JULIANA GONÇALVES DE BARROS

O papel da adenosina como reguladora do fluxo sanguíneo em ratos espontaneamente hipertensos jovens e adultos: efeitos do treinamento físico

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Edilamar Menezes de Oliveira

São Paulo

2009

JULIANA GONÇALVES DE BARROS

O papel da adenosina como reguladora do fluxo sanguíneo em ratos espontaneamente hipertensos jovens e adultos: efeitos do treinamento físico

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Edilamar Menezes de Oliveira

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Barros, Juliana Gonçalves de
O papel da adenosina como reguladora do fluxo sanguíneo em ratos espontaneamente hipertensos jovens e adultos : efeitos do treinamento físico / Juliana Gonçalves de Barros . -- São Paulo, 2009.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Edilamar Menezes de Oliveira.

Descritores: 1.Natação 2.Cardiomegalia 3.Fluxo sanguíneo regional 4.Microesferas coloridas 5.Adenosina

Dedico este trabalho em especial a Deus e a minha família por todas as bênçãos alcançadas em minha vida. Sem o amor deles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Agradecimento especial aos meus pais, Jose de Barros e Odette por todo amor, incentivo, atenção e suporte. Obrigada pelas “luas” em SP para me “churengar” e acalentar.

Aos meus amados irmãos e gurus Daniella e Timotheo pelo carinho e amizade. Vocês me ensinaram que somos os únicos responsáveis por nossas escolhas. Cheiro... Cheiro...!!!!! Foco nos estudos!!!!! 2004 aqui!!!!!!

Agradeço ao Rodrigo todo amor incondicional, paciência, convívio e compreensão. O amor é único e você é único. Obrigada pelo apoio nas horas mais difíceis!

A minha orientadora Profa. Dra. Edilamar Menezes de Oliveira pela orientação, aprendizado e oportunidade de crescer pessoal e profissionalmente. Edila, muito obrigada!

A minha amiga Fernanda Roque que participou diretamente deste trabalho e me ajudou em todos os momentos. Agradeço a oportunidade de aprender com você.

Aos meus colegas do laboratório de bioquímica da atividade motora da EEFE-USP que estiveram ao meu lado dando força durante minha estada em São Paulo, em especial Katt e Marcele.

As professoras do Laboratório de Hipertensão experimental do InCor por me receberem tão bem e cederem espaço para desenvolver etapas deste estudo: Profa. Dra. Maria Cláudia Irigoyen e Profa. Dra. Kátia de Angelis pelo apoio e colaboração.

Agradeço a Deus todas as oportunidades que surgiram a partir da escolha de buscar sempre o aperfeiçoamento profissional.

“Desenvolver força, coragem e paz interior demanda tempo. Não espere resultados rápidos e imediatos, sob o pretexto de que decidiu mudar. Cada ação que você executa permite que essa decisão se torne efetiva dentro do seu coração”.

Dalai Lama

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de figuras
Lista de abreviaturas
Resumo
Summary

1.INTRODUÇÃO..... 01
1.1 Revisão bibliográfica..... 02
1.1.1 Hipertensão arterial 02
1.1.2 Modelos de hipertensão arterial..... 04
1.1.2.1 Ratos espontaneamente hipertensos (SHR)..... 05
1.1.3 Efeitos do treinamento físico na hipertensão..... 07
1.1.3.1 Efeitos morfológicos – remodelamento cardíaco..... 08
1.1.3.2 Efeitos hemodinâmicos..... 10
1.1.4 Adenosina e fluxo sangüíneo..... 12
2. OBJETIVOS..... 16
2.1 Objetivos..... 17
2.1.1 Objetivo geral 17
2.1.2 Objetivos específicos..... 17
3. MÉTODOS..... 18
3.1 Amostra..... 19
3.1.1 Animais experimentais..... 19
3.2 Treinamento físico..... 21
3.3 Medidas hemodinâmicas..... 23
3.2.1 Medida direta da pressão arterial e freqüência cardíaca.. 23
3.4 Estudo Morfométrico..... 24
3.5 Determinação do fluxo sanguíneo..... 25
3.5.1 Técnica das microesferas coloridas..... 25
3.5.2 Infusão das microesferas no ventrículo esquerdo..... 26
3.5.3 Reagentes de digestão I e II..... 27
3.5.4 Retirada de sangue..... 28
3.5.5 Processamento dos tecidos..... 28
3.5.6 Extração do corante e medidas de absorbância..... 30
3.5.7 Determinação do número de microesferas..... 30
3.6 Análises bioquímicas..... 32
3.6.1 Preparo da fração de soro sanguíneo..... 32
3.6.2 Determinação das atividades enzimáticas..... 32
3.6.2.1 Atividade da ATP-difosfohidrolase..... 32
3.6.2.2 Atividade da 5`-nucleotidase..... 34
3.7 Análise estatística..... 34
4. RESULTADOS..... 35
5. DISCUSSÃO..... 44
6. CONCLUSÃO..... 53
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sistema de natação adaptado para ratos.....21

Figura 2 - Evolução do peso corporal em gramas a cada semana do protocolo experimental.....36

Figura 3 - Evolução do peso corporal em gramas a cada semana do protocolo experimental.....37

Figura 4 - Pressão Arterial Média (mmHg)..... 38

Figura 5 - Freqüência cardíaca de repouso (bpm).....39

Figura 6 –Hipertrofia cardíaca (mg/g)..... 39

Figura 7 - Fluxo sangüíneo coronário basal (n° de esferas / peso tecido)..40

Figura 8 - Fluxo sangüíneo coronário após adenosina (n° de esferas / peso tecido)..... 41

