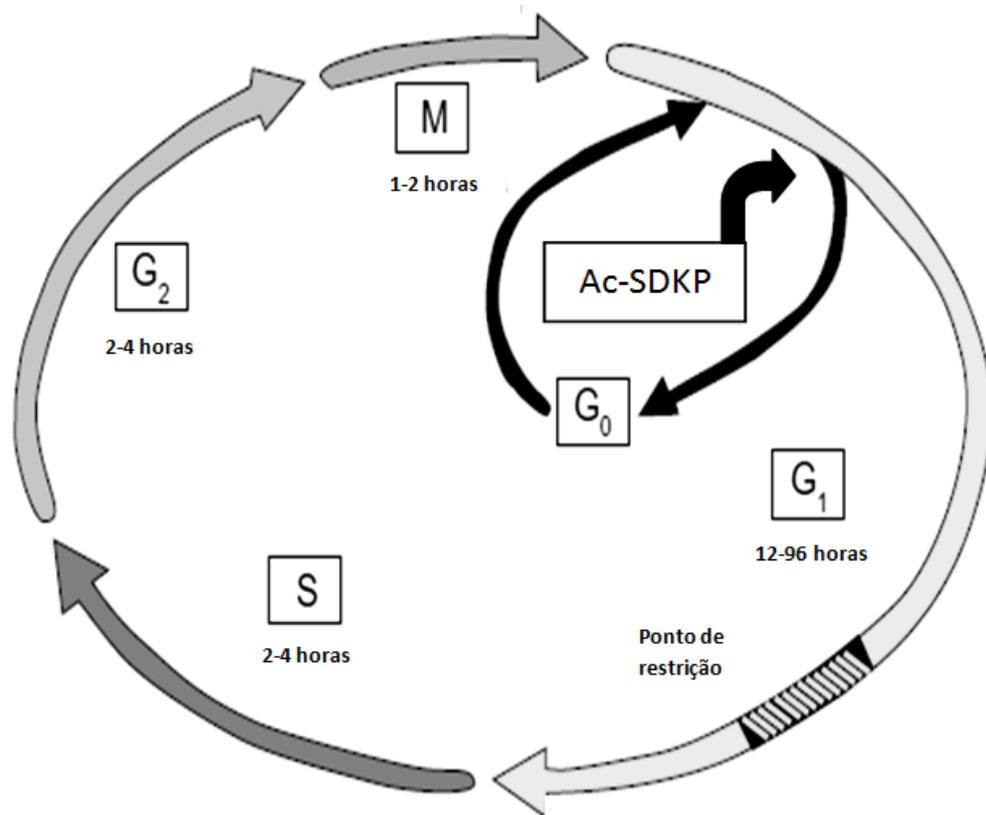


Figura 2 - O ciclo celular e o efeito do tetrapeptídeo Ac-SDKP. O tetrapeptídeo AC-SDKP inibe a entrada das células tronco hematopoiéticas na fase S do ciclo celular mantendo-as em G₀. Adaptado de Israels e Israels (2001)⁷⁴.

Bonnet et al. mostraram que a incubação de células CD34⁺ humanas isoladas com Ac-SDKP por 20h reduzia o número de progenitores clonogênicos, reduzia a taxa de proliferação dessas células, tinha efeito reversível e dose dependente e parecia diminuir o número de células por clone⁶⁹. Estes resultados foram também demonstrados por Cashman et al., em estudo no qual foi observado que incubação com Ac-SDKP por 2 a 3 dias com células provenientes da medula óssea de pacientes normais reduzia as unidades formadoras de colônia mais primitivas de eritrócitos e também as unidades formadoras de colônias de macrófagos e granulócitos⁷⁵. Após esse período, as células eram retiradas do meio e replaqueadas em meio

de cultura sem o tetrapeptídeo. Este procedimento revertia a inibição anterior e era observada proliferação normal dessas células.

Em 1993, Rieger et al. demonstraram que o Ac-SDKP era metabolizado quando incubado com plasma humano com meia-vida de 80 min e que esta clivagem era inibida por inibidores da ECA, mas não por inibidores de proteinases⁹. A hidrólise do Ac-SDKP pela ECA gerava o dipeptídeo COOH-terminal Lisina-Prolina, demonstrando que a ECA cliva o Ac-SDKP por atividade dipeptidil carboxipeptidase. Rousseau et al. demonstraram, utilizando mutantes seletivos dos dois domínios ativos da ECA expressa em células de ovário de hamster chinês, que o sítio catalítico NH₂-terminal está preferencialmente envolvido na clivagem do tetrapeptídeo Ac-SDKP⁷⁶. Este terminal hidrolisa o Ac-SDKP 50 vezes mais rápido do que o COOH-terminal. A fim de estudar se a inibição da ECA levaria a redução na proliferação de CTH, células de roedores estimuladas a proliferar por meio de radiação foram incubadas com captopril ou lisinopril (ambos inibidores da ECA amplamente utilizados na clínica médica para o tratamento da hipertensão arterial sistêmica), na presença ou ausência de Ac-SDKP⁷⁷. Foi observado que havia inibição da proliferação e da entrada de células na fase S do ciclo celular somente na presença de captopril associado ao Ac-SDKP, mas não com lisinopril, tanto com ou sem o Ac-SDKP. Estes resultados sugerem a importância da atividade catalítica NH₂-terminal da ECA na hidrólise do Ac-SDKP, uma vez que o captopril apresenta maior afinidade pelo sítio catalítico NH₂-terminal da ECA. Posteriormente, Chisi et al. incubaram células da medula óssea com captopril, e observaram redução na proporção de células formadoras de colônias na fase S do ciclo celular⁷⁸. Embora esse estudo não tenha medido a concentração de Ac-SDKP no meio de cultura, é provável que a redução observada sobre a proliferação de células da medula óssea pela inibição da ECA, tenha ocorrido pelo aumento nas concentrações de Ac-SDKP.

Estudos posteriores mostraram que também *in vivo* a ECA participa na hidrólise do tetrapeptídeo Ac-SDKP. Azizi et al. mostraram em humanos saudáveis que a inibição aguda da ECA com uma dose única de 50 mg de captopril resultava em aumento de 5,5 vezes na concentração plasmática de Ac-SDKP quando comparado ao grupo placebo⁷⁹. A concentração do Ac-SDKP retorna aos valores basais entre as administrações de captopril⁸⁰, o que previne o acúmulo deste tetrapeptídeo em pacientes que fazem uso deste inibidor da ECA. Foi demonstrado ainda, em humanos saudáveis, que a administração de 20 mg por dia de enalapril, também um inibidor da ECA, por 15 dias, elevava as concentrações plasmáticas e

urinárias de Ac-SDKP e reduzia a formação de colônias de eritrócitos e de granulócitos e macrófagos¹². Ainda, Chisi et al. observaram que a infusão de captopril em camundongos cujas células da medula óssea foram estimuladas a proliferar por meio de injeção de citosina arabinose ou radiação gama inibia a entrada dessas células na fase S do ciclo celular e esses resultados foram correlacionados com a redução na atividade da ECA e com a concentração plasmática de Ac-SDKP⁸¹. Dessa forma, esses resultados em conjunto sugerem que o Ac-SDKP medeia o efeito inibidor do captopril sobre a proliferação de CTH.

Um efeito raro, porém observado desde a década de 80 em pacientes que fazem uso crônico de inibidores da ECA é a redução da concentração de hemoglobina^{82; 83} e do hematócrito⁸⁴, o que se traduz em anemia e leucopenia^{83; 85; 86; 87; 88; 89}. Os mecanismos ainda são obscuros. Com a descoberta dos efeitos da ECA, particularmente o sítio catalítico NH₂-terminal desta enzima, sobre a hidrólise do Ac-SDKP e tendo em mente que este tetrapeptídeo exerce efeito inibitório sobre as CTH, foi sugerido que este poderia ser o elo entre inibidores da ECA e a redução do hematócrito. De fato, Van der Meer et al. observaram em pacientes com insuficiência cardíaca crônica que eram tratados com inibidores da ECA e apresentavam anemia não explicada, apresentavam atividade reduzida da ECA no soro em comparação com pacientes não-anêmicos⁹⁰. Além disso, a incubação do soro destes pacientes inibia a proliferação de CTH provenientes da medula óssea de sujeitos saudáveis. A concentração plasmática do Ac-SDKP era elevada nos pacientes que faziam uso dos inibidores da ECA e se correlacionava negativamente com a proliferação de CTH. A concentração de Ang II, que induz a proliferação de CTH^{59; 60}, não era diferente entre os pacientes tratados com inibidores da ECA em comparação com aqueles que não eram tratados. Este resultado sugere que a inibição da hidrólise do Ac-SDKP pelos inibidores da ECA, aumenta a concentração deste tetrapeptídeo no plasma, o que estaria relacionado com a inibição da hematopoiese e redução do hematócrito nesses pacientes.

Uma vez que a inibição da ECA pode apresentar essa distinção sobre a síntese de Ang II e a hidrólise do Ac-SDKP, buscamos estudos que tivessem investigado a efetividade dos diferentes inibidores da ECA sobre essas duas funções da enzima. Michaud et al. demonstraram que diferentes inibidores da ECA apresentam distinção na inibição da clivagem de Ang I e Ac-SDKP⁹¹. Estes autores observaram que para a inibição destes substratos fisiológicos, o captopril é cerca de 16 vezes mais potente para a inibição da hidrólise de Ac-SDKP em comparação com a hidrólise de Ang I. Já o lisinopril é igualmente potente em inibir

a hidrólise desses dois substratos enquanto o fosinoprilato é 6 vezes mais eficiente em inibir a clivagem da hidrólise do Ac-SDKP em comparação à hidrólise da Ang I⁹¹.

Devido ao fato do captopril apresentar uma seletividade parcial para a inibição da hidrólise do Ac-SDKP em comparação a da Ang I em cultura celular, Junot et al.^{92; 93} realizaram uma série de estudos que buscaram mostrar se também *in vivo* o captopril inibiria seletivamente a hidrólise do Ac-SDKP. Captopril na dose de 0,01 a 10 mg/kg foi administrado intravenosamente em ratos espontaneamente hipertensos e as concentrações urinárias e plasmáticas de Ac-SDKP foram medidas após 90 min. A atividade do SRA foi avaliada por meio da atividade da ECA, concentração da renina plasmática e pressão arterial sistêmica⁹². Foi observado que as doses de 0,01 a 0,03 mg/kg inibiam seletivamente a hidrólise do Ac-SDKP sem apresentar efeitos importantes sobre o SRA. Posteriormente, Junot et al. mostraram que o tratamento de ratos por via oral por 2 semanas com captopril na dose de 3, 10 ou 30 mg/kg por dia elevava a concentração de Ac-SDKP de maneira dose-dependente no plasma, urina, rim e pulmão, não sendo alteradas as concentrações na medula óssea e baço. Apenas a dose de 30 mg/kg alterava significativamente a concentração plasmática de renina. Com a utilização da dose de 10 mg/kg a concentração plasmática de Ac-SDKP era elevada de 3 a 5 vezes não havendo diferença estatística em comparação com a dose de 30 mg/kg⁹³. Em conjunto, esses resultados mostram que a administração de captopril (10 mg.kg⁻¹.dia⁻¹) pode inibir seletivamente a hidrólise do tetrapeptídeo Ac-SDKP *in vivo* sem alterar sobremaneira o SRA.

Tendo em vista que o treinamento físico atua na medula óssea estimulando a proliferação das CTH, o que se traduz em reticulocitose e redução na meia-vida das hemácias; sabendo que o SRA atua no sistema hematopoiético, por meio do sítio catalítico NH₂-terminal da ECA, que inativa o tetrapeptídeo, hemorregulador negativo, Ac-SDKP, investigamos no presente estudo se o mecanismo pelo qual o treinamento físico atua sobre o sistema hematopoiético seria por meio da inativação do Ac-SDKP por alteração na atividade do sítio catalítico NH₂-terminal da ECA.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi verificar a participação do SRA sobre as adaptações eritropoiéticas induzidas pelo treinamento físico aeróbico.

Para tanto, tivemos como objetivos específicos analisar:

- 1) Qual protocolo de treinamento físico aeróbico seria o mais adequado para estudar as adaptações no sistema eritropoiético e as alterações no SRA.

Posteriormente, com base nos resultados obtidos, investigamos os efeitos do treinamento físico com concomitante inibição do sítio NH₂-terminal da ECA sobre:

- 2) A atividade da ECA e de seus dois sítios catalíticos no plasma e na fração extracelular da medula óssea;
- 3) A concentração de Ang II e de Ac-SDKP no plasma e na medula óssea e a de eritropoietina no plasma;
- 4) O número e proliferação das CTH e;
- 5) A reticulocitose, o hematócrito e a meia-vida das hemácias.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Ratas Wistar normotensas (190-220 g, n = 70) foram utilizadas e manipuladas de acordo com as diretrizes institucionais aprovadas. Os animais foram alojados em 3-4 por gaiola em uma temperatura ambiente de 22°C, com um ciclo de 12 horas claro-escuro e alimentados com ração padrão com acesso à água ou à droga *ad libitum*. Todos os protocolos e os procedimentos cirúrgicos utilizados foram de acordo com as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (protocolo 2008/41).

Optamos por utilizar fêmeas pelo fato de estudos anteriores mostrarem maior grau de adaptação em resposta ao treinamento físico⁹⁴, e termos observado em estudo piloto que o aumento no percentual de reticulócitos circulantes ocorria em fêmeas em resposta ao treinamento físico. Portanto, o uso de fêmeas teve a finalidade de dar continuidade aos estudos anteriores já conduzidos pelo nosso laboratório e melhor explorar os resultados encontrados previamente.

4.2 Série de experimentos 1.

A fim de determinar qual o protocolo de treinamento físico seria o mais adequado para estudar as adaptações eritropoiéticas, foi realizada a seguinte série de experimentos. Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais: grupo controle (C, n = 16), treinados sob o protocolo 1 (T1, n = 14) e treinados sob o protocolo 2 (T2, n = 13).

4.3 Protocolos de treinamento físico.

Protocolo 1 (T1): Sessões de natação de duração de 60 min, 5 dias por semana, durante 10 semanas com uma sobrecarga, com 5% do peso corporal, ligada à cauda. A sobrecarga foi ajustada semanalmente.

Protocolo 2 (T2): Animais submetidos ao protocolo de treinamento T2 realizaram um protocolo de treinamento de natação semelhante ao protocolo de T1 até o final da semana 8. Na 9^a semana, treinaram duas vezes ao dia, sessões de duração de 60 min, com 6 horas de intervalo entre cada sessão. Na 10^a semana eles treinaram três vezes por dia, com sessões de natação com duração de 60 minutos com 4 horas de intervalo entre cada sessão. Este protocolo

foi utilizado anteriormente em nosso laboratório e tem mostrado maior grau de adaptações funcionais, bioquímicas e fisiológicas nos animais².

A duração e a carga de trabalho foram aumentadas progressivamente até os animais conseguirem nadar durante 60 minutos usando a sobrecarga com 5% do seu peso corporal. Posteriormente, a duração do exercício e sobrecarga foram mantidas constantes. Estima-se que ratos nadando sozinhos com essa carga realizam um trabalho que corresponde a aproximadamente 50-65% de suas capacidades aeróbicas máximas⁹⁵. Todos os animais foram pesados uma vez por semana e a carga ajustada para 5% do peso corporal. Os grupos sedentários foram colocados na piscina durante 10 minutos duas vezes por semana, sem a sobrecarga para simular o estresse associado ao protocolo experimental.

4.4 Série de experimentos 2.

Para estudar o papel desempenhado pelo SRA, mais especificamente, pelo sítio NH₂-terminal da ECA, nas adaptações eritropoiéticas ao treinamento físico, dividimos os animais em 4 grupos: grupo controle (C, n = 24), controle tratados com captopril (C-Cap, n = 25), treinados sob o protocolo T2 (T2, n = 21) e treinados tratados com captopril (T2-Cap, n = 20). Para a série de experimentos 2, os animais foram treinados de acordo com o protocolo de treinamento T2. O captopril (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, EUA) foi dado na água de beber na dose de 10 mg.kg⁻¹.dia⁻¹, assumindo que os animais consomem 40 ml de água por dia.

4.5 Teste progressivo em esteira.

A capacidade de realizar exercício, estimada pela distância total percorrida e pelo tempo total de exercício, foi avaliada por meio de um protocolo de teste progressivo em esteira para ratos. Depois de serem adaptados para exercícios em esteira durante 1 semana (10 minutos de sessão de exercício), os animais foram colocados sobre a esteira em raias individuais e permaneceram em repouso para se adaptarem por um período de pelo menos 30 min. A velocidade da esteira iniciou-se em 6 m/min e depois disso foram realizados aumentos de 3 m/min a cada 3 minutos até a exaustão. Os grupos realizaram o teste de esforço progressivo em esteira antes e depois do período experimental. Embora os animais tenham realizado o treinamento de natação, optamos por realizar o teste em esteira por dois motivos; 1) não existe teste máximo padronizado em piscina para ratos e; 2) caso optássemos por realizar um teste

na piscina, o fato de os animais treinados terem maior vivência na natação poderia se refletir em resultados não condizentes apenas às adaptações ao treinamento, mas também ao aprendizado em si. Por isso, fizemos a opção por um teste em esteira já padronizado no nosso laboratório, que é sensível ao estado de treinamento em resposta ao treino de natação e que não teria a influência da aprendizagem diferenciada entre os grupos treinados e sedentários, uma vez que ambos foram adaptados à esteira por igual período de tempo.

4.6 Consumo máximo de oxigênio.

O consumo de oxigênio (VO_2) foi medido por meio de análise de gases expirados durante o exercício progressivo em esteira descrito acima. A análise de gás foi realizada utilizando um analisador de oxigênio e dióxido de carbono (SS3 Sable Systems, analisador O₂/CO₂ FC-10, NV, EUA). VO_2 foi calculado usando o fluxo de ar através da câmara metabólica, a fração expirada de oxigênio e fração de oxigênio no ar ambiente, de acordo com a seguinte fórmula: VO_2 (mlO₂. kg⁻¹. min⁻¹) = $VEc (FiO_2 - FeO_2) / PC$, onde: VEc = Ventilação constante (ml/min) = Fluxo da bomba de sucção; FiO_2 = Fração inspirada de O₂; FeO_2 = Fração expirada de O₂; PC = Peso corporal do animal (kg).

4.7 Medidas Cardiovasculares.

A pressão caudal sistólica, diastólica e média e a frequência cardíaca foram medidas nos animais conscientes e em repouso, através da utilização de um sistema informatizado (BP2000, Visitech Systems, Inc., Apex, NC, EUA). Os animais foram aclimatados ao aparelho durante quatro dias, uma semana antes do início e uma semana antes do término do período de treinamento. A pressão sanguínea e a frequência cardíaca foram determinadas antes e após o protocolo de treinamento.

4.8 Procedimentos experimentais.

Vinte e quatro horas após a última sessão de treinamento os animais foram mortos com dose letal de pentobarbital sódico (100 mg / kg ip). O sangue venoso foi colhido da veia cava inferior (cerca de 8 mL) e aliquoteado para análises diversas. Coração e sóleo foram retirados, pesados e rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80° C para análises posteriores. Tíbias e fêmures direitos e esquerdos foram retirados para o isolamento da medula óssea.

4.9 Medida da hipertrofia cardíaca.

Para medir a massa cardíaca, o ventrículo esquerdo (VE) foi dissecado e corresponde ao tecido remanescente após a remoção de ambos os átrios e da parede do ventrículo direito (VD). O septo interventricular permaneceu como parte do VE. A hipertrofia cardíaca foi avaliada pela medida da relação entre VE em miligramas e do peso corporal do animal em gramas.

4.10 Medida da atividade da citrato sintase.

Atividade da citrato sintase foi determinada espectrofotometricamente no sóleo direito de acordo com o método de Srere⁹⁶ e utilizada como marcador da atividade oxidativa do músculo. A atividade enzimática foi determinada em homogenatos de músculo e o resultante do complexo da acetil-CoA e oxaloacetato foi determinada em 412 nm a 25° C, durante o período de 10 minutos. A medida de concentração total de proteína do homogenato de músculo foi realizada em duplicata pelo método de Bradford⁹⁷ utilizando padrões de albumina bovina. A atividade da citrato sintase foi então normalizado para o teor de proteína total e expressos em nanomoles por miligrama de proteína por minuto.