Figura 9 - Medida da Atividade enzimática da ATP-difosfohidrolase na fração de soro sanguíneo (nmol Pi/min/mg proteína)..... 42

Figura 10 - Medida da Atividade enzimática da ATP-difosfohidrolase na fração de soro sanguíneo (nmol Pi/min/mg proteína)..... 42

Figura 11 - Medida da Atividade enzimática da 5´- nucleotidase na fração de soro sanguíneo (nmol Pi/min/mg proteína).....43

LISTA DE ABREVIATURAS

ADO	adenosina
ADP	adenosina di-fosfato
AMP	adenosina mono-fosfato
ATP	adenosina tri-fosfato
AU	absorbância da amostra
BM	banho maria
FC	freqüência cardíaca
HC	hipertrofia cardíaca
HVE	hipertrofia do ventrículo esquerdo
PA	pressão arterial
PC	peso corporal
SA	sedentário adulto
SB	sedentário baby
SHR	ratos espontaneamente hipertensos
TA	treinado adulto
TB	treinado baby
TF	treinamento físico
VD	ventrículo direito
VE	ventrículo esquerdo

RESUMO

Barros JGB. O papel da adenosina como reguladora do fluxo sanguíneo em ratos espontaneamente hipertensos jovens e adultos: efeitos do treinamento físico (dissertação). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

INTRODUÇÃO: Exercícios físicos são utilizados como terapia não-farmacológica para o tratamento da hipertensão arterial e o treinamento físico (TF) por natação é reconhecido por produzir remodelamento cardíaco em animais experimentais. Entretanto, a ação vasodilatadora da adenosina (ado) resultante do exercício físico como prevenção e tratamento da hipertensão é pouco explorada. OBJETIVO: Avaliar remodelamento cardíaco e papel da adenosina na distribuição do fluxo sanguíneo para o miocárdio após treinamento físico em SHR. MÉTODO: 28 SHR machos babies e adultos foram submetidos ao TF aeróbio de natação, durante 10 semanas (5x/sem - 1h/dia). Foram utilizados protocolos de microesferas coloridas para avaliar fluxo sanguíneo, técnicas de morfologia para avaliar hipertrofia cardíaca e análises bioquímicas para verificar atividade de enzimas envolvidas na formação de adenosina. RESULTADOS: TF por natação atenuou a evolução da HA em SHR babies (S: 145±2; T: 140±2 mmHg), promoveu bradicardia de repouso em SHR adultos (S: 340±4; T: 321±6 bpm) e desenvolveu HC nos dois grupos (TB: 12%; TA: 10%). Na condição basal, o TF aumentou o FS coronário em SHR babies (S: 4745±2145; T: 6970±2374 mi/coração) e maior resposta vasodilatadora à infusão de

adenosina foi observada (S: 18946±6685; T: 25045±7031 mi/coração). Nesse grupo o TF promoveu maior atividade da enzima 5'-nucleotidase, levando à maior formação de adenosina (S: 0.45±0.09; T: 1.01±0.05). CONCLUSÃO: O TF de natação, além de desenvolver HC e apresentar maior hidrólise de AMP, promoveu aumento no FS coronário, sendo mostrado que desempenha um importante papel na regulação da hipertensão.

Descritores: 1. Natação 2. Cardiomegalia 3. Fluxo sanguíneo regional 4. Microesferas coloridas 5. Adenosina

SUMMARY

Barros JGB. The role of adenosine as blood flow regulator in SHR: fisical exercise effect (dissertation). São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2009.

ABSTRACT: Exercise training (ET) has been used as non-pharmacological therapy for hypertension treatment and the swimming physical training is recognized for yield cardiac remodeling in experiments. However, little is known on the effects of adenosine (Ado) resulting from ET as hypertension prevention and treatment. OBJECTIVE: To evaluate cardiac remodeling and the role of adenosine in cardiac blood flow distribution (BF) to the myocardium after aerobic ET on SHR. METHODS: 28 male SHR, babies and adults, were submitted to swimming training protocol during 10 weeks (5 times a week – 1 h a day). Colored micro spheres protocols were used to evaluate blood flow, morphological techniques were used to evaluate cardiac hypertrophy and biochemical analysis were performed to verify enzyme activity in the adenosine formation. RESULTS: ET attenuated the evolution of hypertension in babies SHR group (S: 145±2; T: 140±2 mmHg), HR was lower in adults SHR (S: 340±4; T: 321±6 bpm) and CH increased in both groups (TB: 12%; TA: 10%). At basal condition, BF was increased in trained babies (S: 4745±2145; T: 6970±2374 mi/heart) and higher vasodilatation response were observed due to adenosine infusion (S: 18946±6685; T: 25045±7031 mi/heart). In this group, the ET promoted a higher 5’-nucleotidase enzyme activity leading to a higher adenosine formation (S:

0.45±0.09; T: 1.01±0.05). CONCLUSION: The swimming training developed CH as well as increased adenosine formation, leading to higher coronary blood flow, being demonstrated its important role in hypertension regulation.

Descriptors: 1. Swimming 2. Cardiomegaly 3. Regional blood flow 4. Colored microspheres 5. Adenosine

1. INTRODUÇÃO

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 Hipertensão Arterial

A hipertensão arterial é uma das causas mais comuns de doenças cardiovasculares, sendo considerada um fator de risco para o desenvolvimento da doença coronariana, acelera o processo de aterosclerose e pode ser um fator determinante de morbidade e mortalidade cardiovascular (Jas Barreto-Filho & Je Krieger, 2003).

Pode ser entendida como uma síndrome multifatorial, de patogênese pouco elucidada, na qual fatores genéticos e ambientais causam elevação sustentada da pressão arterial (Lopes et al., 2003).

A hipertensão crônica tem alta prevalência e pesquisas para eficientes terapias anti-hipertensivas farmacológicas e não-farmacológicas tem sido uma importante meta para muitos pesquisadores.

Dados epidemiológicos do American Heart Association destaca que pelo menos 65 milhões de norte-americanos são hipertensos. No Brasil 30 milhões de pessoas são hipertensas de acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia e estudos brasileiros (Brandão et al., 2003) têm mostrado prevalência entre 12% e 35% em diferentes regiões do país.

Existem várias medidas não farmacológicas que, quando praticadas, resultam em grande benefício em relação ao controle da pressão arterial e co-morbidades comumente encontradas no paciente hipertenso. Dentre as medidas com eficácia comprovada e de melhor impacto na pressão arterial,

merecem destaque a redução do peso, a redução do sódio da dieta e a prática regular de atividade física (Hagg et al., 2004).

O exercício físico agudo nas primeiras 24 horas e o exercício crônico têm levado pesquisadores (Medeiros A, Negrão CE, Brum PC, 2000; Irigoyen MC, De Angelis K, Schaan BD, Fiorino P, Michelini LC, 2003) a sugerir o treinamento como conduta não farmacológica importante no tratamento de patologias como hipertensão arterial, diabetes e insuficiência cardíaca (Irigoyen et al., 2003).

Evidências experimentais têm demonstrado a atividade física regular reduz a pressão em pacientes hipertensos, contribuindo para a diminuição da morbidade e mortalidade cardiovascular (Muntner P, Rocella HEJ, Whelton PK, 2002). Entretanto, pouco se descreve em relação aos mecanismos que sustentam esses efeitos benéficos do exercício realizado de forma crônica.

Células musculares lisas como arteríolas de condutância e resistência estão fortemente envolvidas na fisiopatologia do remodelamento vascular induzido pela hipertensão (Amaral et al, 2001). O crescimento de células musculares lisas, com hipertrofia e hiperplasia, contribuem para as mudanças estruturais dos vasos em SHR (Ziada et al., 2005) .

Esse crescimento é regulado por muitos fatores, e um desbalanço desses fatores promotores e inibidores de crescimento, podem levar a condições patológicas gerando aumento de proliferação celular e deposição na matrix extracelular de proteínas (Shen at al., 2004).

Entretanto, fatores endógenos liberados pelas células musculares lisas e que inibem o crescimento celular podem exercer maior papel vasoprotetor e diminuir os níveis vasculares do fator de crescimento da doença vascular na hipertensão (Shen at al, 2004). Assim, a presença de níveis adequados de adenosina vascular pode ser importante na prevenção na hipertensão.

1.1.2 Modelos de Hipertensão Arterial

No decorrer dos anos houve o desenvolvimento de vários modelos experimentais de hipertensão arterial que poderia melhor caracterizar uma patologia tão importante para o ser humano como a hipertensão essencial em relação a parâmetros hemodinâmicos, cardíacos e bioquímicos.

Dentre os modelos genéticos de hipertensão descritos (Okamoto & Aoki, 1963), apresentam-se os ratos com hipertensão espontânea (SHR) e a cepa de ratos sensíveis à ingestão de sódio (Dahl). Entre os modelos de hipertensão neurogênica apresentam-se aqueles que envolvem a lesão do núcleo do trato solitário (NTS) e o da deaferentação sino-aórtica, associada, ou não, à desenervação das aferências cardiopulmonares.

Entre as hipertensões renais destacam-se: a renovascular, que decorre da oclusão parcial da artéria renal; a renopriva, como o próprio nome indica; a perinefrítica, que decorre da indução de fibrose renal pelo envolvimento do rim com um abrasivo contido por um tecido e pela liberação do pedículo renal após algumas horas de oclusão total.

O modelo de constrição (parcial ou total) da aorta abdominal relaciona fatores mecânicos e neurohumorais na elevação da pressão arterial. Um modelo descrito mais recentemente é o do bloqueio da formação de óxido nítrico (NO) com o N^G-Nitro- L- arginine-methyl ester (L-NAME) e finalmente o modelo de hipertensão induzida pelo tratamento com deoxicorticosterona associado à ingestão alta de sódio (DOCA-SAL). Todos esses modelos têm sido importantes para o avanço do conhecimento e tratamento desta patologia.

1.1.2.1 Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR)

O modelo genético de hipertensão espontânea SHR – *Spontaneous Hypertension Rats* (Yamori Y, 1994) é o modelo que mais apresenta respostas hemodinâmicas e endócrinas semelhantes às do homem com hipertensão essencial.

O desenvolvimento da hipertensão em ratos SHR caracteriza-se pelo aumento da resistência vascular periférica e hiperatividade simpática, a qual se relaciona com os níveis pressóricos. Com a progressão da doença há desenvolvimento da hipertrofia cardíaca, redução do débito cardíaco e finalmente insuficiência cardíaca congestiva (Lorell BH, 1997).

Em animais experimentais SHR, os efeitos do exercício físico sobre a pressão arterial podem depender da idade e do grau de hipertensão com que estes animais começaram o protocolo de treinamento (Zamo, 2003).