4.11 Atividade da ECA.

Um mililitro de sangue venoso foi colhido da veia cava inferior em tubo heparinizado e centrifugado (10.000 g x 20 min, 4° C) e o plasma foi separado e armazenado a -20° C até a análise. A medula óssea foi colhida por meio de lavagem das cavidades centro-medulares do fêmur e da tíbia com 2 mL de salina heparinizada (10 U/mL) e submetida a centrifugação (10.000 g x 20 min, 4° C) e a fração extracelular da medula óssea foi separada e armazenada a -20° C até a análise. A atividade da ECA foi medida no plasma e na fração extracelular da medula óssea. A atividade da ECA foi determinada utilizando substratos FRET contendo orto-aminobenzóico (Abz) e dinitrofenil (DNP) como doador de fluorescência / par receptor, sendo Abz-FRK (Dnp) P-OH para a ECA plasmática, Abz-SDK (Dnp) P-OH para o sítio NH₂-terminal e Abz-LFK (Dnp)-OH para o sítio COOH-terminal^{6; 98}. A metodologia foi adaptada para um formato de leitura de fluorescência para placa de 96 poços. Resumidamente, 5 µL de plasma ou 20 µL da fração extracelular da medula óssea foram incubados separadamente com 10 mM de substratos específicos a 37° C em 0,1 M Tris-HCl, pH 7,0, contendo NaCl 50 mM e

10 mM $ZnCl_2$, em um volume final de 200 mL. A atividade enzimática foi monitorada continuamente em um espectrofluorímetro de placa de microtitulação automatizado ($k_{ex} = 320$ nm; $k_{em} = 420$ nm), equipado com um dispositivo de controle de temperatura e um agitador de placa. Placas de poliestireno preto de 96 poços com fundo chato foram utilizadas e analisadas usando a versão 5.0 do software Grafit (Erithacus Software Ltd., Horley, Surrey, Reino Unido). A atividade da ECA foi expressa como % do grupo C.

4.12 Medida da concentração de AcSDKP.

Um mililitro de sangue venoso foi colhido da veia cava inferior em tubos heparinizados contendo captopril (concentração final 10^{-5} M) e o plasma foi separado após centrifugação (10.000 g x 20 min, 4° C). A medula óssea do fêmur e da tíbia foi lavada com DMEM-low com captopril (concentração final 10^{-5} M) e centrifugado (10.000 g x 20 min, 4° C) para o isolamento da fração extracelular. Para medidas de Ac-SDKP, o sobrenadante obtido pela centrifugação das amostras tratadas com metanol (1/3 ml) foi colhido, evaporado e reconstituído em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) contendo 0,1% BSA, azida de sódio 0,001%, 2,3 % de NaCl e 0,2% de EDTA. As concentrações plasmáticas e da fração extracelular da medula óssea de Ac-SDKP foram determinadas por um teste imunoenzimático competitivo comercialmente disponível (Spi-Bio, Massy, França).

4.13 Medida da concentração de Ang II.

Dois mililitros de sangue venoso da veia cava inferior e a medula óssea do fêmur e tíbia foram colhidos com uma mistura de coquetel de inibidores (o-fenantrolina 0,44 mM, EDTA 25 mM, 1mM de ácido p-hidroxi-mercuribenzoic e pepstatin A 0,12 mM e PMSF 1 mM) e centrifugados (10.000 g x 20 min, 4° C). O sobrenadante foi armazenado a -80° C até a análise. As amostras foram passadas por colunas de phenylsilica (colunas Sep-Pak C18; Waters, Milford, MA, EUA) e angiotensina retida foi eluída com metanol. O eluato foi seco em centrífuga a vácuo e o precipitado foi ressuspenso em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) contendo 0,1% BSA, azida de sódio 0,001%, 2,3 % de NaCl e 0,2% de EDTA, misturado e centrifugado a 3.000 g por 10 min a 4° C. As concentrações de Ang II foram determinadas por EIA, de acordo com as instruções do fabricante (Spi-Bio, Massy, França). A concentração de Ang II foi expressa em pg Ang II.mL⁻¹.

4.14 Medida da concentração de eritropoietina.

A eritropoietina (Epo) foi medida no plasma heparinizado por um kit de ELISA comercialmente disponível (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Resumidamente, o sangue venoso foi colhido da veia cava inferior em tubos heparinizados e após centrifugação (10.000 g x 20 min, 4 ° C), o plasma foi armazenado a -80° C até a análise.

4.15 Isolamento de células mononucleares da medula óssea e do sangue periférico.

A medula óssea foi colhida por meio de lavagem das cavidades centro-medulares do fêmur e da tíbia com Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, New York, NY, EUA) a 4° C. A medula óssea e 4 ml de sangue heparinizado foram cuidadosamente colocados sobre Ficoll-Paque PREMIUM 1,077/mL (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, EUA) e centrifugados a 700 g por 30 minutos em temperatura ambiente para o isolamento de células mononucleares. A camada superior, que representa a fração extracelular da medula óssea e o plasma heparinizado, foi colhida e armazenada em -80° C para análises diversas. As células mononucleares foram colhidas e lavadas duas vezes em PBS a 4° C e contadas utilizando um hemocitômetro. A viabilidade celular foi avaliada com solução de azul de Trypan (4%, Sigma-Aldrich Corp St. Louis, MO, EUA) e foi sempre >95%.

4.16 Enumeração de células tronco hematopoéticas por citometria de fluxo.

Para enumerar as CTH no sangue periférico e na medula óssea, células 1×10^6 foram lavadas em PBS a 4° C, 10% de soro bovino fetal, azida de sódio a 1% e após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado. As células foram coradas no escuro por 30 min a 4° C, com os anticorpos: anti-CD34-FITC (Santa Cruz, ICO115, SC-7324 FITC, Santa Cruz, CA, EUA) e anti-CD45-PE (Santa Cruz, 2Q1763, sc-70698 PE, Santa Cruz, CA, EUA). Controles isotípicos Ig negativos foram utilizados (BD, RAT IgG2a KPA ITCL FITC MAB e RAT IgG2a KPA ITCL PE MAB, Franklin Lakes, NJ, EUA). As células foram lavadas 3X por centrifugação a 400 g por 5 minutos e ressuspensas em 500 µl a 1ml de PBS a 4° C, 10% de soro bovino fetal e azida de sódio a 1% e fixados em paraformaldeído a 1%, antes da análise em um FACS Calibur (Becton- Dickinson, Heidelberg, Alemanha). CTH foram analisadas de acordo com o método ISHAGE^{35; 99; 100}. Os dados são apresentados como o número de células CD34+CD45dim por 100.000 aquisições menos o número de células marcadas com o controle

isotípicos. O software Cell Quest Pro (Becton-Dickinson, Heidelberg, Alemanha) foi utilizado para avaliação quantitativa dos *blots* do FACS.

4.17 Proliferação de células tronco hematopoéticas em meio de metilcelulose.

Para realizar o ensaio de proliferação, 1×10^5 células mononucleares da medula óssea e 1×10^6 células mononucleares de sangue periférico foram ressuspendidas em meio modificado de Iscove Dulbecco contendo soro bovino fetal (50%) e colocadas em cultura (37°C e 5% CO_2) em duplicata em meio de metilcelulose (1,3%), soro bovino fetal (25%), albumina de soro bovino (2%), L-glutamina (2mm), 2-Mercaptoetanol ($5 \times 10^{-5} \text{M}$), fator de célula tronco humano recombinante (50 ng/mL), GM-CSF humano recombinante (20 ng/mL), G-CSF recombinante humano (20 ng/mL), IL-3 recombinante humana (20 ng/mL), IL-6 recombinante humana (20 ng/mL) e Epo recombinante humana (3 IU/mL). Todos os reagentes foram da R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA). Este método permite a avaliação de 6 tipos de colônias: unidades formadoras de colônias-eritróides (UFC-E), unidades formadoras de colônias de alta capacidade proliferativa-eritróides (BFU-E), unidades formadoras de colônias-granulócitos (UFC-G), unidades formadoras de colônias-macrófagos (UFC-M), unidades formadoras de colônias-granulócitos, macrófagos (UFC-GM) e unidades formadoras de colônias-granulócitos, macrófagos, eritrócitos, magacariócitos (UFC-GEMM). As colônias foram contadas nos dias 14 a 20 de cultura sob um microscópio invertido. Os dados estão expressos como o número de colônias por cm^2 .

4.18 Contagem de reticulócitos e hematócrito.

Após colheita com anticoagulante citrato de sódio 0,5%, 100 μL de sangue foi misturado com 100 μL de azul cresil brilhante. A mistura foi aquecida por 20 min em banho-maria a 37°C e foi feito o esfregaço sobre uma lâmina de vidro. Reticulócitos foram contados por 1000 eritrócitos com imersão em óleo sob o microscópio e são apresentados como % de eritrócitos. O hematócrito foi medido em triplicata com uma centrífuga de microhematócrito.

4.19 Medida do conteúdo sanguíneo de 2,3 DPG.

O conteúdo sanguíneo de 2,3 DPG foi medido utilizando um kit enzimático comercialmente disponível de acordo com as instruções do fabricante (Roche Applied

Science, Mannheim, Alemanha). Resumidamente, um dia antes de os animais serem mortos o sangue foi colhido por meio de um corte da ponta da cauda em tubos heparinizados resfriados. Cem microlitros de sangue foram misturados com 500 μL de ácido perclórico (0,6 M) e centrifugado (10.000 g por 10 min a 4° C). Quatrocentos microlitros do sobrenadante incolor foram neutralizados com carbonato de potássio (2,5 M) e mantidos 60 minutos em gelo. Depois que a mistura foi centrifugada (10.000 g por 10 min a 4° C), 0,1 ml do sobrenadante foi utilizado para o ensaio.

4.20 Avaliação da meia vida das hemácias.

Duas semanas antes do final do protocolo de treinamento, os animais foram anestesiados com uma mistura de halotano (2%) em oxigênio (100%), e um cateter de polietileno (PE-10 ligado a PE-50, Clay Adams, Parsippany, NJ, EUA) foi introduzido na veia femoral. O cateter foi encapsulado por via subcutânea e exteriorizado na parte de trás do pescoço do animal. Todos os procedimentos foram realizados com instrumental e soluções estéreis. A cânula foi preenchida com uma solução salina de lavagem contendo heparina de 10 U/mL, a penicilina G 2000 U/mL e esta solução foi trocada diariamente. Os animais tiveram de 3 a 4 dias para se recuperar da cirurgia, período após o qual o protocolo de treinamento foi retomado. Este procedimento não alterou a capacidade de nadar, nem afetou as adaptações cardíacas e funcionais dos animais para o protocolo de treinamento (dados não mostrados). Durante a última semana de treinamento, a meia vida das hemácias foi medida utilizando-se a técnica do Cromo⁵¹ (⁵¹Cr). Resumidamente, 500 μL de sangue foram colhidos e incubados com 50 μL de ⁵¹Cr por 15 min a 37° C. Em seguida, 100 μL de ácido cítrico foram adicionados e a mistura incubada por 15 min a 37° C. Essa amostra foi reinjetada no animal pela veia da cauda e as amostras de sangue foram colhidas após 10 min, 24, 48, 96 e 144 h após a re-injeção para o cálculo da meia vida das hemácias.

4.21 Análise estatística.

A análise dos dados foi realizada usando o software SigmaStat (versão 3.1, SigmaStat, Systat, Richmond, CA, EUA). Primeiramente, a normalidade da distribuição dos dados foi testada por meio do teste Kolmogorov-Smirnov. Todas as variáveis estudadas apresentaram distribuição normal, portanto, análises paramétricas foram realizadas e a média e erro padrão

da média (EPM) foram calculados. Foi realizada análise de variância de uma via (protocolo de treinamento) e de duas vias (estado de treinamento x inibição do NH₂-terminal da ECA). Teste de *post hoc* de Tukey foi utilizado para comparações individuais entre as médias, quando uma diferença significativa foi observada com a análise de variância. A análise de correlação linear entre as variáveis foi calculada pelo produto de correlação de momento de Pearson. O valor alfa adotado foi de 5%.

5. RESULTADOS

5.1 Série de experimentos 1.

Nesse primeiro conjunto de experimentos investigamos qual protocolo de treinamento seria o mais adequado para estudar as adaptações eritropoiéticas e se o SRA seria alterado neste protocolo.

5.1.2 Parâmetros hemodinâmicos.

Não houve diferença nas pressões arteriais caudais sistólica, diastólica e média entre os grupos (Tabela 1).

5.1.3 Parâmetros de treinamento.

A tabela 1 mostra os resultados dos parâmetros de treinamento físico analisados. Não houve diferença no peso corporal dos animais antes ou depois do treinamento físico. A comparação pré versus pós período de treinamento mostraram que ambos os grupos treinados apresentaram aumento significativo em seu tempo total de exercício e distância total percorrida no teste máximo em esteira, enquanto C não apresentou melhora. Os animais do grupo T2 apresentaram maior aumento em seu tempo total de exercício e na distância total percorrida no teste máximo em esteira em relação aos animais do grupo T1. O consumo máximo de oxigênio foi maior em ambos os grupos T1 e T2 após os períodos de treinamento em relação ao C. Os animais dos grupos T1 e T2 apresentaram maior hipertrofia do ventrículo esquerdo (razão peso do ventrículo esquerdo/peso corporal) em comparação com C. Além disso, os animais do grupo T2 apresentaram maior hipertrofia do VE em comparação com os animais do grupo T1. A bradicardia foi observada em ambos os grupos T1 e T2 em relação ao C. Atividade da citrato sintase foi maior em ambos os grupos T1 e T2 em relação ao C. Em conjunto, estes resultados mostram que os protocolos de treinamento promoveram adaptações fisiológicas, bioquímicas, morfológicas e funcionais esperadas em resposta a um protocolo de treinamento físico. Além disso, os animais do grupo T2 mostraram adaptações mais acentuadas em comparação aos animais do grupo T1.

Tabela 1 – Peso corporal, pressão arterial caudal sistólica, diastólica e média, frequência cardíaca, consumo máximo de oxigênio, tempo total de exercício e distância total percorrida no teste máximo em esteira, hipertrofia cardíaca e atividade da citrato sintase nos animais controle (C), nos que realizaram treinamento de 10 semanas uma vez ao dia (T1) e nos que realizaram treinamento de 8 semanas uma vez por dia, seguido de uma semana 2 vezes ao dia e uma semana 3 vezes ao dia (T2).

	C		T1		T2	
	Pré-treino	Pós-treino	Pré-treino	Pós-treino	Pré-treino	Pós-treino
Peso corporal (g)	210,1 ± 5,5	242,8 ± 4,9	208,9 ± 2,4	248,4 ± 3,7	211,7 ± 3,8	249,7 ± 3,1
Pressão arterial caudal sistólica (mmHg)	127,5 ± 2,1	127,8 ± 2,5	126,8 ± 1,9	127,3 ± 2,1	124,1 ± 2,1	123,7 ± 2,9
Pressão arterial caudal diastólica (mmHg)	84,9 ± 2,9	83,2 ± 1,1	84,7 ± 1,0	85,8 ± 2,5	84,7 ± 1,9	84,6 ± 1,8
Pressão arterial caudal média (mmHg)	99,1 ± 2,7	98,1 ± 1,4	98,7 ± 1,5	99,6 ± 2,2	97,8 ± 1,8	97,6 ± 2,6
Frequência cardíaca (bpm)	352 ± 5	348 ± 4	355 ± 6	305 ± 5*§	348 ± 4	298 ± 5 *§
Consumo máximo de oxigênio (mLO ₂ .kg ⁻¹ .min ⁻¹)	71 ± 4	66 ± 5	72 ± 4	78 ± 4 *§	71 ± 3	81 ± 2*§
Tempo total de exercício (min)	27 ± 2	29 ± 3	26 ± 3	34 ± 2 *§	25 ± 1	36 ± 3 *#§
Distância total percorrida (m)	620 ± 120	700 ± 130	710 ± 80	1030 ± 60 *§	660 ± 70	1300 ± 150 *#§
Hipertrofia cardíaca (% de C)	-	-	-	14 ± 4 *	-	36 ± 8 *#
Atividade da citrato sintase (μmol.mg ⁻¹ .min ⁻¹)	-	56,1 ± 5,3	-	80,4 ± 8,2 *	-	120,3 ± 18,8 *#

Valores mostrados como média ± EPM. *p<0,05 vs. C; #p<0,05 vs. T1; §p<0,05 vs. pré-treino.

5.1.4 Atividade da ECA.

As atividades da ECA e dos seus sítios ativos, NH₂- e COOH-terminal, foram dosadas no plasma e na fração extracelular da medula óssea. A atividade da ECA plasmática é mostrada na figura 3A, C e E. Para todas as análises, houve aumento no grupo T2 em relação aos grupos C e T1 e o grupo T1 não apresentou aumento da atividade em comparação com C. A figura 3B, D e F apresentam os resultados para a atividade da ECA na fração extracelular da medula óssea. O treinamento aumentou a atividade do sítio NH₂-terminal da ECA apenas no grupo T2, e as atividades da ECA e do sítio COOH-terminal não foram afetados por nenhum dos protocolos.

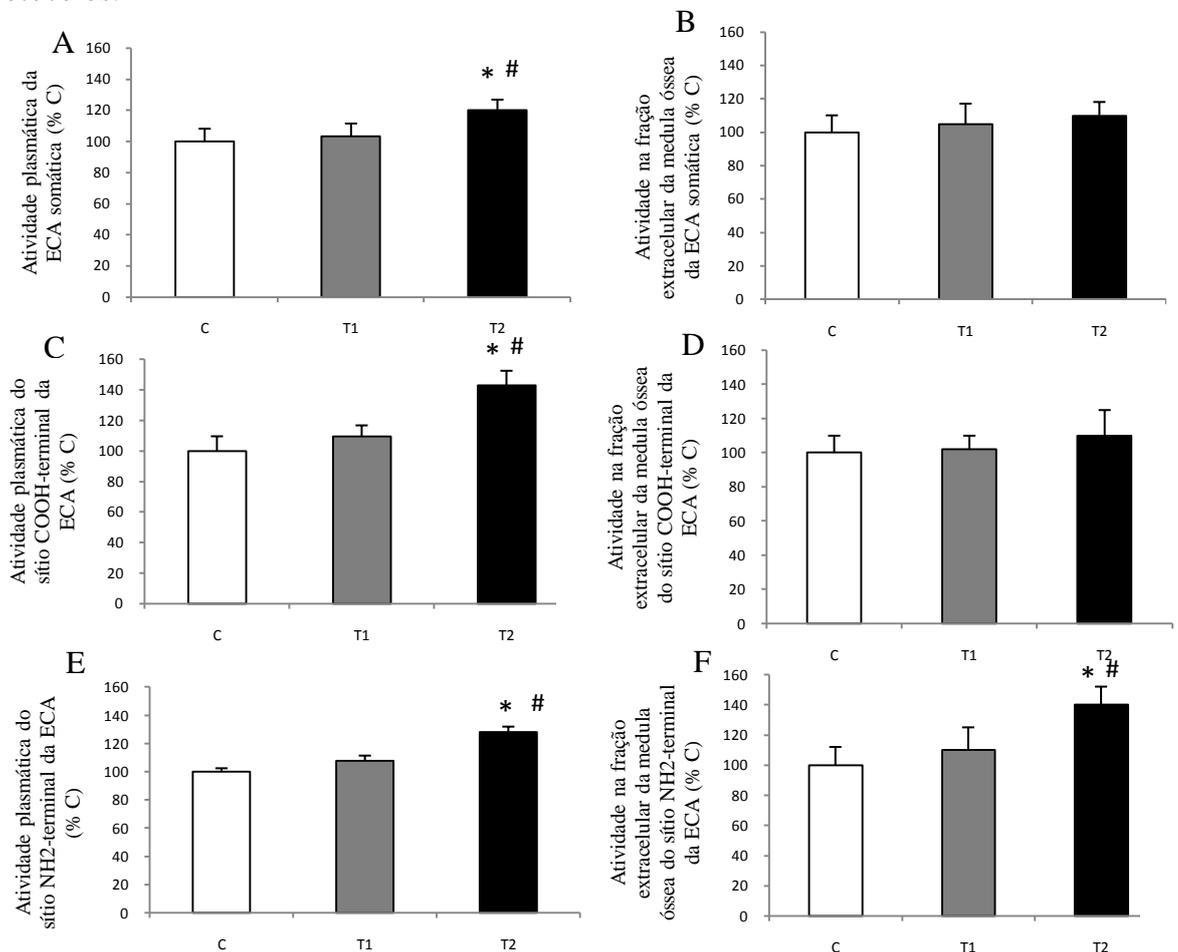


Figura - 3 Atividade plasmática e na fração extracelular da medula óssea da ECA e dos sítios COOH-terminal e NH₂-terminal da ECA nos animais controle (C), nos que realizaram treinamento de 10 semanas uma vez ao dia (T1) e nos que realizaram treinamento de 8 semanas uma vez por dia, seguido de uma semana 2 vezes ao dia e uma semana 3 vezes ao dia (T2). Dados estão mostrados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. C; # $p < 0,05$ vs. T1.