Em animais experimentais SHR, os efeitos do exercício físico sobre a pressão arterial podem depender da idade e do grau de hipertensão com que estes animais começaram o protocolo de treinamento (Zamo, F. S. ; Oliveira, Edilamar Menezes de; Krieger, E.M. ; Irigoyen, MC, 2004).

Ratos hipertensos jovens treinados em baixa intensidade em esteira ergométrica apresentam uma atenuação da pressão arterial quando comparados com os ratos jovens treinados em alta intensidade. Já animais adultos, no início do treinamento físico, não mostram diferenças na pressão arterial após treinamento sob alta ou baixa intensidade. Zamo et al. (2004) sugere que a idade, assim como a intensidade do exercício, exerçam juntos um papel sobre o comportamento pressórico e hemodinâmico destes animais.

Há décadas estudos reportam que os vasos sanguíneos de SHR são diferentes dos ratos normotensos Wister-Kyoto (WKY) em resposta a drogas. A aorta torácica de SHR tem uma menor resposta relaxadora a acetilcolina (Ach), adenosina (ADO) e isoproterenol (ISO) quando comparada à aorta de WKY.

Essa associação demonstra que a participação de células endoteliais nos efeitos vasodilatadores depende da variedade da droga. Adenosina não requer participação endotelial no relaxamento.

Em estudo de Bottiglieri et al. (1988), comparando o efeito depressor da infusão intravenosa (i.v.) e intra-aórtica (i.a.) de adenosina em SHR comparado ao WKY, o efeito vasodilatador foi melhor i.a. quando comparado ao i.v., foi consistente devido aos pulmões de SHR terem maior habilidade

de transporte e metabolização de adenosina. Há a possibilidade de que a extração de adenosina dos pulmões de SHR seja aproximadamente de 50%, contra nenhuma extração pelos pulmões de WKY.

1.1.3 Efeitos do Treinamento Físico na Hipertensão

Durante o exercício físico o coração se ajusta aos aumentos requeridos nas atividades metabólicas e mecânicas. O treinamento físico provoca adaptações hemodinâmicas, bioquímicas, elétricas e morfológicas no músculo cardíaco que, em conjunto, proporcionam uma melhora na função cardíaca. Estas adaptações ocorrem basicamente para reduzir o estresse sobre as paredes ventriculares e, ao mesmo tempo, atender a maior demanda de suprimento sanguíneo dos músculos em exercício.

Uma melhor função contrátil do miocárdio em resposta ao exercício tem sido observada em seres humanos e em alguns modelos animais, “in vivo”, em corações isolados e em preparações celulares. Estudos com células isoladas (Natali, 2004) revelam que o exercício crônico pode aumentar a contratilidade do miocárdio, apesar de alguns estudos serem divergentes (Natali, 2000). Tais divergências podem ser causadas pelo uso de diferentes modelos de exercício, técnicas para medir contração, condições experimentais e isolamento de células de diferentes regiões do ventrículo.

1.1.3.1 Efeitos Morfológicos – Remodelamento Cardíaco

A hipertrofia cardíaca é um achado comum na avaliação clínica dos pacientes com hipertensão arterial (Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP, 1990). Entretanto, a hipertrofia de ventrículo esquerdo não representa apenas um mecanismo de compensação para o aumento da pós-carga imposto ao coração.

A ocorrência de eventos cardiovasculares, como insuficiência coronariana aguda, insuficiência cardíaca congestiva, acidente vascular cerebral e insuficiência renal crônica é significativamente maior em pacientes hipertensos com hipertrofia de ventrículo esquerdo quando comparadas com indivíduos com os mesmos níveis de pressão arterial, mas sem hipertrofia (Levy et al., 1990).

As hipertrofias cardíacas são resultantes das adaptações do miocárdio frente a sobrecargas fisiológicas ou patológicas. Estas apresentam propriedades cardíacas diferentes e podem ser classificadas, de modo geral, como concêntricas ou excêntricas (Weber & Brilla, 1991).

Em estados patológicos, dois tipos de sobrecarga crônica podem levar à hipertrofia cardíaca. Uma sobrecarga de volume, que leva aos aumentos do diâmetro interno e da espessura da parede do ventrículo esquerdo, chamada de *hipertrofia ventricular excêntrica*, ou ainda, uma sobrecarga de pressão que está associada ao espessamento da parede ventricular esquerda e à diminuição da dimensão interna da cavidade ventricular, conhecida como *hipertrofia ventricular concêntrica.*

Em condições fisiológicas, como exercício físico, dois tipos de sobrecarga intermitente podem levar à hipertrofia cardíaca de maneiras diferentes, porém desenvolvidas de forma simétrica no coração. No exercício estático ou isométrico que apresenta como conseqüência hemodinâmica ligeira elevação do débito cardíaco (DC), resultante do aumento da freqüência cardíaca (FC) e grande elevação da pressão arterial (PA), leva a uma sobrecarga de pressão no coração, que resulta em espessamento da parede ventricular esquerda sem diminuição da dimensão interna da cavidade desenvolvendo hipertrofia ventricular concêntrica.

No exercício dinâmico, em que os atletas realizam exercícios isotônicos, os principais padrões hemodinâmicos são aumentos da FC e do volume sistólico (VS). Portanto, a sobrecarga no coração é predominantemente volumétrica levando ao desenvolvimento de hipertrofia ventricular excêntrica.

Esse remodelamento cardíaco, assim como o vascular, presente na hipertensão, pode estar relacionado a diferentes mecanismos fisiopatológicos como pelo aumento da angiotensina II (Kaplan, 1994). Além disso, a massa do ventrículo esquerdo pode variar de acordo com diversos outros fatores, como por exemplo, obesidade, idade, viscosidade do sangue, ingestão de sal, além de diferentes determinantes genéticos (Mancia et al., 1997).

Exercício aeróbico de baixa e média intensidade induz hipertrofia excêntrica (células longas), enquanto que o exercício anaeróbico de alta intensidade cauda hipertrofia concêntrica. Além disso, os miócitos parecem

adaptar-se à carga hemodinâmica do exercício dependendo da região da parede ventricular onde se encontram.

1.1.3.2 Efeitos Hemodinâmicos

De forma semelhante ao exercício agudo, o treinamento físico promove redução dos níveis pressóricos no período pós-exercício com a vantagem de que hipertensos treinados, humanos (Forjaz, CLM; Santaella, DF; Rezende, LO, 1998) ou ratos espontaneamente hipertensos (Overton JM; Joyner MJ; Tipton CM, 1988), apresentam menor PA durante a realização da atividade física e redução nos níveis da PA no período de repouso.

Todavia, esses estudos demonstraram que o treinamento físico deve ser realizado em intensidade de baixa à moderada (50% VO_2 máx.), já que tais benefícios não foram observados (Véras-Silva AS; Mattos KC; Gava NS; Brum PC; Negrão CE; Krieger EM, 1997) em ratos SHR treinados em alta intensidade (85% VO_2 máx.).

Os mecanismos envolvidos na queda da PA em indivíduos hipertensos parecem estar relacionados com fatores hemodinâmicos, neurais e humorais. Humanos hipertensos e ratos SHR treinados apresentam redução da PA de repouso associada à diminuição da atividade simpática periférica e do débito cardíaco (Negrão CE & Rondon MUPB, 2001). Nesse aspecto, a normalização do tônus simpático cardíaco

exacerbado, observada em ratos SHR treinados, estaria associada à bradicardia de repouso e, conseqüentemente, à redução do débito cardíaco.

Além disso, o treinamento físico melhora o prejuízo na sensibilidade dos pressorreceptores, observado em humanos e animais hipertensos, e este benefício é atribuído à melhora na aferência deste reflexo em ratos SHR treinados (Brum PC, Forjaz CL de Moraes, Tinucci T, Negrão CE, 2004). Embora, não possam ser excluídas alterações nos componentes eferente e central (Brum et al., 2004).

O treinamento físico de baixa intensidade causa redução significativa da resistência vascular periférica, determinada por redução da vasoconstrição, melhora da função endotelial e alterações estruturais da microcirculação. Trabalhos com ratos SHR submetidos a treinamento aeróbio de baixa intensidade (50 a 60% VO_2 máx.) mostraram redução consistente dos níveis pressóricos (Melo et. al, 2003).

Sabe-se que o maior dispêndio de energia costuma exigir ajustes rápidos no fluxo sangüíneo, que afetam todo o sistema cardiovascular, como por exemplo, como o que ocorre no exercício físico.

A atividade física com maior demanda de energia e o papel do ATP (Adenosina Trifosfato) intracelular como a mais imediata fonte de energia para uma grande variedade de reações bioquímicas são bem descritos na literatura. Entretanto, a importância dos efeitos do ATP e do ADP (Adenosina Difosfato) extracelular participante em processos da função cardíaca associados ao exercício não foi explorada suficientemente.

1.1.4 Adenosina e fluxo sanguíneo

Sabe-se que o maior dispêndio de energia costuma exigir ajustes rápidos no fluxo sangüíneo, que afetam todo o sistema cardiovascular, como por exemplo, como o que ocorre no exercício físico.

A atividade física como maior demanda de energia e o papel do ATP intracelular como a mais imediata fonte de energia para uma grande variedade de reações bioquímicas são bem conhecidos. Entretanto, pouco se sabe da importância dos efeitos do ATP e/ou ADP extracelular participante em processos como agregação plaquetária, controle do tônus vascular, neurotransmissão, permeabilidade da membrana da célula, função cardíaca e contração muscular associados ao exercício.

Adenosina (Ado) é um nucleosídeo com potente ação vasodilatadora, sintetizada por fibroblastos vasculares, cardiomiócitos e pelas células endoteliais vascular e cardíaca. Recentemente tem-se descrito que células musculares lisas (SMCs) vasculares e fibroblastos cardíacos também sintetizam adenosina e que SMCs, como fibroblastos cardíacos derivados de adenosina, inibem o crescimento de SMCs e de fibroblastos cardíacos (Jackson; kitakase, 1991). Se os níveis vasculares de adenosina são menores na hipertensão, esta pode contribuir importantemente na seqüela vascular. Apesar de seus efeitos sobre o território arterial (aorta e artéria coronária) serem conhecidos, seu papel no treinamento físico ainda não está completamente estabelecido.

Além da ação vasodilatadora, inibe a agregação plaquetária, previne a adesão vascular e de células endoteliais cardíacas, atenua dano celular endotelial induzido por neutrófilos, estimula a liberação de óxido nítrico de células endoteliais vasculares e de células musculares lisas, ativação sistema defesa antioxidante celular, previne injúria induzida por radicais livres de oxigênio e bloqueia a síntese de potentes fatores mitógenos como angiotensina II e norepinefrina pela inibição da liberação de renina e neurotransmissão noradrenérgica (Radegran & Hellsten, 2000; Sachrader, 1990, Jackson 1991; Kitakaze, 1991).