5.1.5 Medida das concentrações de Ac-SDKP e Ang II.

As concentrações de Ac-SDKP e de Ang II foram medidas no plasma e na fração extracelular da medula óssea e estão mostradas na figura 4. Figura 4A e B mostra que T2 reduziu as concentrações plasmática e da fração extracelular da medula óssea de Ac-SDKP em comparação com C e T1 tanto no plasma quanto na fração extracelular da medula óssea. A Figura 4C mostra que houve um aumento na concentração plasmática de Ang II no grupo T2, em comparação com C e T1 e 4D mostra a figura que não houve diferença na concentração de Ang II na fração extracelular da medula óssea entre os grupos.

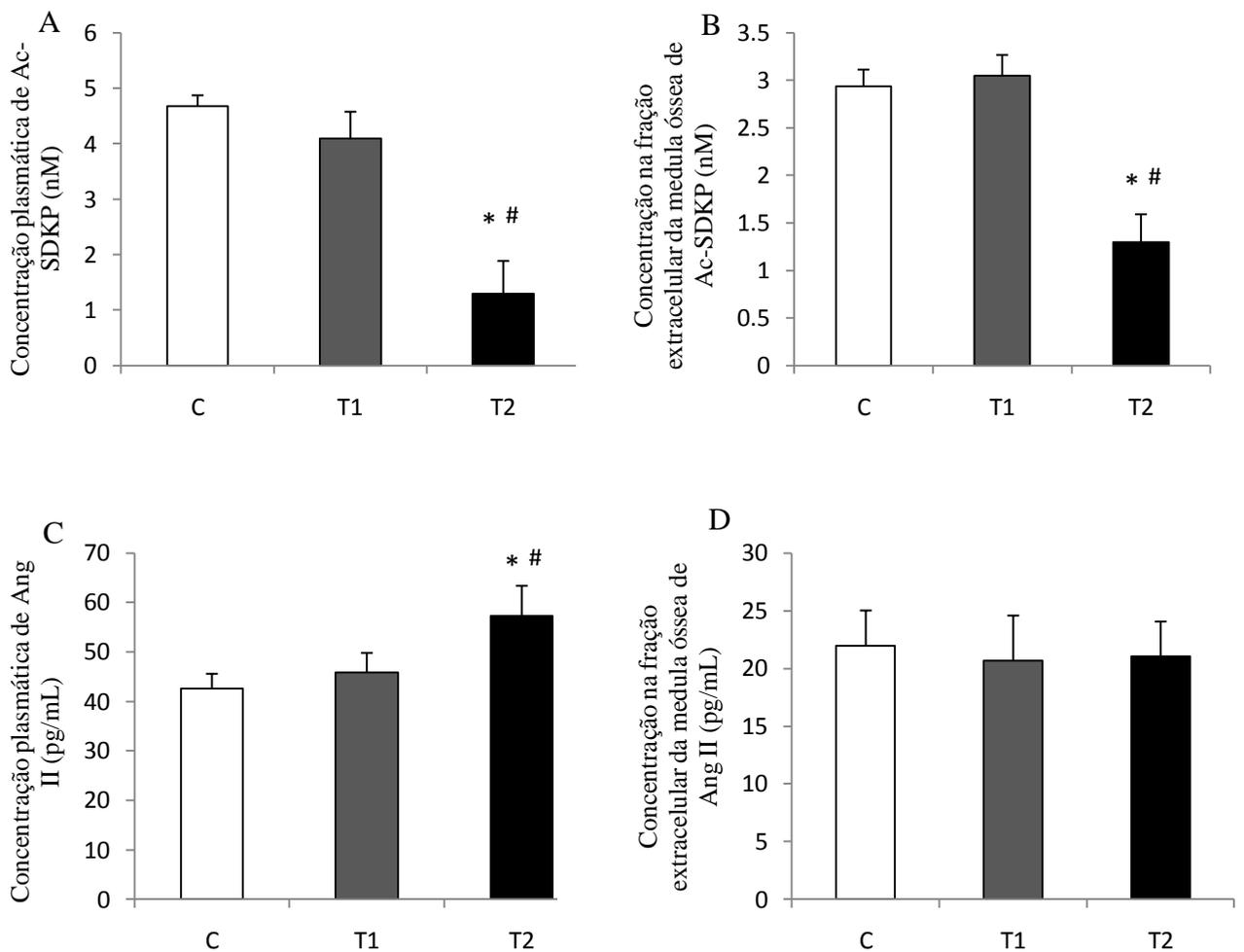


Figura 4 – Concentração plasmática e na fração extracelular da medula óssea de Ac-SDKP e de Ang II nos animais controle (C), nos que realizaram treinamento de 10 semanas uma vez ao dia (T1) e nos que realizaram treinamento de 8 semanas uma vez por dia, seguido de uma semana 2 vezes ao dia e uma semana 3 vezes ao dia (T2). Dados estão mostrados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. C; # $p < 0,05$ vs. T1.

5.1.6 Medida da concentração plasmática de Epo.

A concentração plasmática de Epo foi aumentada no grupo T2 em relação aos grupos C e T1 (Figura 5).

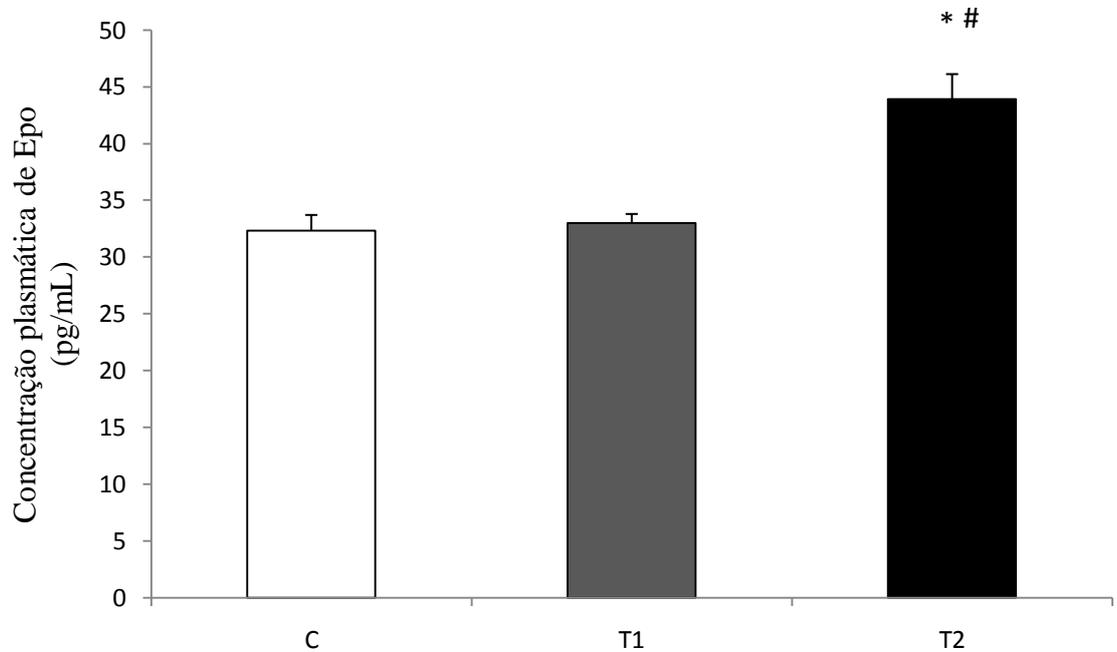


Figura - 5 Concentração plasmática de Epo nos animais controle (C), nos que realizaram treinamento de 10 semanas uma vez ao dia (T1) e nos que realizaram treinamento de 8 semanas uma vez por dia, seguido de uma semana 2 vezes ao dia e uma semana 3 vezes ao dia (T2). Dados estão mostrados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. C; # $p < 0,05$ vs. T1.

5.1.7 Enumeração de células tronco hematopoiéticas por citometria de fluxo.

A Figura 6 mostra que o protocolo de treinamento T2 aumentou o número de CTH tanto no sangue (A) quanto na medula óssea (B) dos animais em comparação com o grupo C, enquanto o protocolo T1 não induziu qualquer mudança significativa no número de CTH nesses locais. Além disso, o aumento percentual de CTH no sangue foi maior do que a porcentagem de aumento das CTH na medula óssea.

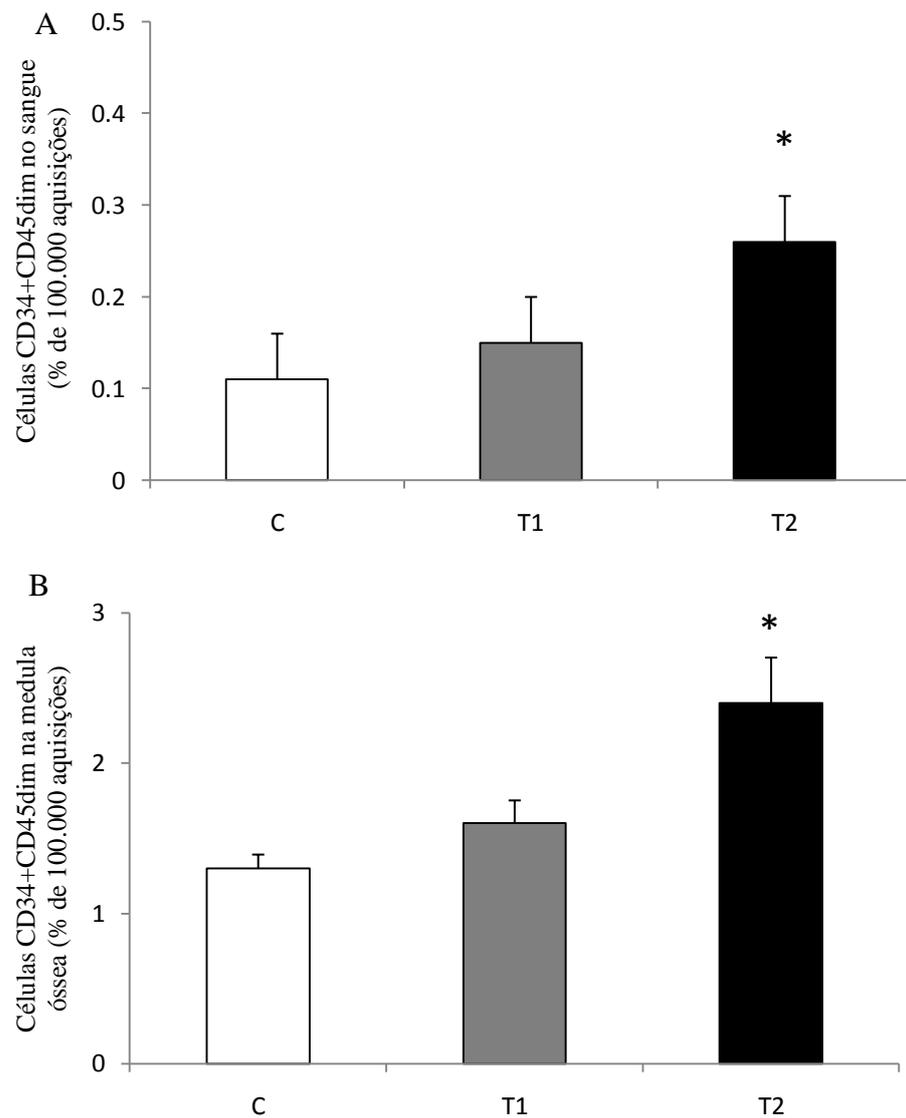


Figura - 6 Células CD34+CD45dim no sangue (A) e na medula óssea (B) nos animais controle (C), nos que realizaram treinamento de 10 semanas uma vez ao dia (T1) e nos que realizaram treinamento de 8 semanas uma vez por dia, seguido de uma semana 2 vezes ao dia e uma semana 3 vezes ao dia (T2). Dados estão mostrados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. C.

5.1.8 Proliferação de células tronco hematopoiéticas em meio de metilcelulose.

Os resultados do ensaio clonogênico do sangue estão mostrados na Figura 7. Em comparação com o grupo C, o grupo T2 mostrou um aumento de 4 vezes em BFU-E (A), aumento de 3,5 vezes no UFC-E (B), aumento de 1,5 vezes no UFC-GM (C) e um aumento de 2,5 vezes no UFC-GEMM (D). Diferenças em UFC-G e UFC-M não alcançaram significância estatística (dados não mostrados). O grupo T1 não apresentou diferença nos ensaios clonogênicos em comparação com C. Os resultados dos ensaios clonogênicos da medula óssea foram semelhantes aos do sangue (dados não mostrados).

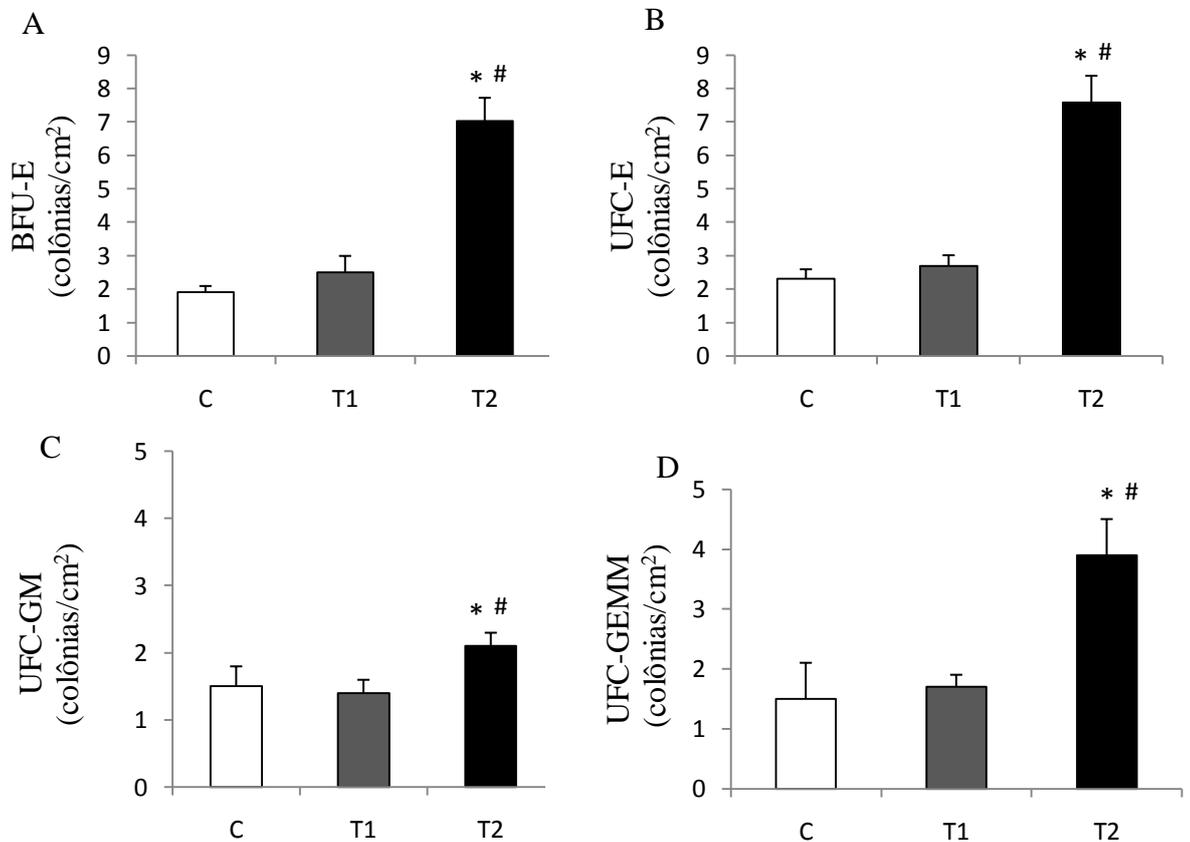


Figura – 7 Unidades formadoras de colônias de alta capacidade proliferativa-eritróide (BFU-E, A), unidades formadoras de colônias-eritrócitos (UFC-E, B) unidades formadoras de colônias-granulócitos, macrófagos (UFC-GM, C), e unidades formadoras de colônias-granulócitos, eritrócitos, macrófagos e megacariócitos (UFC-GEMM, D) no sangue dos animais controle (C), dos que realizaram treinamento de 10 semanas uma vez ao dia (T1) e dos que realizaram treinamento de 8 semanas uma vez por dia, seguido de uma semana 2 vezes ao dia e uma semana 3 vezes ao dia (T2). Dados estão mostrados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. C; # $p < 0,05$ vs. T1.

5.1.9 Hematócrito, hemoglobina, reticulócitos e 2,3 DPG.

A Tabela 2 apresenta os resultados de hematócrito, concentração de hemoglobina, número de eritrócitos, porcentagem de reticulócitos e conteúdo sanguíneo de 2,3 DPG. Não houve diferença entre os grupos no hematócrito, apesar de uma tendência de redução ter sido observada no grupo T2 em relação ao grupo C ($p = 0,08$). A concentração de hemoglobina e o número de eritrócitos não diferiram entre os grupos. O percentual de reticulócitos é o parâmetro mais comumente usado para avaliar a estimulação da medula óssea e observamos que o protocolo de treinamento T2 levou a maior porcentagem de reticulócitos no sangue, em comparação com o C, enquanto não houve diferença entre os grupos C e T1. Eritrócitos jovens, como reticulócitos, têm um teor mais elevado de 2,3 DPG, e protocolos de treinamento intenso parecem aumentar o conteúdo sanguíneo de 2,3 DPG²¹. Os resultados mostram que o protocolo T2 foi capaz de aumentar os níveis de 2,3 DPG, em comparação com o C, e não foi observada diferença entre os grupos C e T1.

Tabela 2 – Hematócrito, concentração sanguínea de hemoglobina, número de eritrócitos, percentual de reticulócitos e conteúdo sanguíneo de 2,3 DPG nos animais controle (C), nos que realizaram treinamento de 10 semanas uma vez ao dia (T1) e nos que realizaram treinamento de 8 semanas uma vez por dia, seguido de uma semana 2 vezes ao dia e uma semana 3 vezes ao dia (T2).

	C	T1	T2
Hematócrito (%)	40 ± 2	40 ± 1	39 ± 1
Hemoglobina (g/dL)	14 ± 1	14 ± 2	15 ± 2
Eritrócitos (10 ⁶ /mm ³)	7,3 ± 0,4	7,0 ± 0,3	6,9 ± 0,4
Reticulócitos (%)	0,8 ± 0,4	2,1 ± 1,0	5,3 ± 1,6 *
2,3 DPG (mmol/L de sangue)	2,8 ± 0,2	2,9 ± 0,2	3,2 ± 0,1 *#

Valores mostrados como média ± EPM. * $p < 0,05$ vs. C; # $p < 0,05$ vs. T1.

5.1.10 Avaliação da meia vida das hemácias.

A meia vida das hemácias é mostrada na figura 8. Houve uma redução significativa no tempo médio de vida dos eritrócitos no grupo T2 em relação aos grupos C e T1, enquanto nenhuma alteração foi observada no grupo T1 em comparação com C.

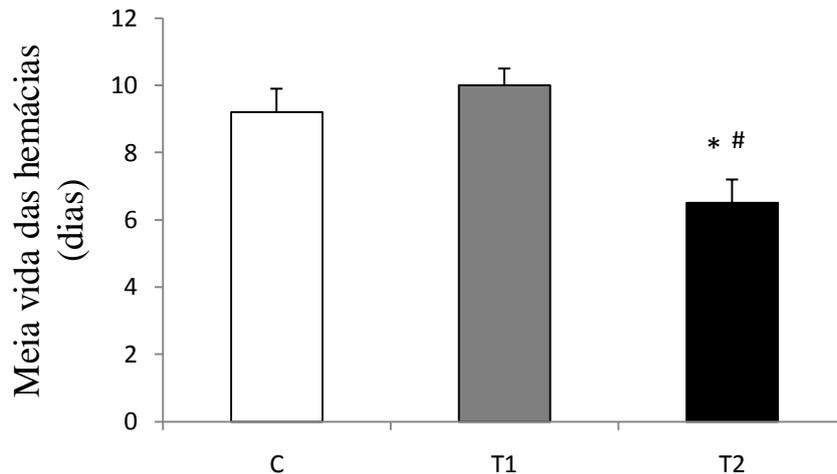


Figura - 8 Meia vida das hemácias nos animais controle (C), nos que realizaram treinamento de 10 semanas uma vez ao dia (T1) e nos que realizaram treinamento de 8 semanas uma vez por dia, seguido de uma semana 2 vezes ao dia e uma semana 3 vezes ao dia (T2). Dados estão mostrados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. C; # $p < 0,05$ vs. T1.

Tomados em conjunto, os resultados mostraram que o protocolo de treinamento T2 promoveu adaptações no sistema eritropoiético nos animais daquele grupo. Observamos um aumento na porcentagem de reticulócitos, conteúdo sanguíneo de 2,3 DPG, redução da meia vida eritrócitos e aumento do número e da capacidade proliferativa de CTH. Além disso, observamos um aumento na atividade no plasma e na medula óssea do sítio NH₂-terminal da ECA, juntamente com uma diminuição na concentração do Ac-SDKP no sangue e na medula óssea e aumento na concentração plasmática de Ang II e Epo. Dado que a Ang II, Epo e Ac-SDKP são peptídeos hemorreguladores, não podemos excluir a possibilidade de que qualquer um deles, ou uma combinação de suas ações, seriam os responsáveis pelos efeitos observados no sistema eritropoiético. As análises de correlação revelaram uma relação inversa entre o número de CTH e a concentração de Ac-SDKP no sangue ($r = -0,73$, $r^2 = 0,53$, $p < 0,05$) e na medula óssea ($r = -0,68$; $r^2 = 0,47$, $p < 0,05$), mas nenhuma relação significativa foi

observada entre o número de CTH e a concentração de Ang II, seja no sangue ($r = 0,33$; $r^2 = 0,11$, $p > 0,05$) ou na medula óssea ($r = 0,35$, $r^2 = 0,12$, $p > 0,05$). Por outro lado, embora a Epo também tenha sido aumentada no grupo T2, não houve correlação significativa com o número de CTH no sangue ($r = 0,31$; $r^2 = 0,10$), o que enfraquece a possibilidade de Epo ser o efector das adaptações eritropoiéticas induzidas pelo treinamento que estão sendo demonstradas. Embora só possamos especular sobre isso, acreditamos que a remoção do efeito negativo sobre o CTH causada pelo aumento da hidrólise de Ac-SDKP resultante do aumento na atividade do sítio NH₂-terminal da ECA seja um importante nexos de causalidade entre o treinamento e o aumento da eritropoiese. Dado que o sítio NH₂-terminal da ECA é responsável pela hidrólise do Ac-SDKP e este tetrapeptídeo é um hemorregulador negativo, nós especulamos que o aumento da atividade no sítio NH₂-terminal da ECA induzido pelo treinamento seria o responsável pela redução dos níveis de Ac-SDKP, retirando a influência deste tetrapeptídeo sobre as CTH e, assim, estimulando o sistema eritropoiético.

5.2 Série de experimentos 2.

Em uma segunda série de experimentos tivemos por objetivo investigar o papel desempenhado pelo SRA, mais especificamente, o sítio NH₂-terminal da ECA, sobre as adaptações eritropoiéticas em resposta ao treinamento físico. Com base nos resultados da série de experimentos 1, escolhemos o protocolo de treinamento T2 como nosso protocolo de treinamento, uma vez que as adaptações eritropoiéticas do referido protocolo foram mais pronunciadas. O captopril mostra uma maior afinidade para o sítio NH₂-terminal da ECA⁹¹ e este sítio está preferencialmente envolvido na hidrólise de Ac-SDKP⁷⁶. Portanto, o captopril foi utilizado para inibir a atividade do sítio NH₂-terminal sem afetar a atividade global do SRA. O consumo de água dos animais tratados e não tratados com captopril foi de 41 ± 5 mL e 42 ± 3 mL por dia, respectivamente ($p > 0,05$). A dose de captopril média foi de $10,25 \pm 1,25$ mg.kg⁻¹.dia⁻¹. De fato, já foi demonstrado que essa dose de captopril aumenta a concentração de Ac-SDKP no plasma, urina, rins e pulmão de ratos, sem alterar a atividade do SRA⁹³. Com a finalidade de inibir especificamente o sítio NH₂-terminal da ECA, tratamos os animais com captopril em uma dose que mostrou-se específica em inibir este sítio⁹².

5.2.1 Parâmetros hemodinâmicos.

As pressões arteriais caudais sistólica, diastólica e média não foram influenciados pelo treinamento ou pela inibição do sítio NH₂-terminal da ECA (Tabela 3).

5.2.2 Parâmetros de treinamento.

A tabela 3 mostra os resultados dos parâmetros de treinamento analisados. O treinamento aumentou o tempo total de exercício e distância total percorrida durante o teste máximo em esteira e a inibição do sítio NH₂-terminal da ECA não influenciou as respostas. O treinamento também reduziu a frequência cardíaca de pré para pós-treinamento em ambos os grupos, T2 e T2-Cap, e nenhuma diferença foi observada nos grupos C ou C-Cap. A atividade da citrato sintase no sóleo aumentou em ambos os grupos de treinamento e não foi influenciada pela inibição do sítio NH₂-terminal da ECA. A inibição do sítio NH₂-terminal da ECA reduziu a razão peso VE/peso corporal em $11,2 \pm 1,3\%$ para o grupo C-Cap e em $13,2 \pm 1,6\%$ para o grupo T2-Cap. O treinamento induziu hipertrofia do VE de $25,4 \pm 2\%$ no grupo T2 e de $22,5 \pm 1,9\%$ no grupo T2-Cap ($p < 0,05$ para todos).

Tabela 3 – Peso corporal, pressão arterial caudal sistólica, diastólica e média, frequência cardíaca, consumo máximo de oxigênio, tempo total de exercício e distância total percorrida no teste máximo em esteira, hipertrofia cardíaca e atividade da citrato sintase nos animais controle (C), nos controles tratados com captopril (C-Cap), nos treinados (T2) e nos treinados tratados com captopril (T2-Cap).

	C		C-Cap		T2		T2-Cap	
	Pré-treino	Pós-treino	Pré-treino	Pós-treino	Pré-treino	Pós-treino	Pré-treino	Pós-treino
Peso corporal (g)	213,1 ± 5,5	252,9 ± 6,4	211,3 ± 5,0	249,3 ± 5,6	208,2 ± 1,5	254,8 ± 2,4	201,3 ± 1,8	253,8 ± 3,7
Pressão arterial caudal sistólica (mmHg)	137,7 ± 2,0	137,8 ± 3,5	124,3 ± 2,0	125,4 ± 1,1	124,9 ± 1,4	124,2 ± 2,1	121,0 ± 2,3	125,1 ± 4,7
Pressão arterial caudal diastólica (mmHg)	89,3 ± 2,2	86,0 ± 2,5	83,8 ± 1,2	82,0 ± 0,7	84,5 ± 1,0	83,1 ± 1,3	82,8 ± 1,2	86,4 ± 3,8
Pressão arterial caudal média (mmHg)	105,5 ± 2,1	103,1 ± 2,6	97,5 ± 1,5	96,4 ± 0,5	98,0 ± 0,7	96,7 ± 1,4	95,3 ± 1,0	95,2 ± 0,8
Frequência cardíaca (bpm)	406 ± 5	422 ± 5	416 ± 8	431 ± 4	411 ± 3	368 ± 3*€	423 ± 4	382 ± 4§€
Tempo total de exercício (min)	30,9 ± 1,1	30,9 ± 2,1	36,1 ± 2,5	32,6 ± 2,9	35,2 ± 1,7	44,3 ± 2,3*€	35,3 ± 1,4	48,1 ± 2,1§€
Distância total percorrida (m)	632 ± 44	653 ± 84	833 ± 96	724 ± 115	793 ± 73	1218 ± 125*€	782 ± 62	1378 ± 98 §€
Hipertrofia cardíaca ((mg/g) * 1000)	-	2,30 ± 0,03	-	2,04 ± 0,04*	-	2,88 ± 0,08*	-	2,50 ± 0,04#§
Atividade da citrato sintase (μmol.mg ⁻¹ .min ⁻¹)	-	56,30 ± 3,25	-	63,76 ± 3,40	-	92,47 ± 4,46*	-	84,53 ± 4,66§

Valores mostrados como média EPM. *p<0,05 vs. C; #p<0,05 vs. T2; §p<0,05 vs. C-Cap; €p<0,05 vs. Pré-treino.

5.2.3 Atividade da ECA.

A atividade da ECA plasmática foi aumentada em T2 e T2-Cap (Figura 9A), no entanto, a atividade da ECA plasmática foi menor no grupo T2-Cap em comparação com o grupo T2. Essa menor atividade plasmática da ECA plasmática no grupo T2-Cap pode ser explicada pela inibição completa da atividade do sítio NH₂-terminal da ECA, enquanto no grupo T2, a atividade do sítio NH₂-terminal foi aumentada (9E). O tratamento com captopril isoladamente também reduziu a atividade do sítio NH₂-terminal da ECA plasmática em C-Cap. A atividade plasmática do sítio COOH-terminal da ECA foi aumentada com o treinamento e não foi observado efeito do tratamento com captopril (9C). Na fração extracelular da medula óssea houve aumento na atividade do sítio NH₂-terminal da ECA com o treinamento, e o tratamento com captopril inibiu apenas parcialmente este aumento (9F). Não foram encontradas diferenças nas atividades da ECA (9B) e no sítio COOH-terminal da ECA (9D) independentemente do estado de treinamento ou tratamento captopril na fração extracelular da medula óssea. Esses resultados demonstram que a dose de captopril usada neste estudo inibiu o sítio NH₂-terminal da ECA, e concorda com estudo anterior em ratos utilizando a mesma dose⁹².

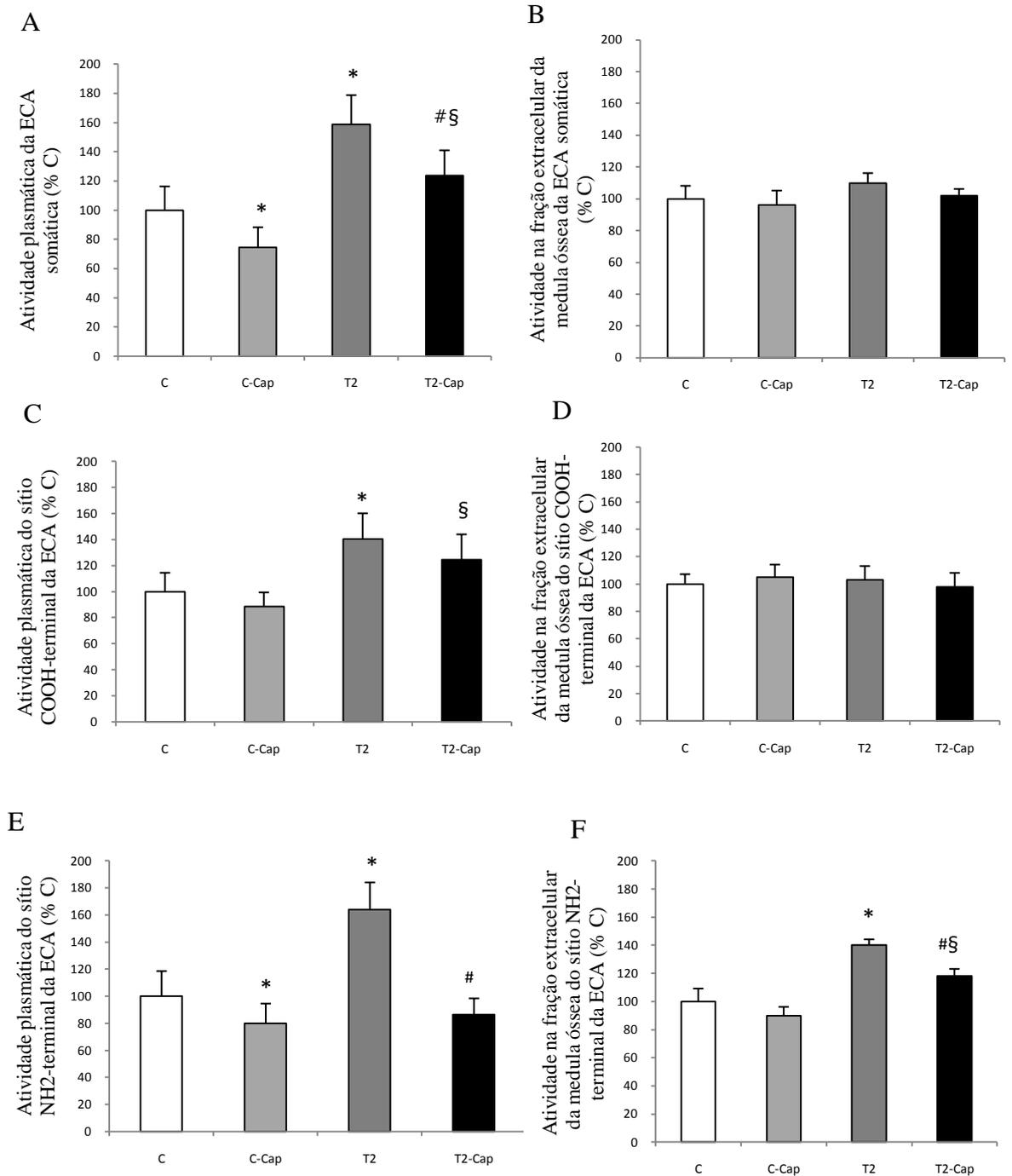


Figura – 9 Atividade plasmática e na fração extracelular da medula óssea da ECA e dos sítios COOH-terminal e NH2-terminal da ECA nos animais controle (C), nos controles tratados com captopril (C-Cap), nos treinados (T2) e nos treinados tratados com captopril (T2-Cap). Dados estão mostrados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. C; # $p < 0,05$ vs. T2; § $p < 0,05$ vs. C-Cap.

5.2.4 Medida da concentração de Ac-SDKP

A Figura 10 mostra os resultados para a concentração de Ac-SDKP no plasma (A) e na fração extracelular da medula óssea (B). No plasma, os níveis de Ac-SDKP foram aumentados no grupo C-Cap e reduzidos no grupo T2 em relação ao C. A inibição do sítio NH₂-terminal da ECA impediu completamente esta redução no grupo T2-Cap. Na fração extracelular da medula óssea, o treinamento reduziu a concentração de Ac-SDKP e a inibição do sítio NH₂-terminal da ECA preveniu parcialmente esta redução.

5.2.5 Medida da concentração de Ang II.

A concentração de Ang II foi medida no plasma e na fração extracelular da medula óssea e os resultados são mostrados na figura 10. No plasma (10C), a concentração de Ang II foi elevada nos grupos T2 e T2-Cap comparados aos respectivos controles, mas não houve diferença entre os grupos de treinamento. Na fração extracelular da medula óssea não houve diferença entre os grupos (10D).

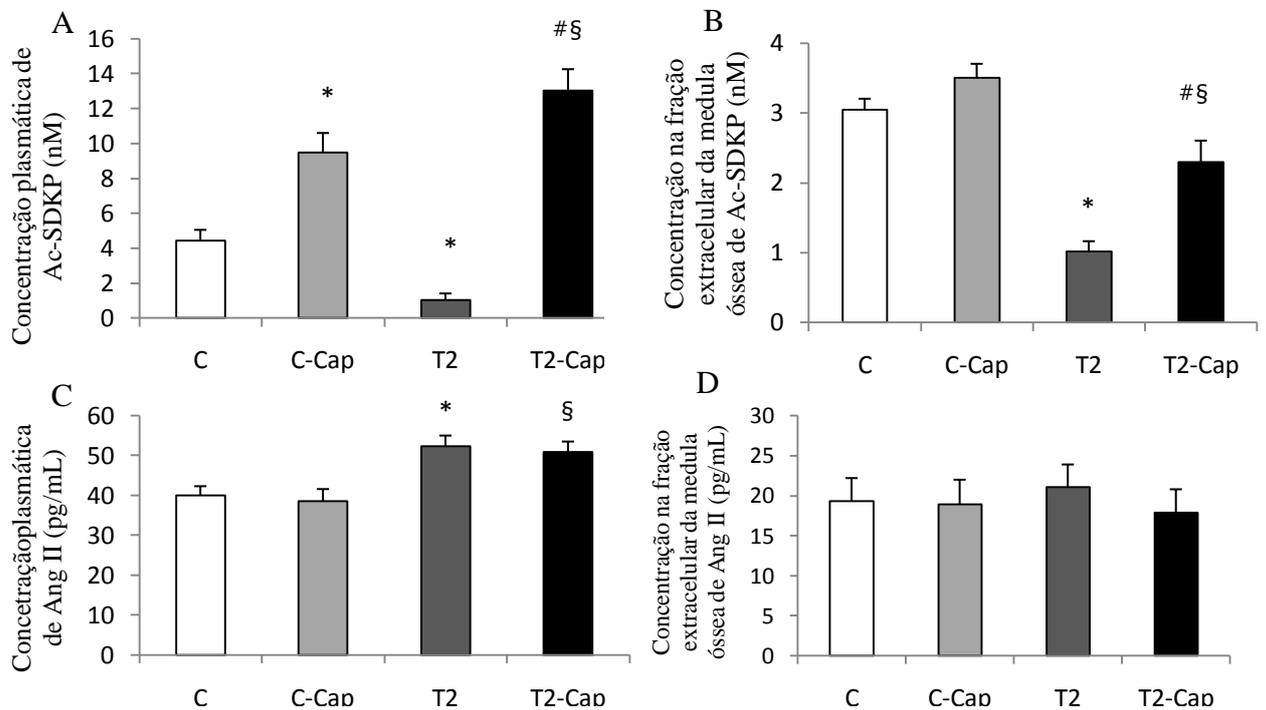


Figura - 10 Concentração plasmática e na fração extracelular da medula óssea de Ac-SDKP e Ang II nos animais controle (C), nos controles tratados com captopril (C-Cap), nos treinados (T2) e nos treinados tratados com captopril (T2-Cap). Dados estão mostrados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. C; # $p < 0,05$ vs. T2; § $p < 0,05$ vs. C-Cap.

5.2.6 Medida da concentração de Epo.

A concentração plasmática de Epo foi aumentada em ambos os grupos de treinamento (figura 11) e a inibição do sítio NH₂-terminal da ECA não teve efeito sobre esta resposta.

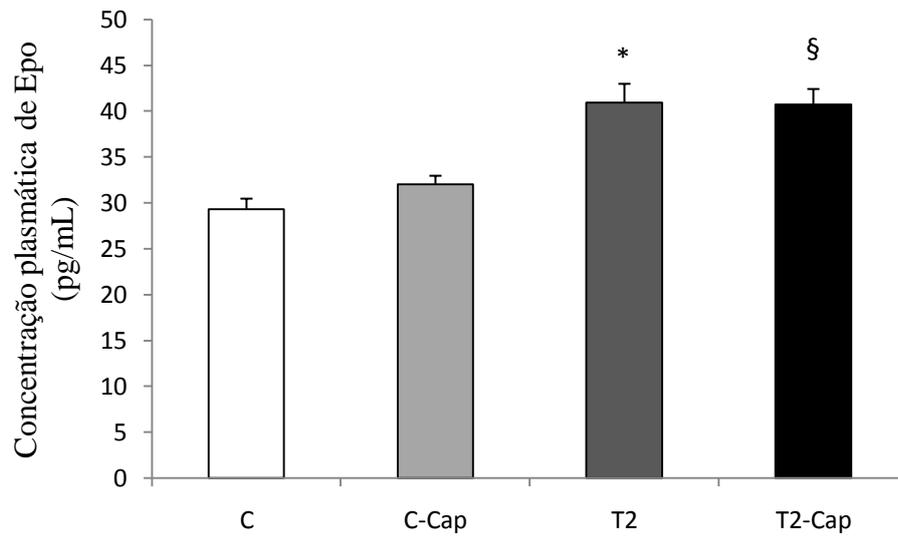


Figura - 11 Concentração plasmática de Epo nos animais controle (C), nos controles tratados com captopril (C-Cap), nos treinados (T2) e nos treinados tratados com captopril (T2-Cap). Dados estão mostrados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. C; § $p < 0,05$ vs. C-Cap.

5.2.7 Enumeração de células tronco hematopoiéticas por citometria de fluxo.

A Figura 12 mostra os resultados para o número de CTH no sangue (A) e na medula óssea (B). A inibição do sítio NH₂-terminal da ECA, isoladamente, reduziu o número de CTH na medula óssea em 15% e no sangue em 25%, mas essas diferenças não atingiram significância estatística. Os animais do grupo T2 apresentaram aumento de 2 e 3 vezes no número CTH na medula óssea e no sangue, respectivamente, em comparação com C. Os animais do grupo T2-Cap apresentaram aumento de 1,5 e 2 vezes no número de CTH na medula óssea e no sangue, respectivamente, em comparação com o grupo C-Cap. A inibição do sítio NH₂-terminal da ECA reduziu para cerca de 50% o número de CTH induzido pelo treinamento em ambos medula óssea e sangue.