Seu efeito na proteção e reparação tecidual é descrito em quatro categorias: aumento da razão suplemento-demanda de oxigênio, proteção de danos isquêmicos, respostas antiinflamatórias e promoção da angiogênese (Kenneth A. Jacobson e Zhan-Guo Gao).

Em relação aos efeitos no sistema cardiovascular, a adenosina provoca redução na freqüência cardíaca e contratilidade atrial, além da atenuação de ações estimulatórias de catecolaminas no coração. Durante isquemia miocárdica, por exemplo, a adenosina é liberada de forma a evitar danos maiores aos cardiomiócitos. Alguns autores, como Mubagwa et al. (1996), sugerem que a adenosina, como dilatador endógeno dos vasos coronarianos, é liberada pela redução da suplementação miocárdica de oxigênio ou pelo aumento da sobrecarga miocárdica. Em nosso estudo, visto a inexistência de injúria tecidual, o treinamento físico foi considerado como sobrecarga de trabalho.

Além da ação vasodilatadora coronariana e das propriedades anti-arrítmicas desse nucleosídeo como previamente descrito, a Adenosina tem um papel em destaque na regulação do fluxo sanguíneo coronário apresentando não apenas um papel biológico no metabolismo celular, mas também um importante papel no sistemas cardiovascular em geral.

O ATP extracelular atua como vasodilatador (receptores P2Y) ou vasoconstritor (receptores P2X) dependendo de suas concentrações ou do seu receptor (Burnstock, 1997), enquanto que o ADP é um nucleotídeo que induz agregação plaquetária através da interação com receptores plaquetários do tipo P2Y. A degradação do ATP e ADP extracelular é realizada por enzimas denominadas ectonucleotidases.

Ectonucleotidases localizadas na membrana plasmática de plaquetas (Rossatto et al., 2003) e em células endoteliais, juntamente com ectonucleotidases solúveis na circulação, são responsáveis pela rápida inativação dos nucleotídeos de adenina circulantes.

ATP difosfoidrolase (apirase) é uma enzima que hidrolisa ATP e ADP e juntamente com uma 5'-nucleotidase estão relacionadas com o controle da relação nucleotídeos/nucleosídeos na circulação. Além disso, a apirase pode inibir a agregação plaquetária promovendo a hidrólise do ADP e também controlar o tônus vascular (Melchert & Welder, 1995) em combinação com a 5'-nucleotidase que hidrolisa adenosina monofosfato (AMP) produzindo adenosina, que é um potente vasodilatador.

A adenosina produzida pela degradação de nucleotídeos inibe a agregação plaquetária e apresenta uma importante ação vasodilatadora e

cardioprotetora em situações patológicas, como na isquemia do miocárdio e na insuficiência cardíaca crônica.

Autores têm descrito o importante papel destas purinas no processo de homeostase e formação de trombos (Coade SB & Pearson JD, 1989; Kitakaze et al., 1999), e no controle dos seus níveis circulantes para manutenção dos processos fisiológicos.

A adenosina produzida pela degradação do ATP e ADP em cardiomiócitos e em células endoteliais apresenta ação cardioprotetora via ativação de receptores de adenosina (Kitakaze et al., 1999). Assim, a presença de níveis adequados de adenosina vascular liberada durante a prática de exercício pode ser importante na prevenção da hipertensão, podendo influenciar o fluxo sanguíneo para o miocárdio.

Considerando que as adaptações cardiovasculares do treinamento físico em ratos hipertensos parecem depender da idade em que o treinamento físico se inicia e do nível prévio da pressão arterial, testamos a hipótese de que a adenosina, como potente vasodilatador, participa no mecanismo de prevenção e tratamento da hipertensão associado ao exercício físico.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo geral

Avaliar a participação da adenosina como importante reguladora fisiológica do fluxo sanguíneo coronário de SHR jovens e adultos submetidos ou não ao treinamento físico de natação.

2.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar o comportamento da PA e FC em repouso e após treinamento físico;

- Avaliar o remodelamento ventricular;
    - Hipertrofia cardíaca;

- Avaliar a atividade das enzimas ATP-difosfoidrolase e 5`-nucleotidase na formação de adenosina;

- Avaliar o fluxo sanguíneo para o miocárdio;
    - Em repouso
    - Após administração de adenosina

3. MÉTODOS

3.1 AMOSTRA

3.1.1 Animais experimentais

Para este estudo foram utilizados 28 ratos machos espontaneamente hipertensos (SHR), com 1 e 3 meses de vida, baby e adulto, respectivamente, cedidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos compostos por sete animais cada: babies sedentários (grupo 1); babies treinados (grupo 2); adultos sedentários (grupo 3) e adultos treinados (grupo 4).

- Grupo 1 - babies sedentários, com 1 mês de idade no início do protocolo, portanto com hipertensão arterial ainda não estabelecida. Esse grupo foi mantido sedentário e colocado na piscina apenas uma vez por semana (SB).

- Grupo 2 – babies treinados, com 1 mês de idade no início do protocolo, portanto com hipertensão arterial ainda não estabelecida. Esses animais treinaram natação (TB).

- Grupo 3 - adultos sedentários, com 3 mês de idade no início do protocolo, portanto com quadro de hipertensão arterial estabelecido. Esses animais foram mantidos sedentários (SA) e colocados uma vez por semana na piscina.

- Grupo 4 – adultos treinados, com 3 mês de idade no início do protocolo, portanto com hipertensão arterial estabelecida. Esses animais treinaram natação (TA).

Os ratos foram mantidos em gaiolas no biotério do Laboratório de Bioquímica da Atividade Motora, em local com temperatura ambiente entre 22° e 24°C e luz controlada em ciclo inverso de 12 horas (claro-escuro). Os animais receberam ração e água *ad libitum.*

Todos os procedimentos cirúrgicos e protocolos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991). O projeto de pesquisa intitulado "O papel da adenosina como reguladora do fluxo sanguíneo em ratos espontaneamente hipertensos jovens e adultos: efeitos do treinamento físico" foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o protocolo de pesquisa nº 961/06.

Os animais de todos os grupos foram inicialmente identificados por letras e números, pesados semanalmente até o final do protocolo

experimental. O controle ponderal foi realizado em balança semi-analítica de precisão (Gehaka) durante o período de estudo.

3.2 TREINAMENTO FÍSICO

O treinamento de natação foi realizado segundo o protocolo adaptado de Medeiros et al. (2004), em um sistema de natação adaptado para ratos (Figura 1).

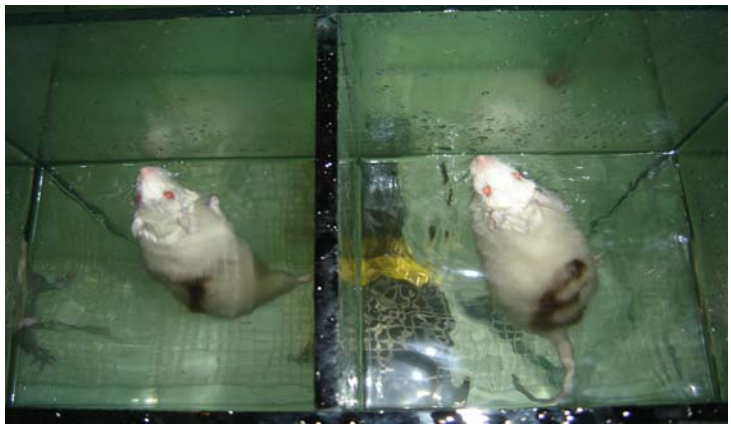

Figura 1: Sistema de natação adaptado para ratos.

Os animais foram treinados cinco (05) vezes por semana em um sistema adaptado de natação com a água aquecida a 30°C, durante 10 semanas com duração de 60 minutos e aumento gradual da sobrecarga de trabalho (peso na cauda) até atingir 5% do peso corporal do animal (Tabela 1).

PROTOCOLO DE NATAÇÃO

Semana	2ª-feira	3ªfeira	4ªfeira	5ªfeira	6ªfeira
1ª	15 min. s/s	20 min. s/s	40 min. s/s	60 min. s/s	60 min. s/s
2ª	40 min. 3%	50 min. 4%	60 min. 5% pc	60 min. 5%	60 min. 5%
3-10ª	40 min. 5% pc	50 min. 5% pc	60 min. 5% pc	60 min. 5% pc	60 min. 5% pc

Tabela 1: Protocolo de natação, com tempo de treinamento da 1ª a 10ª semana, realizado de 2ª a 6ª feira.

(s/s) = sem sobrecarga (pc)= peso corporal

Esse protocolo foi caracterizado como treinamento de baixa intensidade e longa duração, sendo efetivo na promoção de adaptações cardiovasculares e no aumento da capacidade oxidativa muscular (Medeiros A, Negrão CE, Brum PC, 2004).

Após as 10 semanas do protocolo os animais foram canulados para registros hemodinâmicos da pressão arterial, freqüência cardíaca e infusão de microesferas.

3.3 MEDIDAS HEMODINAMICAS

3.2.1 Medida direta da pressão arterial e da freqüência cardíaca

A medida direta da pressão arterial e da freqüência cardíaca foi avaliada ao final do protocolo, sendo os animais submetidos à cirurgia de canulação 24 horas após a última sessão de treinamento.

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg, ip) e dois cateteres P10 preenchidos com salina inseridos na artéria e veia femoral direita. Um terceiro cateter de polietileno P50 foi utilizado para a canulação do ventrículo esquerdo pela artéria carótida direita. O cateter foi então inserido até o ventrículo e sua posição determinada pela observação da característica da onda de pressão ventricular e confirmada posteriormente por necropsia.

Para registro da PA os animais foram mantidos em gaiolas individuais, nas quais permaneciam por pelo menos 24 horas após o término da cirurgia antes de se iniciar o experimento. A cânula foi conectada a um tubo de polietileno (PE100) e este a um transdutor eletromagnético (P23 Db; Gould-Statham) que, por sua vez, foi conectado a um amplificador (Genral Purpose Amplifier-Stemtech, Inc.).

O sinal analógico da pressão arterial foi convertido para digital (Stemtech, Inc.), registrado em tempo real em microcomputador com Sistema CODAS e analisado por meio do programa compatível com Windows, com uma freqüência de amostragem de 1000 Hz por canal. A

partir deste programa foram obtidos os valores de freqüência cardíaca e pressão arterial média.

3.4 ESTUDO MORFOMÉTRICO

Ao final do protocolo experimental os animais foram decapitados, o coração removido da cavidade torácica e dissecado para separar o VE (parede livre do ventrículo esquerdo e septo), VD (ventrículo direito) e átrios (átrio direito e esquerdo).

A hipertrofia cardíaca foi avaliada a partir da relação entre o peso da cavidade do VE (peso úmido) e o peso corporal do rato em mg/g.