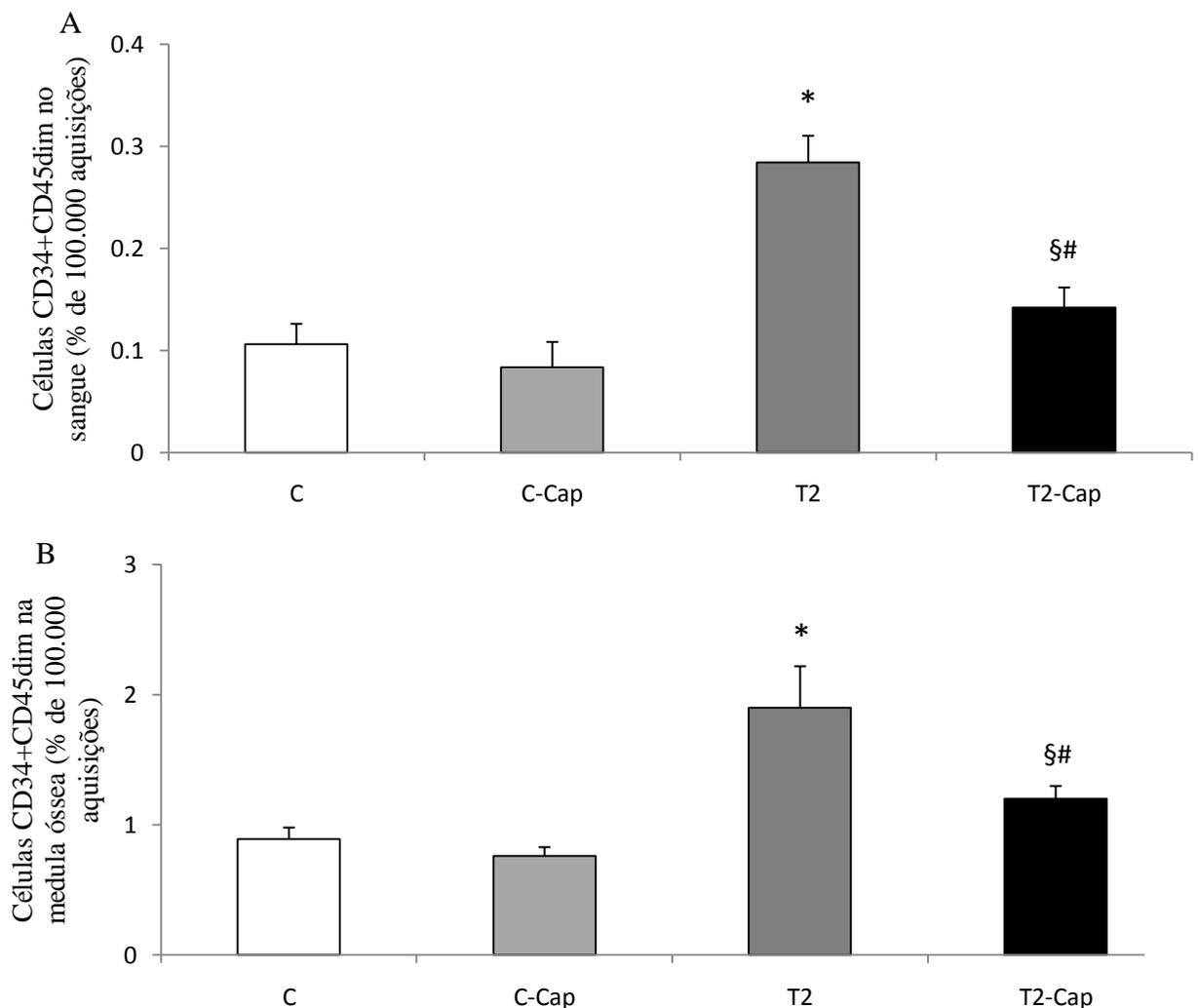


Figura - 12 Células CD34+CD45dim no sangue (A) e medula óssea (B) nos animais controle (C), nos controles tratados com captopril (C-Cap), nos treinados (T2) e nos treinados tratados com captopril (T2-Cap). Dados estão mostrados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. C; # $p < 0,05$ vs. T2; § $p < 0,05$ vs. C-Cap.

5.2.8 Proliferação de células tronco hematopoiéticas em meio de metilcelulose

Os resultados dos ensaios clonogênicos são mostrados na figura 13. A inibição do sítio NH₂-terminal da ECA teve pouca influência sobre a capacidade proliferativa das CTH do sangue o treinamento aumentou o número de colônias de BFU-E, de UFC-E, de UFC-GM e de UFC-GEMM. O número de BFU-E e UFC-GEMM foram reduzidos no grupo T2-Cap em comparação com o grupo T2, mas o grupo T2-Cap apresentou maior número dessas colônias em comparação ao grupo C-Cap. Os resultados para os ensaios proliferativos de CTH da medula óssea foram similares aos do sangue e não são mostrados.

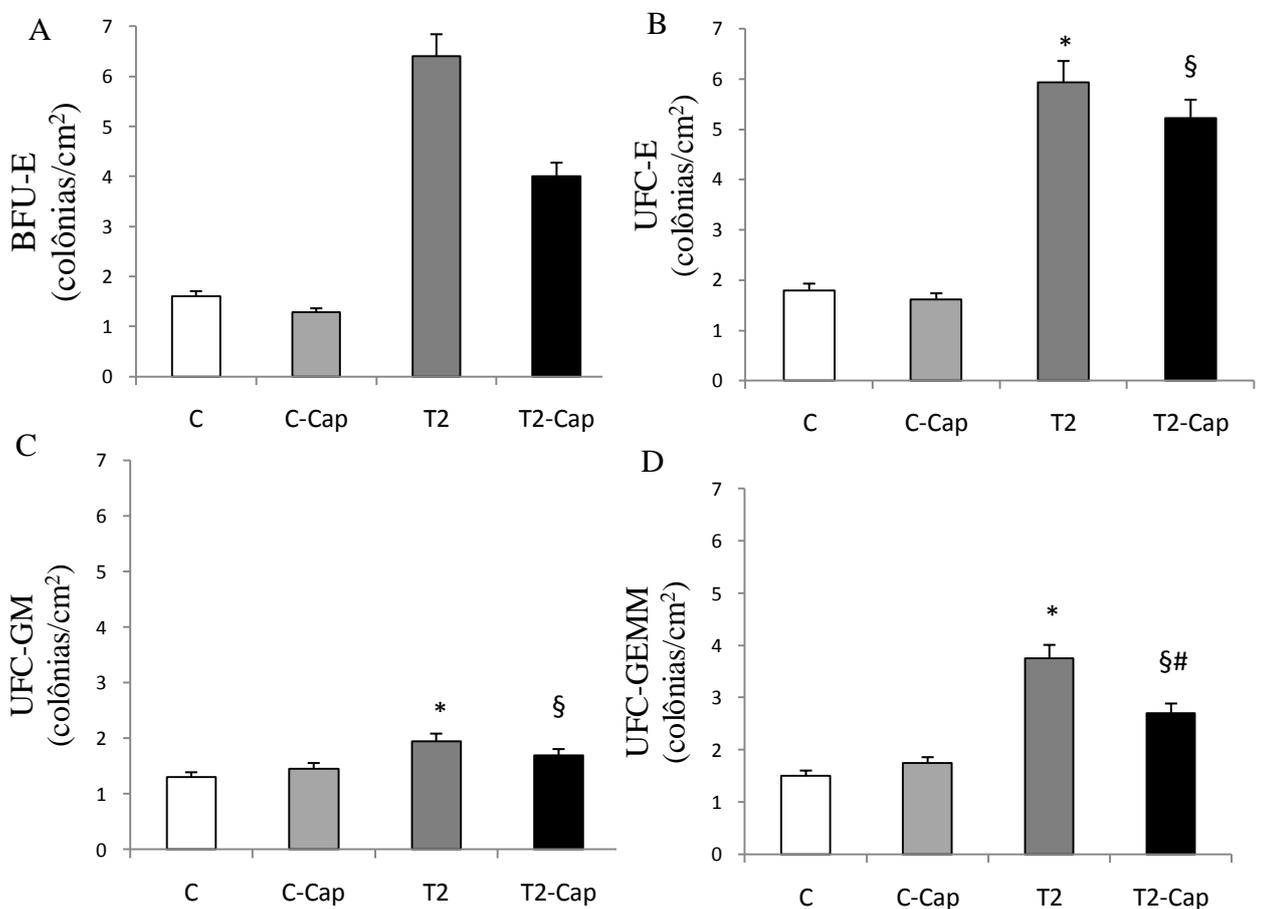


Figura - 13 Unidades formadoras de colônias de alta capacidade proliferativa-eritróides (BFU-E, A), unidades formadoras de colônias-eritróides (UFC-E, B) unidades formadoras de colônias-granulócitos, macrófagos (UFC -GM, C), e unidades formadoras de colônias-granulócitos, eritrócitos, macrófagos e megacariócitos (UFC -GEMM, D) no sangue dos animais controle (C), dos controles tratados com captopril (C-Cap), dos treinados (T2) e dos treinados tratados com captopril (T2-Cap). Dados estão mostrados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. C; # $p < 0,05$ vs. T2; § $p < 0,05$ vs. C-Cap.

5.2.9 Hematócrito, reticulócitos, 2,3 DPG e meia vida das hemácias.

Os resultados para o hematócrito, porcentagem de reticulócitos, o conteúdo sanguíneo de 2,3 DPG estão apresentados na figura 14. O hematócrito (14A) não foi diferente em nenhum dos grupos. O percentual de reticulócitos (14B) foi aumentado no grupo T2 e a inibição do sítio NH₂-terminal da ECA preveniu parcialmente este aumento. Houve um aumento ligeiro, mas significativo no conteúdo sanguíneo de 2,3 DPG (14C) do grupo T2 que não foi observado no grupo T2-Cap. A meia vida das hemácias está apresentada na figura 14D. O treinamento reduziu o tempo médio de vida das hemácias em 50% dos valores do grupo C e a inibição do sítio NH₂-terminal da ECA parcialmente inibiu esta resposta. No grupo T2-Cap, os eritrócitos tinham um tempo médio de vida de aproximadamente 75% do valor do grupo C-Cap. O número total de eritrócitos ($\times 10^6/\text{mm}^3$) não foi diferente entre os grupos (C: $7,5 \pm 0,3$; C-Cap: $7,0 \pm 0,3$; T2: $6,8 \pm 0,1$; T2-Cap: $7,1 \pm 0,2$, $p > 0,05$).

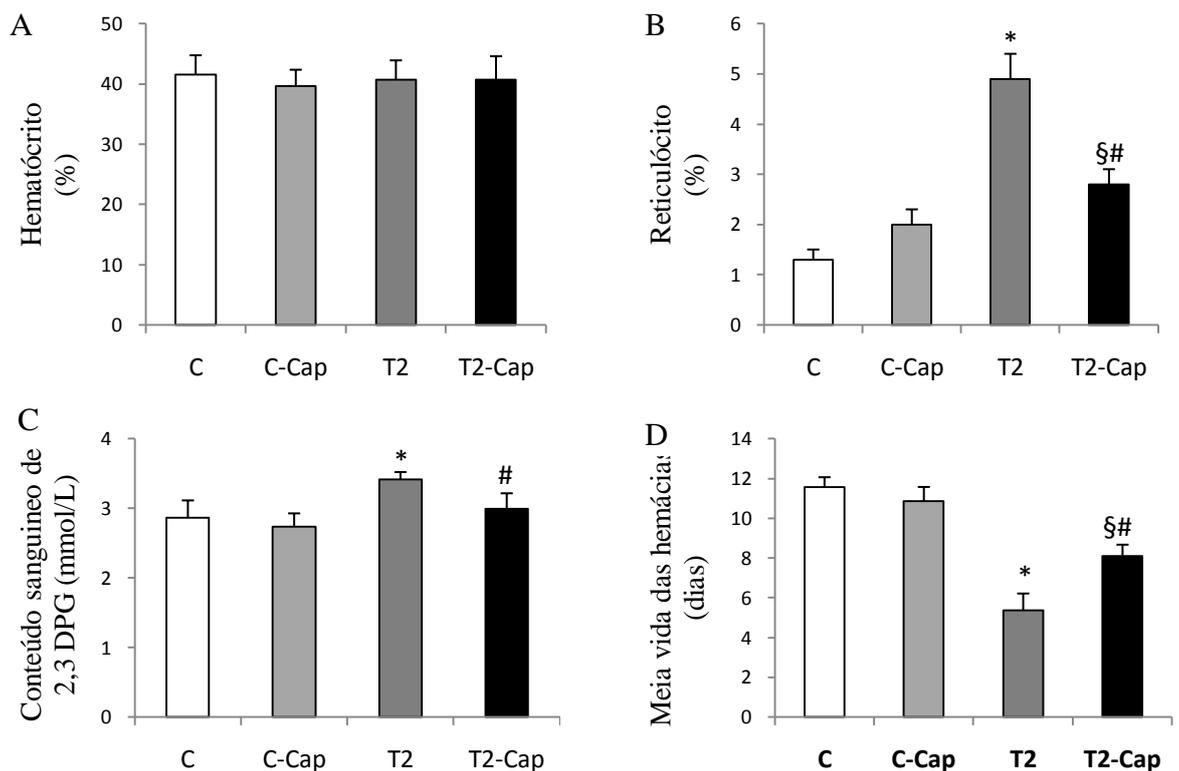


Figura - 14 Hematócrito (A), percentual de reticulócitos (B), conteúdo sanguíneo de 2,3 DPG (C) e meia vida das hemácias (D) nos animais controle (C), nos controles tratados com captopril (C-Cap), nos treinados (T2) e nos treinados tratados com captopril (T2-Cap). Dados estão mostrados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. C; # $p < 0,05$ vs. T2; § $p < 0,05$ vs. C-Cap.

6. DISCUSSÃO

6.1 Série de experimentos 1.

Na primeira série de experimentos tivemos por objetivo investigar o efeito de dois protocolos de treinamento com diferentes frequências diárias de treinamento, T1 e T2, sobre as adaptações eritropoiéticas, e as alterações sistêmicas e locais da atividade da ECA, bem como as concentrações de Ang II e de Ac-SDKP.

Os resultados mostraram que o protocolo de treinamento T2, com maior frequência diária de treinamento, aumenta o número e a capacidade proliferativa das CTH, a concentração de reticulócitos no sangue e diminui a meia-vida das hemácias. Este efeito do protocolo de treinamento T2 parece ser devido à maior atividade do sítio ativo NH₂-terminal da ECA, que foi encontrado tanto na fração extracelular da medula óssea quanto no plasma dos animais treinados. É importante salientar que o tetrapeptídeo Ac-SDKP, inibidor da proliferação de CTH, é um dos substratos do sítio NH₂-terminal da ECA. Levando em consideração que a atividade do sítio NH₂-terminal estava aumentada e que a concentração de Ac-SDKP estava diminuída, portanto é razoável propor que o protocolo de treinamento físico T2 induziu adaptações no sistema eritropoiético por meio do aumento na atividade do sítio NH₂-terminal da ECA, que reduziu as concentrações de Ac-SDKP plasmática e na fração extracelular da medula óssea.

No presente estudo confirmaram-se resultados anteriores do nosso grupo² em relação às adaptações induzidas pelos protocolos de treinamento T1 e T2. A hipertrofia cardíaca é uma característica comum de adaptação induzida pelo treinamento e nós mostramos que o protocolo T2 induziu maior hipertrofia do VE em comparação ao protocolo T1. As pressões sistólica, diastólica e média não foram alteradas em nenhum dos grupos e sabe-se que o treinamento não altera a pressão arterial em humanos e animais normotensos^{101; 102; 103; 104}. Além disso, a atividade da citrato sintase do sóleo aumentou no grupo T1 e em maior proporção no grupo T2. A redução da frequência cardíaca de repouso é considerada o padrão-ouro das adaptações ao treinamento físico^{102; 103} e esta foi observada em ambos os grupos treinados. O teste máximo em esteira mostrou que os animais treinados apresentaram maiores adaptações cardiorrespiratórias e funcionais. Embora o consumo máximo de oxigênio não tenha sido diferente entre os grupos T1 e T2, no grupo T2 correu uma distância maior e por mais minutos do que o T1 durante o teste máximo. Em conjunto, estes resultados mostram que

ambos os protocolos de treinamento foram eficazes na indução de adaptações fisiológicas e funcionais, e que algumas adaptações induzidas pelo protocolo T2 foram de maior significativas que as induzidas pelo protocolo T1.

Nossos dados mostram que o protocolo de treinamento T2, com maior frequência diária de treino, aumentou o número de células CD34+CD45dim, consideradas como células tronco/progenitoras hematopoiéticas. Poucos estudos têm investigado os efeitos do treinamento físico aeróbio sobre CTH, sendo estes estudos realizados em seres humanos^{37; 38}. Não foi encontrado nenhum estudo que com ratos e estudos que utilizaram camundongos tiveram como foco dos trabalhos células progenitoras endoteliais¹⁰⁵. Bonsignore et al.³⁶ relataram que em repouso, corredores amadores tinha de 3 a 4 vezes mais células CD34 + circulantes em relação aos controles e Ikeda et al.³⁷ observaram que três meses de treinamento aumentou o número circulante de células progenitoras hematopoiéticas. No presente estudo, observamos aumento de 3 vezes nas células CD34+CD45dim circulantes e aumento de 2 vezes dessas células na medula óssea. Portanto, nossos resultados apontam na mesma direção dos estudos realizados em humanos, indo mais além ao mostrar que esses efeitos ocorrem também em nível da medula óssea.

Além disso, também mostramos que a capacidade proliferativa das CTH, principalmente as BFU-E e UFC-GEMM, foi aumentada no grupo T2. É importante salientar que este é o primeiro estudo até o momento que avaliou os efeitos do treinamento físico sobre a capacidade proliferativa de precursores eritrocitários e, juntamente com os resultados de aumento na porcentagem de reticulócitos no sangue periférico, sugerimos que o protocolo de treinamento T2 foi efetivo em estimular a medula óssea e aumentar a produção de hemácias. Por outro lado, aumento da produção de hemácias causaria um aumento do hematócrito, no entanto, o hematócrito não foi alterado. Na verdade, houve uma tendência a redução do hematócrito no grupo T2 ($p = 0,08$) e a redução do hematócrito é uma resposta comum ao treinamento aeróbio intenso²⁷. Portanto, nós especulamos que o *turn-over* eritrocitário seria maior e, conseqüentemente, a meia vida das hemácias seria reduzida. Observamos também que o tempo de vida médio dos eritrócitos era quase 50% menor no grupo T2, em comparação com C, e este resultado corrobora estudos anteriores em atletas humanos^{13; 24; 106} e ratos submetidos a treinamento físico²³.

Acredita-se que o treinamento físico atue sobre o sistema eritropoiético de duas maneiras: 1) pela remoção de eritrócitos velhos da circulação^{31; 107} e 2) pela estimulação da eritropoiese

na medula óssea³¹. Essas ações combinadas levariam à redução no tempo médio de vida dos eritrócitos e um aumento nas hemácias jovens na circulação periférica²⁴, o que ocorreu somente nos animais submetidos ao protocolo de treinamento T2. A redução da meia vida das hemácias tem efeitos benéficos, por um lado, porque eritrócitos velhos têm capacidade enzimática e metabólica reduzidas, e apresentam alterações na capacidade de deformação da membrana celular, o que aumenta a viscosidade da membrana celular e do citoplasma, aumento da fragilidade e redução na resistência osmótica e mecânica^{108; 109}. As razões por que o exercício leva à destruição selectiva dos eritrócitos velhos ainda é assunto de discussão, mas as possíveis razões são: trauma mecânico provocado pela compressão e impactos relacionados com danos mecânicos aos eritrócitos nos capilares dos pés durante a corrida em superfícies firmes, destruição intramuscular, estresse osmótico e peroxidação de membrana lipídica causada pelos radicais livres liberados pelos leucócitos ativados²⁷. Por outro lado, os eritrócitos mais jovens também têm uma maior concentração de hemoglobina intacta²⁹ e maior teor de 2,3 DPG, que desloca a curva de dissociação da oxi-hemoglobina para a direita. Juntas, essas adaptações levam à diminuição da idade média dos eritrócitos na circulação e maior fluidez da membrana dos eritrócitos, que é importante para o transporte de íons e de oxigênio¹¹⁰.

Embora no presente estudo não tenha sido investigada as razões para a destruição seletiva dos eritrócitos velhos, nós estudamos se os protocolos de treinamento utilizado seriam efetivos para induzir a eritropoese. A contagem de reticulócitos é o principal índice utilizado para avaliação da estimulação da medula óssea³⁰ e pode ser alterado pelo estado de treinamento^{13; 31}. Nós mostramos que os animais do grupo T2 tiveram maior porcentagem de reticulócitos no sangue periférico, o que significa que este tipo de treinamento é capaz de estimular a medula óssea e nos animais do grupo T1, embora tenhamos observado adaptações cardíacas, funcionais e bioquímicas, não houve alteração significativa no sistema eritropoiético. Nos seres humanos, adaptações eritropoiéticas são mais comumente observadas em atletas altamente treinados²⁷.

Nossos resultados mostram que as atividades plasmáticas da ECA e de seus dois sítios ativos estavam aumentadas e que a atividade do sítio NH₂-terminal estava aumentada na fração extracelular da medula óssea com o protocolo de treinamento T2. Poucos dados na literatura foram encontrados acerca do efeito do treinamento físico sobre a atividade da ECA. Recentemente, Costa et al.¹¹¹ mostraram que treinamento físico de 75 dias aumentou a

atividade da ECA plasmática em cavalos. Nesse estudo, mostrou-se que o aumento da carga de trabalho correlacionava-se com o aumento na atividade da ECA, embora não fosse possível diferenciar a influência dos fatores intensidade e duração do exercício sobre a atividade da enzima, uma vez que ambos foram aumentados ao longo do período de treinamento. Nossos dados corroboram de certa forma os dados de Costa et al.¹¹¹, pois também encontramos uma relação entre a frequência de treino e a atividade da ECA. Esses autores ainda observaram que a interrupção de 8 semanas do treinamento acarretava redução gradual da atividade da ECA em direção aos valores pré-treino, resultado que sugere ser o treinamento empregado o principal fator para o aumento observado na atividade da enzima. Não encontramos estudos que tenham avaliado a influência do treinamento físico sobre os sítios terminais da ECA. Embora possamos somente especular, é possível que qualquer treinamento que cause aumento na atividade do sítio catalítico NH₂-terminal seja capaz de induzir adaptações no sistema eritropoiético como os observados no presente estudo.

No presente estudo mostramos que o efeito do treinamento físico sobre a atividade da ECA apresenta duas características interessantes: 1) as atividades medular e sistêmica podem ser reguladas de forma independente e 2) que em um determinado tecido, as atividades dos sítios ativos da ECA, o NH₂-terminal e o COOH-terminal, também podem ser reguladas de forma independente. Demonstramos que na circulação dos animais submetidos ao protocolo de treinamento T2 houve aumento das atividades da ECA plasmática, e dos sítios NH₂-terminal e COOH-terminal e a concentração plasmática de Ang II foi aumentada, enquanto a concentração de Ac-SDKP diminuiu. Na fração extracelular da medula óssea, nem a atividade da ECA ou do sítio COOH-terminal, nem a concentração de Ang II foram alterados no grupo T1, porém o grupo T2 aumentou a atividade do sítio NH₂-terminal, e diminuir a concentração de Ac-SDKP na medula óssea. T1 não mostrou qualquer diferença nas atividades locais ou nos níveis de peptídeos na circulação ou na medula óssea. Estes resultados corroboram dados da literatura que mostram que os níveis de Ang II estão mais relacionados com a atividade do sítio COOH-terminal e que, por outro lado, os níveis de Ac-SDKP estão relacionados com a atividade do sítio NH₂-terminal. Embora ambos os sítios catalíticos clivem Ang I¹¹², o Ac-SDKP é hidrolisado quase que exclusivamente pelo sítio NH₂-terminal⁷⁶. Além disso, foi relatado que o sítio COOH-terminal é o principal sítio de clivagem de Ang I *in vivo*⁸. Poderia ser especulado se os sítios catalíticos da ECA teriam sua atividade regulada para suprir as necessidades teciduais locais. No entanto, essa hipótese ainda precisa de apoio experimental.

Foi demonstrado que hormônios sexuais exercem efeitos sobre CTH^{113; 114; 115; 116; 117; 118} e que existe dimorfismo sexual na eritropoiese^{119; 120; 121}. Em função da flutuação hormonal que ocorre na fêmea decorrente do ciclo estral, podem-se esperar variações no número e função das CTH, uma vez que foi observado que o estrógeno teria efeitos sobre as células provenientes da medula óssea^{122; 123; 124}. Entretanto, não parece haver consenso se de fato as flutuações hormonais na fêmea têm influência sobre as CTH. Em um dos primeiros estudos a investigar essa questão foi observado que a formação de colônias hematopoiéticas a partir de células da medula óssea não foi diferente entre as fases do ciclo estral em camundongos fêmeas¹¹⁹. Mais recentemente, Thurmond et al.¹²² mostraram que o receptor alfa de estrógeno não parece ter função importante na geração e manutenção de CTH e Lemieux et al.¹²³ mostraram que o número de células CD34+ e CD133+ circulantes não foi afetado pela fase do ciclo menstrual em mulheres pré-menopausa saudáveis. Por outro lado, dados dos estudos de Masuda et al.¹²⁴ Foresta et al.¹²¹ mostram que o número circulante dessas células varia ao longo da fase do ciclo menstrual em mulheres.

Não encontramos dados na literatura sobre os efeitos da fase do ciclo estral sobre o número ou proliferação de CTH em ratas. No entanto, acreditamos que caso haja um efeito das flutuações hormonais devido ao ciclo estral das ratas sobre as CTH, é improvável que esse efeito tenha sido importante nos resultados do presente estudo, uma vez que já analisamos a fase do ciclo menstrual nas ratas submetidas aos protocolos de treinamento realizados e não encontramos alterações hormonais em comparação ao grupo controle e todas as ratas estavam na mesma fase do ciclo estral (dados não mostrados). Além disso, é comumente observado que ratas que vivem juntas na mesma gaiola ou que dividem um mesmo ambiente, como é o caso do biotério, sincronizam as fases do ciclo estral¹²⁵. Portanto, caso tenha havido efeitos do ciclo estral nas ratas do presente estudo, é bastante provável que este tenha sido semelhante em todas elas. Além disso, as variações hormonais durante o ciclo ovariano parecem influenciar mais outros tipos de células tronco, como as células tronco endoteliais^{120; 123}, em comparação com as CTH. Portanto, no presente estudo, as variações hormonais devido ao ciclo estral não parecem ter exercido efeito importante sobre as respostas no número e proliferação de CTH.

Nesta primeira série de experimentos mostramos que o protocolo de treinamento T2, mas não o protocolo T1, é capaz de induzir adaptações eritropoiéticas nos animais, dentre elas reticulocitose, aumento no número de capacidade proliferativa de CTH, maior conteúdo

sanguíneo de 2,3 DPG, aumento dos níveis de Epo circulante e redução na meia vida das hemácias. Além disso, também mostramos que o protocolo de treinamento T2 aumentou a atividade do sítio NH₂-terminal da ECA no plasma e na fração medular da medula óssea, reduziu as concentrações plasmáticas e da medula óssea de Ac-SDKP e aumentou a concentração circulante de Ang II. Como Ac-SDKP, Ang II e Epo são todos hemorregulatórios, não podemos excluir a possível participação destes nas adaptações eritropoiéticas induzidas pelo treinamento.

6.2 Série de experimentos 2.

Na série de experimentos 2 tivemos como objetivo investigar o papel desempenhado pelo sítio NH₂-terminal da ECA nas adaptações eritropoiéticas induzidas pelo protocolo de treinamento T2.

Nossos resultados demonstraram que as adaptações induzidas pelo treinamento sobre o sistema eritropoiético são pelo menos parcialmente relacionadas com o aumento da atividade no sítio NH₂-terminal da ECA. O seu bloqueio com captopril levou ao aumento dos níveis de Ac-SDKP no plasma e na fração extracelular da medula óssea, diminuindo o número e a proliferação das CTH, a porcentagem de reticulócitos circulantes e aumentando a meia-vida das hemácias.

Na série de experimentos 2 medimos vários marcadores de treinamento físico e mostramos que a inibição do sítio NH₂-terminal da ECA por meio do tratamento com captopril não afetou as adaptações induzidas pelo treinamento físico, com exceção da razão VE/peso corporal, reduzindo-a em ~ 12% em ambos os grupos tratados. Este resultado corrobora estudo anterior do nosso grupo que mostrou que o enalapril, outro inibidor da ECA, também reduziu a hipertrofia cardíaca em ratos treinados sob o protocolo T2². Nenhum dos outros marcadores de treinamento físico foi influenciado pela inibição do sítio NH₂-terminal da ECA.

Nós mostramos na série de experimentos 1 que o protocolo de treinamento T2 a capacidade proliferativa de CTH, tendo sido observado aumento no número de BFU-E, UFC-E, UFC-GM e UFC-GEMM e estes resultados foram repetidos na série de experimentos 2. Quando o sítio NH₂-terminal da ECA foi inibido, os animais do grupo T2-Cap mostraram valores de UFC-GM e UFC-E não estatisticamente diferentes em comparação com os animais do grupo T2. No entanto, BFU-E e UFC-GEMM foram reduzidos nos animais do grupo T2-Cap em comparação aos animais do grupo T2. Estes tipos de colônias são considerados as

mais imaturas^{126; 127}. É possível, portanto, que no grupo T2-Cap, o Ac-SDKP tenha inibido preferencialmente a proliferação desses progenitores mais imaturos, enquanto a proliferação de unidades formadoras de colônias mais maduras e comprometidas não foi afetada.

O número de células CD34+CD45dim foi aumentado com o protocolo de treinamento T2 e a inibição do sítio NH₂-terminal atenuou essa resposta. Outros estudos demonstraram que o treinamento físico aumenta o número de CTH^{36; 37}, porém nenhum mecanismo para este aumento foi proposto. Foi mostrado anteriormente que a incubação de captopril com células da medula óssea reduz o número destas células na fase S do ciclo celular⁷⁸ e que a infusão de captopril em camundongos previamente irradiados com raios γ também inibe a entrada de CTH na fase S do ciclo celular. Tem sido sugerido que a inibição sobre as CTH induzida pelo captopril seja mediada por Ac-SDKP. No presente estudo, damos suporte a esta suposição uma vez que o número e proliferação de CTH foram reduzidos nos animais treinados e tratados com captopril e neste grupo a concentração de Ac-SDKP não foi reduzida. Assim, com base em nossos resultados e em resultados anteriores, sugerimos que a redução do número e proliferação de CTH observadas no presente estudo seja devido ao efeito inibitório do Ac-SDKP sobre essas células.

Embora se saiba que o uso crônico de inibidores da ECA possa causar leucopenia^{85; 86; 87}, no presente estudo não observamos variação na contagem total ou diferencial de leucócitos entre os grupos estudados (dados não mostrados).

O aumento no percentual de reticulócitos induzido pelo treinamento físico foi atenuado pela inibição do sítio NH₂-terminal no grupo T2-Cap, provavelmente como resultado da diminuição na estimulação da medula óssea neste grupo. A contagem de reticulócitos é o principal índice utilizado para avaliar a estimulação da medula óssea³⁰. Portanto, nossos dados mostram que o captopril, provavelmente por meio do efeito inibitório do Ac-SDKP sobre CTH, inibiu a proliferação destas células e reduziu a liberação de reticulócitos para circulação periférica. Como consequência da redução na porcentagem de reticulócitos na circulação periférica, o conteúdo sanguíneo de 2,3 DPG também foi reduzido nos animais do grupo T2-Cap.

Observamos que os animais do grupo T2 apresentaram redução na meia vida das hemácias, corroborando os dados anteriores. Os animais do grupo T2-Cap apresentaram maiores valores de meia vida das hemácias em comparação com os animais do grupo T2, mas

apresentaram valores inferiores quando comparados com os animais do grupo C-Cap. A idade média dos eritrócitos na circulação periférica depende por um lado do aumento da eritropoiese e, por outro, da eliminação aumentada de células sangüíneas velhas²⁷. No presente estudo, observamos atenuação na eritropoiese causada pelo treinamento físico por meio da inibição do sítio NH₂-terminal da ECA, porém, talvez a taxa de eliminação de células do sangue não tenha sido alterada. Portanto, é possível que nos animais do grupo T2-Cap, embora a eritropoiese tenha sido inibida, a eliminação de células velhas do sangue tenha sido mantida constante e, como conseqüência, a meia vida das hemácias tenha sido reduzida em comparação aos animais do grupo C-Cap, mas tenha sido maior quando comparados com os animais do grupo T2, nas quais tanto a eritropoiese aumentada quanto a eliminação das células velhas do sangue ocorreram.

Com base nos dados do presente estudo, sugerimos que os efeitos do protocolo de treinamento T2 sobre a eritropoiese seja resultado do aumento na atividade do sítio NH₂-terminal da ECA induzido pelo treinamento. Com base neste modelo, o treinamento aumentaria as atividades plasmática e da medula óssea do sítio NH₂-terminal da ECA e, conseqüentemente, reduziria a concentração de Ac-SDKP nesses locais. A redução do Ac-SDKP na circulação periférica e na medula óssea, reduz a regulação negativa que este tetrapeptídeo exerce sobre as CTH, resultando em maior número e capacidade proliferativa destas células. Como conseqüência, ocorre reticulocitose como resultado de aumento na atividade da medula óssea. Mais reticulócitos na circulação levam a maior concentração de 2,3 DPG, e como observado por outros, a meia vida das hemácias é reduzida. O treinamento físico com concomitante inibição do sítio NH₂-terminal da ECA inibe as adaptações eritropoiéticas observadas.

No presente estudo procurou-se inibir a diminuição na concentração de Ac-SDKP induzida pelo protocolo de treinamento T2 no sangue e medula óssea, a fim de investigar o papel desempenhado por este tetrapeptídeo nas adaptações eritropoiéticas induzidas pelo treinamento. Para tanto, utilizamos uma dose de captopril cujos estudos anteriores mostraram inibir preferencialmente a atividade NH₂-terminal da ECA⁹² e afetar a concentração de Ac-SDKP tanto no sangue quanto em outros tecidos⁹³ em ratos. Nós mostramos que as atividades circulantes da ECA plasmática e do sítio NH₂-terminal da ECA foram reduzidas pelo tratamento com captopril, enquanto a atividade do sítio COOH-terminal não foi afetada. Juntos, esses resultados mostram que o tratamento com captopril empregado no presente

estudo foi eficaz em inibir especificamente o sítio NH₂-terminal da ECA sem afetar o sítio COOH-terminal. Não observamos mudança nas atividades da ECA plasmática ou do sítio COOH-terminal na medula óssea, porém, a atividade do sítio NH₂-terminal na fração extracelular da medula óssea foi aumentada no grupo T2, e parcialmente inibida pelo tratamento com captopril.

Os sítios catalíticos da ECA apresentam afinidades diferentes para diferentes substratos. O sítio NH₂-terminal está preferencialmente envolvido na clivagem de Ac-SDKP⁷⁶, enquanto o sítio COOH-terminal é o principal local de formação de Ang II⁸. Nossos resultados parecem confirmar essas hipóteses, uma vez que a concentração de Ang II foi aumentada apenas na circulação periférica dos animais dos grupos T2 e T2-Cap, onde a atividade do sítio COOH-terminal foi aumentada, e a concentração de Ac-SDKP foi diminuída na circulação periférica e na medula óssea somente nos animais submetidos ao protocolo de treinamento T2, onde a atividade do sítio NH₂-terminal foi aumentada. O tratamento com captopril não afetou a atividade do sítio COOH-terminal nem a concentração de Ang II circulante, enquanto inibiu o aumento na atividade do sítio NH₂-terminal na circulação e na medula óssea induzida pelo treinamento, e nesses dois locais, a concentração de Ac-SDKP foi diminuída. Esses dados reforçam a hipótese de que os sítios da ECA podem ser regulados de forma independente e podem ter diferentes funções teciduais.

Independentemente do fato do captopril apresentar seletividade parcial sobre o sítio NH₂-terminal da ECA, no presente estudo, tínhamos como finalidade inibir a redução na concentração de Ac-SDKP. Para isso, utilizamos o captopril numa dose já previamente demonstrada ser capaz de alterar a concentração desse tetrapeptídeo⁹³ sem alterar sobremaneira o SRA⁹². Portanto, embora o captopril possa não ser a droga ideal para fins de bloqueio específico do sítio NH₂-terminal^{128; 129}, para os fins do presente estudo, o uso desta droga foi satisfatório, pois conseguimos inibir o aumento na atividade do sítio NH₂-terminal, sem alterar a atividade do sítio COOH-terminal e inibir a redução na concentração de Ac-SDKP sem alterar a concentração de Ang II.

A inibição do sítio NH₂-terminal da ECA por meio do tratamento com captopril não alterou a concentração de Epo, embora tenhamos mostrado que o protocolo de treinamento T2 induziu aumento na concentração plasmática de Epo. Já foi demonstrado que o tratamento com captopril em humanos saudáveis não modifica a produção de Epo¹³⁰. Portanto, é improvável que a Epo seja o principal responsável pelas adaptações eritropoiéticas induzidas

pelo protocolo de treinamento T2, pois em ambos os grupos, T2 e T2-Cap, a Epo estava elevada.

Além dos efeitos que o tetrapeptídeo Ac-SDKP exerce sobre as células tronco hematopoiéticas, diversos estudos descreveram que o Ac-SDKP tem papel importante sobre a proliferação de outros tipos celulares^{131; 132; 133; 134; 135; 136}. O Ac-SDKP inibiu o aumento na proliferação de fibroblastos cardíacos *in vitro* induzido por incubação com soro bovino fetal¹³² e a incorporação de 3 hidróxi-prolina e síntese de colágeno em resposta a estimulação com endotelina-1¹³¹. Outros estudos mostraram efeito do Ac-SDKP sobre a angiogênese^{135; 136}. Concentrações nanomolares de Ac-SDKP foram capazes de estimular a migração de células endoteliais e a diferenciação dessas células em estruturas similares a tubos *in vitro*. Ainda, *in vivo*, o Ac-SDKP promoveu resposta angiogênica no embrião de frango e no músculo de rato, além de ter induzido a formação de vasos sanguíneos em matrigel implantada subcutaneamente em ratos¹³⁵. Posteriormente, Wang et al. observaram que a administração crônica de Ac-SDKP promovia neovascularização na córnea e aumentava a densidade capilar no miocárdio após infarto em ratos¹³⁶. Pelo fato dos inibidores da ECA aumentarem a concentração plasmática de Ac-SDKP, foi sugerido que os efeitos descritos acima seriam parte do efeito cardioprotetor dos inibidores da ECA, como a redução no depósito de colágeno cardíaco e aumento na vascularização do miocárdio.

É amplamente sabido que o treinamento físico induz aumento na vascularização do miocárdio e aumento na massa cardíaca, processo que resulta em uma hipertrofia cardíaca fisiológica, na qual o coração apresenta melhora nas funções sistólica e diastólica¹³⁷. No presente estudo, observamos redução no tamanho do ventrículo esquerdo nos animais tratados com captopril em comparação aos não-tratados, embora não tenhamos observado alteração nos parâmetros funcionais analisados, como no tempo total de exercício e na distância total percorrida durante o teste máximo em esteira. Portanto, é possível que o tratamento com captopril tenha exercido efeito em outros tipos celulares, por meio do aumento na concentração de Ac-SDKP, como, por exemplo, sobre fibroblastos cardíacos, o que levaria a menor deposição de colágeno cardíaco e sobre células endoteliais, o que pode ter resultado em aumento na vascularização do miocárdio. Em conjunto, esses possíveis efeitos do captopril resultariam em um coração mais leve e mais vascularizado, o que seria traduzido em uma manutenção na função cardíaca nos animais tratados com captopril quando comparados aos não-tratados.

A descoberta da presença de mRNA do SRA em regiões do cérebro¹³⁸ incitou a discussão sobre a função desse sistema centralmente. Estudos recentes vêm sugerindo que o SRA cerebral estaria envolvido com ajustes metabólicos¹³⁹, termorregulatórios¹⁴⁰ e na eficiência mecânica e custo metabólico¹⁴¹ durante o exercício em ratos.

Esses estudos mostraram que a infusão intracerebroventricular de losartan, um bloqueador dos receptores AT1, induziu um aumento significativo na taxa de aumento da temperatura corporal e um aumento na temperatura limiar para o início da vasodilatação caudal durante o exercício¹⁴⁰, induziu aumento significativo no consumo de oxigênio, o que produziu um aumento de 19% no custo metabólico durante o exercício comparado ao controle, com uma redução significativa na eficiência mecânica¹⁴¹ e produziu aumento na hiperglicemia e aumento a mobilização de ácidos graxos livres do tecido adiposo¹³⁹. Todos esses fatores em conjunto levaram a precipitação da fadiga e a redução do desempenho físico dos animais.

Os autores sugeriram que a transmissão angiotensinérgica central desempenharia papel importante sobre a termorregulação durante o exercício pelo aumento na dissipação de calor por meio da vasodilatação periférica, prevenindo níveis altos de armazenamento de calor, além de papel importante nos ajustes metabólicos durante o exercício por meio da modulação da produção de calor e melhorando a eficiência mecânica e também participaria na modulação da ativação precoce do sistema simpático durante o exercício, pois houve maior mobilização de ácidos graxos livres, hiperglicemia e hiperlactemia para uma mesma intensidade absoluta de exercício com a infusão intracerebroventricular de losartan.

Independente da duração e intensidade do exercício ocorre um aumento abrupto inicial na atividade simpática necessário para adaptar o organismo para o novo quadro de demanda metabólica¹⁴². Após esse primeiro aumento abrupto na atividade simpática, os aumentos subsequentes são proporcionais à intensidade do exercício¹⁴². Os dados dos estudos de Leite et al.^{139; 140; 141} sugerem que o bloqueio central dos receptores AT1 induz um aumento mais rápido da atividade simpática em intensidades mais baixas de exercício.

Diversos estudos observaram a expressão de receptores adrenérgicos em CTH^{143; 144} e sugerem que a ativação simpática na medula óssea causa proliferação e mobilização de CTH para a circulação^{144; 145; 146; 147; 148; 149}. Embora não tenhamos medido nenhum parâmetro de ativação simpática durante o exercício, é improvável que o tratamento com captopril tenha exercido efeitos centrais importantes nos animais do presente estudo.

Primeiramente, no nosso estudo, o captopril foi dado na água de beber e não está claro se o captopril atravessa a barreira hematoencefálica. A barreira hematoencefálica é formada por *tight junctions* endoteliais que previne todas as substâncias hidrosolúveis de entrar no interstício cerebral a partir do sangue¹⁵⁰. Foi sugerido que o captopril não atravessaria a barreira hematoencefálica em condições normais^{151; 152; 153}, mas outros grupos reportaram que o tratamento crônico com captopril leva a inibição da ECA cerebral^{154; 155}. Segundo, caso o captopril tenha atravessado a barreira hematoencefálica, a dose de captopril utilizada parece influenciar na capacidade da droga de atravessar a barreira hematoencefálica¹⁵², e foi mostrado que doses menores do que 25 mg/kg por dia infundidas intravenosamente não são capazes de bloquear a ECA cerebral. No presente estudo o captopril foi dado na dose de 10 mg/kg por dia. Terceiro, embora não tenhamos conhecimento de estudos que tenham analisado a ativação central ou a transmissão angiotensinérgica central durante o exercício com o tratamento oral de captopril em ratos, é pouco provável que o captopril tenha exercido efeitos centrais relevantes e que esses efeitos, mesmo se existiram, foram pouco importantes e parecem não ter influenciado nas respostas observadas no presente estudo. Além do fato de aparentemente o captopril não cruzar a barreira hematoencefálica em condições normais, a dose utilizada no presente estudo não afetou sequer a concentração plasmática de Ang II. Além disso, os resultados do presente estudo mostraram que as adaptações morfológicas, bioquímicas e funcionais dos animais submetidos ao treinamento físico não sofreram influência do tratamento com captopril. Mais especificamente, nos trabalhos de Leite et al.^{139; 140; 141}, além da droga utilizada ter sido o losartan, e não o captopril como no presente estudo, esta foi infundida intracerebroventricularmente, enquanto no presente estudo o captopril foi dado na água de beber. Além disso, nos estudos de Leite et al.^{139; 140; 141} o tempo até a fadiga durante o exercício foi reduzido, seja ele realizado de forma graduada¹³⁹ ou com intensidade constante^{140; 141}, enquanto no presente estudo o tempo até a fadiga durante o exercício graduado dos animais tratados com captopril não diferiu do tempo até a fadiga dos seus respectivos controles. Nem tampouco o desempenho dos animais nas sessões de treinamento diferiu, sejam eles tratados com captopril ou não. Finalmente, a ativação simpática aumenta a proliferação e mobilização de CTH da medula óssea^{145; 146; 149} e os resultados do presente mostraram que o tratamento com captopril inibiu o aumento nas CTH induzido pelo treinamento físico. Se de fato ocorreu ação central do captopril nos animais tratados no presente estudo e esta ação central tivesse sido capaz de causar efeitos similares aos

observados por Leite et al.^{139; 140; 141} com o uso de losartan, deveríamos esperar maior ativação simpática e, com isso, maior proliferação e mobilização de CTH, resultados contrários aos encontrados no presente estudo.

Todas essas evidências sugerem que o tratamento com captopril utilizado no presente estudo não influenciou nos ajustes metabólicos ou na fadiga durante o exercício e que se houve passagem da droga pela barreira hematoencefálica, a dose utilizada não foi suficiente para influenciar a transmissão angiotensinérgica central.

Em resumo, na série de experimentos 2, mostramos que o treinamento físico leva a adaptações no sistema eritropoiético e que quando ocorre inibição do sítio NH₂-terminal da ECA durante o treinamento físico ocorre inibição ou atenuação das adaptações eritropoiéticas observadas. A manutenção de Ac-SDKP em níveis elevados durante o treinamento é responsável pelos efeitos observados (figura 15).

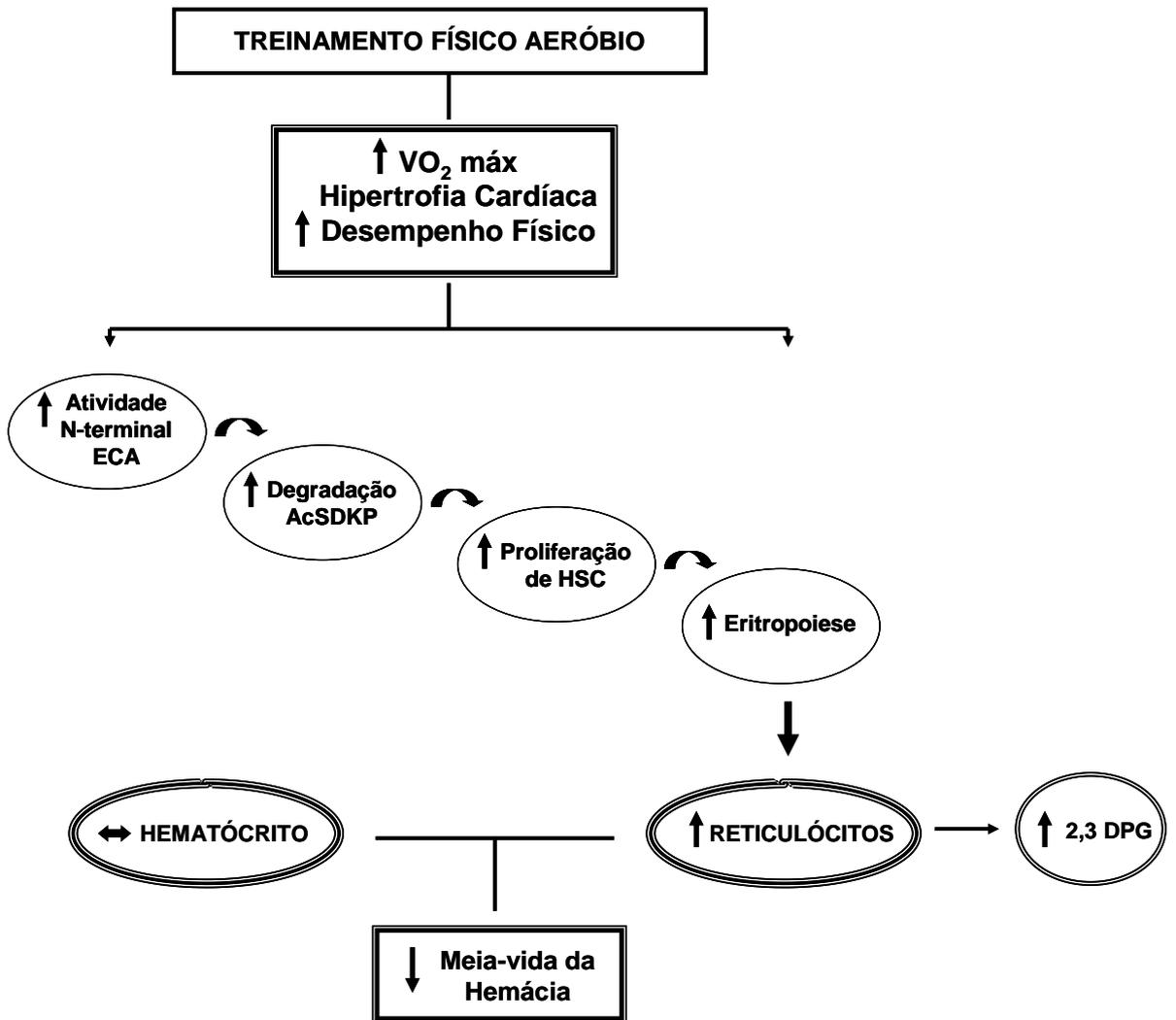


Figura – 15 O aumento da atividade do sítio NH₂-terminal da ECA como resposta ao treinamento físico reduz a concentração do tetrapeptídeo Ac-SDKP e aumenta a eritropoiese e causa redução na meia-vida das hemácias.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados, concluímos que o treinamento físico de alta frequência diária estimula a hematopoiese por meio do aumento na atividade do sítio NH₂-terminal da enzima conversora de angiotensina I, o que aumenta a hidrólise do tetrapeptídeo hemorregulador negativo, Ac-SDKP.

REFERÊNCIAS

- ¹ BARAUNA, V. G. et al. AT1 receptor participates in the cardiac hypertrophy induced by resistance training in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 295, n. 2, p. R381-7, Aug 2008.
- ² OLIVEIRA, E. M. et al. Local renin-angiotensin system regulates left ventricular hypertrophy induced by swimming training independent of circulating renin: a pharmacological study. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v. 10, n. 1, p. 15-23, Mar 2009.
- ³ DO CARMO, E. C. et al. Anabolic Steroid Associated To Physical Training Induces Deleterious Cardiac Effects. **Medicine and science in sports and exercise**, Mar 10 2011.
- ⁴ ZAMO, F. S. et al. The renin-angiotensin system is modulated by swimming training depending on the age of spontaneously hypertensive rats. **Life sciences**, v. 89, n. 3-4, p. 93-9, Jul 18 2011.
- ⁵ FERNANDES, T. et al. Aerobic Exercise Training-Induced Left Ventricular Hypertrophy Involves Regulatory MicroRNAs, Decreased Angiotensin-Converting Enzyme-Angiotensin II, and Synergistic Regulation of Angiotensin-Converting Enzyme 2-Angiotensin (1-7). **Hypertension**, v. 58, n. 2, p. 182-9, Aug 2011.
- ⁶ SCHWAGER, S. L.; CARMONA, A. K.; STURROCK, E. D. A high-throughput fluorimetric assay for angiotensin I-converting enzyme. **Nat Protoc**, v. 1, n. 4, p. 1961-4, 2006.
- ⁷ CARMONA, A. K. et al. A continuous fluorescence resonance energy transfer angiotensin I-converting enzyme assay. **Nat Protoc**, v. 1, n. 4, p. 1971-6, 2006.
- ⁸ FUCHS, S. et al. Angiotensin-converting enzyme C-terminal catalytic domain is the main site of angiotensin I cleavage in vivo. **Hypertension**, v. 51, n. 2, p. 267-74, Feb 2008.
- ⁹ RIEGER, K. J. et al. Involvement of human plasma angiotensin I-converting enzyme in the degradation of the haemoregulatory peptide N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline. **Biochem J**, v. 296 (Pt 2), p. 373-8, Dec 1 1993.
- ¹⁰ ROUSSEAU, A. et al. The hemoregulatory peptide N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro is a natural and specific substrate of the N-terminal active site of human angiotensin-converting enzyme. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 8, p. 3656-61, Feb 24 1995.

- ¹¹ AZIZI, M. et al. Acute angiotensin-converting enzyme inhibition increases the plasma level of the natural stem cell regulator N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline. **The Journal of clinical investigation**, v. 97, n. 3, p. 839-44, Feb 1 1996.
- ¹² COMTE, L. et al. Effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitor enalapril on blood haematopoietic progenitors and acetyl-N-Ser-Asp-Lys-Pro concentrations. **Eur J Clin Invest**, v. 27, n. 9, p. 788-90, Sep 1997.
- ¹³ SCHMIDT, W. et al. Training induced effects on blood volume, erythrocyte turnover and haemoglobin oxygen binding properties. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**, v. 57, n. 4, p. 490-8, 1988.
- ¹⁴ GREEN, H. J. et al. Training-induced hypervolemia: lack of an effect on oxygen utilization during exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 19, n. 3, p. 202-6, Jun 1987.
- ¹⁵ ERNST, E. Changes in blood rheology produced by exercise. **JAMA**, v. 253, n. 20, p. 2962-3, May 24-31 1985.
- ¹⁶ CONVERTINO, V. A.; KEIL, L. C.; GREENLEAF, J. E. Plasma volume, renin, and vasopressin responses to graded exercise after training. **J Appl Physiol**, v. 54, n. 2, p. 508-14, Feb 1983.
- ¹⁷ STEWART, G. A. et al. Observations on the haematology and the iron and protein intake of Australian olympic athletes. **Med J Aust**, v. 2, n. 24, p. 1339-43, Dec 9 1972.
- ¹⁸ BROTHERHOOD, J.; BROZOVIC, B.; PUGH, L. G. Haematological status of middle- and long-distance runners. **Clin Sci Mol Med**, v. 48, n. 2, p. 139-45, Feb 1975.
- ¹⁹ DIEHL, D. M. et al. Effects of physical training and competition on the iron status of female field hockey players. **Int J Sports Med**, v. 7, n. 5, p. 264-70, Oct 1986.
- ²⁰ CLEMENT, D. B. et al. Iron status in Winter Olympic sports. **J Sports Sci**, v. 5, n. 3, p. 261-71, Winter 1987.
- ²¹ HASIBEDER, W.; SCHOBERSBERGER, W.; MAIRBAURL, H. Red cell oxygen transport before and after short-term maximal swimming in dependence on training status. **Int J Sports Med**, v. 8, n. 2, p. 105-8, Apr 1987.
- ²² MAGAZANIK, A. et al. Iron deficiency caused by 7 weeks of intensive physical exercise. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**, v. 57, n. 2, p. 198-202, 1988.

- ²³ YOSHIMURA, H. Anemia during physical training (sports anemia). **Nutr Rev**, v. 28, n. 10, p. 251-3, Oct 1970.
- ²⁴ ROBERTSON, J. D.; MAUGHAN, R. J.; DAVIDSON, R. J. Changes in red cell density and related indices in response to distance running. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**, v. 57, n. 2, p. 264-9, 1988.
- ²⁵ WEIGHT, L. M.; BYRNE, M. J.; JACOBS, P. Haemolytic effects of exercise. **Clin Sci (Lond)**, v. 81, n. 2, p. 147-52, Aug 1991.
- ²⁶ PUHL, J. L.; RUNYAN, W. S. Hematological variations during aerobic training of college women. **Res Q Exerc Sport**, v. 51, n. 3, p. 533-41, Oct 1980.
- ²⁷ SZYGULA, Z. Erythrocytic system under the influence of physical exercise and training. **Sports Med**, v. 10, n. 3, p. 181-97, Sep 1990.
- ²⁸ BENESCH, R.; BENESCH, R. E. The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 26, n. 2, p. 162-7, Jan 23 1967.
- ²⁹ GLASS, G. A.; GERSHON, D.; GERSHON, H. Some characteristics of the human erythrocyte as a function of donor and cell age. **Exp Hematol**, v. 13, n. 11, p. 1122-6, Dec 1985.
- ³⁰ AUDRAN, M. et al. Effects of erythropoietin administration in training athletes and possible indirect detection in doping control. **Med Sci Sports Exerc**, v. 31, n. 5, p. 639-45, May 1999.
- ³¹ SCHMIDT, W. et al. Changes in plasma volume and red cell formation after a marathon competition. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**, v. 58, n. 5, p. 453-8, 1989.
- ³² BELLANTUONO, I. Haemopoietic stem cells. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 36, n. 4, p. 607-20, Apr 2004.
- ³³ BROWN, G. et al. The sequential determination model of hematopoiesis. **Trends Immunol**, v. 28, n. 10, p. 442-8, Oct 2007.
- ³⁴ WAHL, P.; BLOCH, W.; SCHMIDT, A. Exercise has a positive effect on endothelial progenitor cells, which could be necessary for vascular adaptation processes. **Int J Sports Med**, v. 28, n. 5, p. 374-80, May 2007.

- 35 GAJKOWSKA, A. et al. Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells in leukapheresis product and bone marrow for clinical transplantation: a comparison of three methods. **Folia Histochem Cytobiol**, v. 44, n. 1, p. 53-60, 2006.
- 36 BONSIGNORE, M. R. et al. Circulating hematopoietic progenitor cells in runners. **J Appl Physiol**, v. 93, n. 5, p. 1691-7, Nov 2002.
- 37 IKEDA, N. et al. Daily exercise and bone marrow-derived CD34+/133+ cells after myocardial infarction treated by bare metal stent implantation. **Circ J**, v. 72, n. 6, p. 897-901, Jun 2008.
- 45 SOUBRIER, F. et al. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 24, p. 9386-90, Dec 1988.
- 46 KOIKE, G. et al. Angiotensin converting enzyme and genetic hypertension: cloning of rat cDNAs and characterization of the enzyme. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 198, n. 1, p. 380-6, Jan 14 1994.
- 47 ERDOS, E. G.; SKIDGEL, R. A. Renal metabolism of angiotensin I and II. **Kidney Int Suppl**, v. 30, p. S24-7, Nov 1990.
- 48 ERDOS, E. G. Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years. Lewis K. Dahl memorial lecture. **Hypertension**, v. 16, n. 4, p. 363-70, Oct 1990.
- 49 _____. Some old and some new ideas on kinin metabolism. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 15 Suppl 6, p. S20-4, 1990.
- 50 HAZNEDAROGLU, I. C. A local renin--angiotensin system in the bone marrow: hypothesis and clues. **Exp Hematol**, v. 27, n. 1, p. 186-7, Jan 1999.
- 51 _____. Postrenal transplant erythrocytosis, ACE inhibitors and a hypothetical local renin-angiotensin system in the bone marrow. **Clin Nephrol**, v. 48, n. 1, p. 60, Jul 1997.
- 52 _____. Angiotensin I-converting enzyme, blood groups, and a local marrow-specific renin-angiotensin system. **Exp Hematol**, v. 25, n. 2, p. 93, Feb 1997.
- 53 HAZNEDAROGLU, I. C.; BUYUKASIK, Y. Current evidence for the existence of a local renin-angiotensin system affecting physiological and pathological haemopoiesis in the bone marrow. **Br J Haematol**, v. 99, n. 2, p. 471, Nov 1997.

- 54 HAZNEDAROGLU, I. C.; GULLU, I. H. Hematological side effects of ACE inhibitors and a hypothetical local renin-angiotensin system in the bone marrow. **Nephron**, v. 77, n. 1, p. 111, 1997.
- 55 HAZNEDAROGLU, I. C.; SAVAS, M. C.; BENEKLI, M. Renin-like activity in leukemic blast cells: an initial clue to a local renin-angiotensin system in the bone marrow. **Ann Hematol**, v. 75, n. 1-2, p. 69-70, Jul-Aug 1997.
- 56 HAZNEDAROGLU, I. C. Haematopoietic effects of ACE inhibitors and local bone marrow renin-angiotensin system: An hypothesis. **Nephrol Dial Transplant**, v. 11, n. 11, p. 2373, Nov 1996.
- 57 HAZNEDAROGLU, I. C.; TUNCER, S.; GURSOY, M. A local renin-angiotensin system in the bone marrow. **Med Hypotheses**, v. 46, n. 6, p. 507-10, Jun 1996.
- 58 WULF, G. G. et al. Paraneoplastic hypokalemia in acute myeloid leukemia: a case of renin activity in AML blast cells. **Ann Hematol**, v. 73, n. 3, p. 139-41, Sep 1996.
- 59 MRUG, M. et al. Angiotensin II stimulates proliferation of normal early erythroid progenitors. **J Clin Invest**, v. 100, n. 9, p. 2310-4, Nov 1 1997.
- 60 RODGERS, K. E. et al. Effect of angiotensin II on hematopoietic progenitor cell proliferation. **Stem Cells**, v. 18, n. 4, p. 287-94, 2000.
- 61 MARUSIC-VRSALOVIC, M. et al. Angiotensin I-converting enzyme is expressed by erythropoietic cells of normal and myeloproliferative bone marrow. **Br J Haematol**, v. 123, n. 3, p. 539-41, Nov 2003.
- 62 ZAMBIDIS, E. T. et al. Expression of angiotensin-converting enzyme (CD143) identifies and regulates primitive hemangioblasts derived from human pluripotent stem cells. **Blood**, v. 112, n. 9, p. 3601-14, Nov 1 2008.
- 63 HAZNEDAROGLU, F. Efficacy of various concentrations of citric acid at different pH values for smear layer removal. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 96, n. 3, p. 340-4, Sep 2003.
- 64 STRAWN, W. B. et al. Renin-angiotensin system expression in rat bone marrow haematopoietic and stromal cells. **Br J Haematol**, v. 126, n. 1, p. 120-6, Jul 2004.

- ⁶⁵ HUBERT, C. et al. The hematopoietic system: a new niche for the renin-angiotensin system. **Nat Clin Pract Cardiovasc Med**, v. 3, n. 2, p. 80-5, Feb 2006.
- ⁶⁶ PARK, T. S.; ZAMBIDIS, E. T. A role for the renin-angiotensin system in hematopoiesis. **Haematologica**, v. 94, n. 6, p. 745-7, Jun 2009.
- ⁶⁷ LENFANT, M. et al. Suppression of mast cell colony formation by a low molecular weight fraction of fetal calf bone marrow extract. **Leuk Res**, v. 13, n. 12, p. 1085-9, 1989.
- ⁶⁸ LENFANT, M. et al. Inhibitor of hematopoietic pluripotent stem cell proliferation: purification and determination of its structure. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 3, p. 779-82, Feb 1989.
- ⁶⁹ BONNET, D. et al. Direct and reversible inhibitory effect of the tetrapeptide acetyl-N-Ser-Asp-Lys-Pro (Seraspenide) on the growth of human CD34+ subpopulations in response to growth factors. **Blood**, v. 82, n. 11, p. 3307-14, Dec 1 1993.
- ⁷⁰ GRILLON, C. et al. Involvement of thymosin beta 4 and endoproteinase Asp-N in the biosynthesis of the tetrapeptide AcSerAspLysPro a regulator of the hematopoietic system. **FEBS Lett**, v. 274, n. 1-2, p. 30-4, Nov 12 1990.
- ⁷¹ ZHUO, J. L. et al. Characterization and localization of Ac-SDKP receptor binding sites using 125I-labeled Hpp-Aca-SDKP in rat cardiac fibroblasts. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 292, n. 2, p. H984-93, Feb 2007.
- ⁷² KANASAKI, K. et al. N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline inhibits DNA synthesis in human mesangial cells via up-regulation of cell cycle modulators. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 342, n. 3, p. 758-65, Apr 14 2006.
- ⁷³ PRADELLES, P. et al. Distribution of a negative regulator of haematopoietic stem cell proliferation (AcSDKP) and thymosin beta 4 in mouse tissues. **FEBS Lett**, v. 289, n. 2, p. 171-5, Sep 9 1991.
- ⁷⁴ ISRAELS, E. D.; ISRAELS, L. G. The cell cycle. **Stem Cells**, v. 19, n. 1, p. 88-91, 2001.
- ⁷⁵ CASHMAN, J. D.; EAVES, A. C.; EAVES, C. J. The tetrapeptide AcSDKP specifically blocks the cycling of primitive normal but not leukemic progenitors in long-term culture: evidence for an indirect mechanism. **Blood**, v. 84, n. 5, p. 1534-42, Sep 1 1994.

- ⁷⁶ ROUSSEAU, A. et al. The hemoregulatory peptide N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro is a natural and specific substrate of the N-terminal active site of human angiotensin-converting enzyme. **J Biol Chem**, v. 270, n. 8, p. 3656-61, Feb 24 1995.
- ⁷⁷ CHISI, J. E.; WDZIECZAK-BAKALA, J.; RICHES, A. C. Inhibitory action of the peptide AcSDKP on the proliferative state of hematopoietic stem cells in the presence of captopril but not lisinopril. **Stem Cells**, v. 15, n. 6, p. 455-60, 1997.
- ⁷⁸ CHISI, J. E. et al. Captopril inhibits the proliferation of hematopoietic stem and progenitor cells in murine long-term bone marrow cultures. **Stem Cells**, v. 17, n. 6, p. 339-44, 1999.
- ⁷⁹ AZIZI, M. et al. Acute angiotensin-converting enzyme inhibition increases the plasma level of the natural stem cell regulator N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline. **J Clin Invest**, v. 97, n. 3, p. 839-44, Feb 1 1996.
- ⁸⁰ AZIZI, M. et al. Renal and metabolic clearance of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline (AcSDKP) during angiotensin-converting enzyme inhibition in humans. **Hypertension**, v. 33, n. 3, p. 879-86, Mar 1999.
- ⁸¹ CHISI, J. E. et al. Captopril inhibits in vitro and in vivo the proliferation of primitive haematopoietic cells induced into cell cycle by cytotoxic drug administration or irradiation but has no effect on myeloid leukaemia cell proliferation. **Br J Haematol**, v. 109, n. 3, p. 563-70, Jun 2000.
- ⁸² CLELAND, J. G. et al. Captopril in heart failure. A double blind controlled trial. **Br Heart J**, v. 52, n. 5, p. 530-5, Nov 1984.
- ⁸³ CLELAND, J. G.; GILLEN, G.; DARGIE, H. J. The effects of frusemide and angiotensin-converting enzyme inhibitors and their combination on cardiac and renal haemodynamics in heart failure. **Eur Heart J**, v. 9, n. 2, p. 132-41, Feb 1988.
- ⁸⁴ ISHANI, A. et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitor as a risk factor for the development of anemia, and the impact of incident anemia on mortality in patients with left ventricular dysfunction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 45, n. 3, p. 391-9, Feb 1 2005.
- ⁸⁵ STUDER, A.; VETTER, W. Reversible leucopenia associated with angiotensin-converting-enzyme inhibitor MK 421. **Lancet**, v. 1, n. 8269, p. 458, Feb 20 1982.
- ⁸⁶ GRIFFING, G. T.; MELBY, J. C. Enalapril (MK-421) and the white cell count and haematocrit. **Lancet**, v. 1, n. 8285, p. 1361, Jun 12 1982.

- ⁸⁷ CLELAND, J. G.; DARGIE, H. J.; ROBERTSON, J. I. Angiotensin converting enzyme inhibition in heart failure. **Br J Clin Pharmacol**, v. 18 Suppl 2, p. 157S-160S, 1984.
- ⁸⁸ GLICKLICH, D. et al. Effects of erythropoietin, angiotensin II, and angiotensin-converting enzyme inhibitor on erythroid precursors in patients with posttransplantation erythrocytosis. **Transplantation**, v. 68, n. 1, p. 62-6, Jul 15 1999.
- ⁸⁹ GLICKLICH, D. et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition induces apoptosis in erythroid precursors and affects insulin-like growth factor-1 in posttransplantation erythrocytosis. **J Am Soc Nephrol**, v. 12, n. 9, p. 1958-64, Sep 2001.
- ⁹⁰ VAN DER MEER, P. et al. Levels of hematopoiesis inhibitor N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline partially explain the occurrence of anemia in heart failure. **Circulation**, v. 112, n. 12, p. 1743-7, Sep 20 2005.
- ⁹¹ MICHAUD, A. et al. Substrate dependence of angiotensin I-converting enzyme inhibition: captopril displays a partial selectivity for inhibition of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline hydrolysis compared with that of angiotensin I. **Mol Pharmacol**, v. 51, n. 6, p. 1070-6, Jun 1997.
- ⁹² JUNOT, C. et al. In vivo assessment of captopril selectivity of angiotensin I-converting enzyme inhibition: differential inhibition of acetyl-ser-asp-lys-pro and angiotensin I hydrolysis. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 289, n. 3, p. 1257-61, Jun 1999.
- ⁹³ JUNOT, C. et al. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on plasma, urine, and tissue concentrations of hemoregulatory peptide acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro in rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 291, n. 3, p. 982-7, Dec 1999.
- ⁹⁴ SCHAIBLE, T. F.; SCHEUER, J. Cardiac function in hypertrophied hearts from chronically exercised female rats. **Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology**, v. 50, n. 6, p. 1140-5, Jun 1981.
- ⁹⁵ BAKER, M. A.; HORVATH, S. M. Influence of Water Temperature on Oxygen Uptake by Swimming Rats. **J Appl Physiol**, v. 19, p. 1215-8, Nov 1964.
- ⁹⁶ SRERE, P. A. Studies on purified citrate-enzymes: metabolic interpretations. **Biochemical Society symposium**, v. 27, p. 11-21, 1968.

- 97 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976.
- 98 ALVES, M. F. et al. A continuous fluorescent assay for the determination of plasma and tissue angiotensin I-converting enzyme activity. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, n. 6, p. 861-8, Jun 2005.
- 99 KEENEY, M. et al. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. **Cytometry**, v. 34, n. 2, p. 61-70, Apr 15 1998.
- 100 BROCKLEBANK, A. M.; SPARROW, R. L. Enumeration of CD34+ cells in cord blood: a variation on a single-platform flow cytometric method based on the ISHAGE gating strategy. **Cytometry**, v. 46, n. 4, p. 254-61, Aug 15 2001.
- 101 MONTGOMERY, H. E. et al. Association of angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism with change in left ventricular mass in response to physical training. **Circulation**, v. 96, n. 3, p. 741-7, Aug 5 1997.
- 102 EVANGELISTA, F. S.; BRUM, P. C.; KRIEGER, J. E. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 12, p. 1751-9, Dec 2003.
- 103 MEDEIROS, A. et al. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 12, p. 1909-17, Dec 2004.
- 104 EVANGELISTA, F. S.; KRIEGER, J. E. Small gene effect and exercise training-induced cardiac hypertrophy in mice: an Ace gene dosage study. **Physiol Genomics**, v. 27, n. 3, p. 231-6, Nov 27 2006.
- 105 LAUFS, U. et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. **Circulation**, v. 109, n. 2, p. 220-6, Jan 20 2004.
- 106 MAIRBAURL, H. et al. Training-dependent changes of red cell density and erythrocytic oxygen transport. **Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology**, v. 55, n. 5, p. 1403-7, Nov 1983.
- 107 REINHART, W. H.; STAUBLI, M.; STRAUB, P. W. Impaired red cell filterability with elimination of old red blood cells during a 100-km race. **J Appl Physiol**, v. 54, n. 3, p. 827-30, Mar 1983.

- 108 NASH, G. B.; WYARD, S. J. Erythrocyte membrane elasticity during in vivo ageing. **Biochim Biophys Acta**, v. 643, n. 2, p. 269-75, May 6 1981.
- 109 CHIEN, S. Red cell deformability and its relevance to blood flow. **Annu Rev Physiol**, v. 49, p. 177-92, 1987.
- 110 FISCHKOFF, S.; VANDERKOOI, J. M. Oxygen diffusion in biological and artificial membranes determined by the fluorochrome pyrene. **J Gen Physiol**, v. 65, n. 5, p. 663-76, May 1975.
- 111 COSTA, M. F. et al. Effects of two training protocols on Angiotensin I-converting enzyme (ACE) activity in horses. **Equine veterinary journal**, Mar 15 2011.
- 112 WEI, L. et al. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. **J Biol Chem**, v. 266, n. 14, p. 9002-8, May 15 1991.
- 113 SAITOH, T. et al. Comparison of erythropoietic response to androgen in young and old senescence accelerated mice. **Mechanisms of ageing and development**, v. 109, n. 2, p. 125-39, Aug 30 1999.
- 114 HOSSEINIMEHR, S. J.; ZAKARYAEE, V.; FROUGHIZADEH, M. Oral oxymetholone reduces mortality induced by gamma irradiation in mice through stimulation of hematopoietic cells. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 287, n. 1-2, p. 193-9, Jul 2006.
- 115 GORSHEIN, D.; MURPHY, S.; GARDNER, F. H. Comparative study on the erythropoietic effects of androgens and their mode of action. **Journal of applied physiology**, v. 35, n. 3, p. 276-8, Sep 1973.
- 116 BESA, E. C. Hematologic effects of androgens revisited: an alternative therapy in various hematologic conditions. **Seminars in hematology**, v. 31, n. 2, p. 134-45, Apr 1994.
- 117 PAULO, L. G. et al. Effects of several androgens and steroid metabolites on erythropoietin production in the isolated perfused dog kidney. **Blood**, v. 43, n. 1, p. 39-47, Jan 1974.
- 118 SINGER, J. W.; ADAMSON, J. W. Steroids and hematopoiesis. III. The response of granulocytic and erythroid colony-forming cells to steroids of different classes. **Blood**, v. 48, n. 6, p. 855-64, Dec 1976.
- 119 LORD, B. I.; MURPHY, M. J., JR. The estrous cycle and the hemopoietic stem cell in the mouse. **Blood**, v. 40, n. 3, p. 390-3, Sep 1972.

- 120 FADINI, G. P. et al. Gender differences in endothelial progenitor cells and cardiovascular risk profile: the role of female estrogens. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 28, n. 5, p. 997-1004, May 2008.
- 121 FORESTA, C. et al. Role of estrogen receptors in menstrual cycle-related neoangiogenesis and their influence on endothelial progenitor cell physiology. **Fertility and sterility**, v. 93, n. 1, p. 220-8, Jan 2010.
- 122 THURMOND, T. S. et al. Role of estrogen receptor alpha in hematopoietic stem cell development and B lymphocyte maturation in the male mouse. **Endocrinology**, v. 141, n. 7, p. 2309-18, Jul 2000.
- 123 LEMIEUX, C.; CLOUTIER, I.; TANGUAY, J. F. Menstrual cycle influences endothelial progenitor cell regulation: a link to gender differences in vascular protection? **International journal of cardiology**, v. 136, n. 2, p. 200-10, Aug 14 2009.
- 124 MASUDA, H. et al. Estrogen-mediated endothelial progenitor cell biology and kinetics for physiological postnatal vasculogenesis. **Circulation research**, v. 101, n. 6, p. 598-606, Sep 14 2007.
- 125 SCHANK, J. C.; MCCLINTOCK, M. K. A coupled-oscillator model of ovarian-cycle synchrony among female rats. **Journal of theoretical biology**, v. 157, n. 3, p. 317-62, Aug 7 1992.
- 126 ZUCALI, J. R. et al. Regulation of early human hematopoietic (BFU-E and CFU-GEMM) progenitor cells in vitro by interleukin 1-induced fibroblast-conditioned medium. **Blood**, v. 69, n. 1, p. 33-7, Jan 1987.
- 127 MIGLIACCIO, A. R.; MIGLIACCIO, G. The control of proliferation and differentiation of early erythroid progenitors. **Biotherapy**, v. 2, n. 4, p. 299-303, 1990.
- 128 JUNOT, C. et al. RXP 407, a selective inhibitor of the N-domain of angiotensin I-converting enzyme, blocks in vivo the degradation of hemoregulatory peptide acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro with no effect on angiotensin I hydrolysis. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 297, n. 2, p. 606-11, May 2001.
- 129 DIVE, V. et al. RXP 407, a phosphinic peptide, is a potent inhibitor of angiotensin I converting enzyme able to differentiate between its two active sites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 8, p. 4330-5, Apr 13 1999.

- 130 FREUDENTHALER, S. M. et al. Angiotensin II increases erythropoietin production in healthy human volunteers. **Eur J Clin Invest**, v. 29, n. 10, p. 816-23, Oct 1999.
- 131 RHALEB, N. E. et al. Long-term effect of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline on left ventricular collagen deposition in rats with 2-kidney, 1-clip hypertension. **Circulation**, v. 103, n. 25, p. 3136-41, Jun 26 2001.
- 132 RHALEB, N. E. et al. Effect of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline on DNA and collagen synthesis in rat cardiac fibroblasts. **Hypertension**, v. 37, n. 3, p. 827-32, Mar 2001.
- 133 PENG, H. et al. Antifibrotic effects of N-acetyl-seryl-aspartyl-Lysyl-proline on the heart and kidney in aldosterone-salt hypertensive rats. **Hypertension**, v. 37, n. 2 Part 2, p. 794-800, Feb 2001.
- 134 DAI, G. et al. [Inhibitory effects of AcSDKP on proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells in vitro.]. **Sheng li xue bao : [Acta physiologica Sinica]**, v. 58, n. 2, p. 110-5, Apr 25 2006.
- 135 LIU, J. M. et al. The tetrapeptide AcSDKP, an inhibitor of primitive hematopoietic cell proliferation, induces angiogenesis in vitro and in vivo. **Blood**, v. 101, n. 8, p. 3014-20, Apr 15 2003.
- 136 WANG, D. et al. N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline stimulates angiogenesis in vitro and in vivo. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 287, n. 5, p. H2099-105, Nov 2004.
- 137 PAVLIK, G. et al. The athlete's heart Part I (Review). **Acta physiologica Hungarica**, v. 97, n. 4, p. 337-53, Dec 2010.
- 138 KEUNEKE, C. et al. The role of tissue renin-angiotensin systems in hypertension and effects of chronic converting-enzyme inhibition. **European heart journal**, v. 11 Suppl D, p. 11-6, May 1990.
- 139 LEITE, L. H. et al. Central angiotensin AT1 receptors are involved in metabolic adjustments in response to graded exercise in rats. **Peptides**, v. 30, n. 10, p. 1931-5, Oct 2009.
- 140 LEITE, L. H. et al. Central angiotensin AT1-receptor blockade affects thermoregulation and running performance in rats. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 291, n. 3, p. R603-7, Sep 2006.

- 141 LEITE, L. H. et al. Central AT(1) receptor blockade increases metabolic cost during exercise reducing mechanical efficiency and running performance in rats. **Neuropeptides**, v. 41, n. 3, p. 189-94, Jun 2007.
- 142 FEBBRAIO, M. A. et al. Effect of epinephrine on muscle glycogenolysis during exercise in trained men. **Journal of applied physiology**, v. 84, n. 2, p. 465-70, Feb 1998.
- 143 GIUDICE, A. et al. Circadian rhythms, adrenergic hormones and trafficking of hematopoietic stem cells. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 14, n. 5, p. 567-75, May 2010.
- 144 SPIEGEL, A. et al. Catecholaminergic neurotransmitters regulate migration and repopulation of immature human CD34+ cells through Wnt signaling. **Nature immunology**, v. 8, n. 10, p. 1123-31, Oct 2007.
- 145 FONSECA, R. B. et al. Adrenergic modulation of erythropoiesis following severe injury is mediated through bone marrow stroma. **Surgical infections**, v. 5, n. 4, p. 385-93, Winter 2004.
- 146 MENDEZ-FERRER, S.; BATTISTA, M.; FRENETTE, P. S. Cooperation of beta(2)- and beta(3)-adrenergic receptors in hematopoietic progenitor cell mobilization. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1192, p. 139-44, Mar 2010.
- 147 MAESTRONI, G. J. Neurohormones and catecholamines as functional components of the bone marrow microenvironment. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 917, p. 29-37, 2000.
- 148 BROWN, J. E.; ADAMSON, J. W. Modulation of in vitro erythropoiesis. The influence of beta-adrenergic agonists on erythroid colony formation. **The Journal of clinical investigation**, v. 60, n. 1, p. 70-7, Jul 1977.
- 149 KATAYAMA, Y. et al. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. **Cell**, v. 124, n. 2, p. 407-21, Jan 27 2006.
- 150 PARDRIDGE, W. M. Neuropeptides and the blood-brain barrier. **Annual review of physiology**, v. 45, p. 73-82, 1983.
- 151 HUTCHINSON, J. S.; MENDELSON, F. A.; DOYLE, A. E. Blood pressure responses of conscious normotensive and spontaneously hypertensive rats to intracerebroventricular and peripheral administration of captopril. **Hypertension**, v. 2, n. 4, p. 546-50, Jul-Aug 1980.

- ¹⁵² ELFONT, R. M.; EPSTEIN, A. N.; FITZSIMONS, J. T. Involvement of the renin-angiotensin system in captopril-induced sodium appetite in the rat. **The Journal of physiology**, v. 354, p. 11-27, Sep 1984.
- ¹⁵³ BARRY, D. I. et al. Effects of captopril on cerebral blood flow in normotensive and hypertensive rats. **The American journal of medicine**, v. 76, n. 5B, p. 79-85, May 31 1984.
- ¹⁵⁴ GIMBRONE, M. A., JR. et al. Angiotensin-converting enzyme activity in isolated brain microvessels. **Life sciences**, v. 25, n. 12, p. 1075-83, Sep 17 1979.
- ¹⁵⁵ AHMAD, M. et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors, inhibition of brain and peripheral angiotensin-converting enzymes, and left ventricular dysfunction in rats after myocardial infarction. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 51, n. 6, p. 565-72, Jun 2008.