3.5 DETERMINAÇÃO DO FLUXO SANGUÍNEO

3.5.1 Técnica das microesferas coloridas

Para determinação da distribuição do fluxo sangüíneo para o coração foi utilizada a técnica das microesferas coloridas. Foram utilizadas microesferas coloridas vermelhas e brancas (Dye-Trak microespheres, Triton Technology, San Diego, CA, USA) segundo o protocolo previamente descrito por Hakkinem et al. (1995).

As microesferas são compostas de polietileno (98%) e divinilbenzeno (2%), tendo diâmetro de 15,1 $\pm$ 0,2 μm e concentração comercial de 3000 esferas/ml.

A concentração média das esferas foi utilizada como base para o cálculo do número de esferas infundidas. Para a determinação da absorbância média das esferas, amostras das diluições utilizadas (15.000 – 25.000 esferas) foram colocadas em tubos de 15 ml. Adicionou-se 2 ml de etanol (100%) a 4ºC, centrifugou-se e o sobrenadante foi aspirado. As amostras foram colocadas em estufa (56ºC) *overnight* para secagem.

As amostras, já com dimetilformamida, foram centrifugadas e a absorbância determinada em espectofotômetro. A solução comercial foi sonicada (Vibra Cell, Sonics & Materials Inc., Danbury, CT, USA) durante 05 minutos imediatamente antes das diluições em salina contento 0,01% de Tween 80 (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA). Todas as amostras de

microesferas já diluídas foram ultrasonicadas de 3 a 5 minutos imediatamente antes da infusão.

3.5.2 Infusão das microesferas no ventrículo esquerdo

Uma solução contendo 200.000 esferas brancas/180μl foi infundida no ventrículo esquerdo para determinação da distribuição do fluxo no coração. Esta solução foi sonicada durante 3 minutos imediatamente antes da infusão e 180 μl desta solução foram colocados em uma extensão de cateter P50 (75 cm), que foi conectada a uma seringa de 1 ml com salina pré-aquecida (40ºC) contendo Tween 80 (0,01%).

A outra cânula posicionada na aorta abdominal foi conectada a uma seringa de 1 ml pré-heparinizada para retirada de sangue durante a infusão. Dez segundos antes da injeção das esferas iniciou-se a retirada de sangue através de uma bomba (Infusion and Withdrawl Pump, Harvad Apparatus, South Natick, Mass, USA) a um fluxo de 0,5 ml/min, contínuo por 75 segundos após o início da infusão.

Foram injetadas 200.000 esferas brancas no ventrículo esquerdo a um fluxo de 0,36 ml/min durante 50 segundos (Infusion Pump 22, Harvard Apparatus, South Natick, Mass, USA). Desta forma, os 180 μl de solução contendo as microesferas foram injetadas nos primeiros 30 segundos.

O volume de sangue retirado foi reposto por meio do volume injetado durante a infusão das microesferas e por um pequeno volume de salina (0,1-0,2 ml) injetado *in bolus* logo após o término do procedimento.

Em uma segunda etapa o procedimento foi repetido, porém com microesferas na cor vermelha, antecedida pela administração do vasodilatador adenosina na dose de 300 μg/kg/min, através da cânula localizada na veia femoral. Esta etapa foi realizada para que fosse possível mimetizar as respostas vasodilatadoras que ocorrem durante o exercício.

Após a infusão das microesferas no ventrículo esquerdo os animais foram sacrificados e o coração retirado para análise.

3.5.3 Reagentes de digestão I e II

Os reagentes utilizados foram preparados segundo as especificações do fabricante das microesferas (Triton Technology, San Diego, CA, USA).

Reagente de digestão I (Reagente 10% Triton X-100): 900 ml de água destilada foram aquecidas a 50°C e em seguida 6,06g de Trizma Base e 0,1g de Azida Sódica foram adicionadas e o pH foi ajustado para 8,5. Após o ajuste do pH, 100ml de Triton X-100 foi acrescentado à solução, a qual foi armazenada em frasco plástico.

Reagente de digestão II (Reagente Ácido Deoxicólico Sódico): em 1L de água destilada aquecida foram adicionados 6,06g de Trizma Base, 0,5ml de Tween 80 e 0,1g de Azida Sódica durante agitação, em seguida o pH

ajustado para 8,5 e 20,73g de ácido deoxicólico sódico foi acrescentado, sendo realizado um novo ajuste do pH. A solução foi armazenada em frasco plástico.

Reagente de hemólise: 20ml de etanol absoluto foi adicionado a 100ml do reagente de digestão I. Esta solução também foi armazenada em frasco plástico.

3.5.4 Retirada de sangue

Cada amostra de sangue retirada foi pesada e colocada em um tubo de polipropilene de 15ml identificado. Um total de 4ml de reagente de hemólise foi adicionado e amostra foi centrifugada durante 30 minutos a 2000g.

O sobrenadante foi desprezado e 2ml de hidróxido de sódio (2N) foi acrescentado ao tubo. As amostras foram incubadas em banho maria (BM) a uma temperatura de 70°C, seguindo a partir deste momento o mesmo procedimento dos demais tecidos.

3.5.5 Processamento dos tecidos

Os tecidos foram processados segundo técnica adaptada de Hakkinen et al. (1995). Após a retirada do tecido, o mesmo foi pesado (0,4 –

2,0 g) e colocados em tubo de polipropilene de 15 ml, previamente identificado.

Após a adição de 4 ml de hidróxido de sódio (2N) os tubos foram tampados e colocados em banho maria (BM) à 70ºC por aproximadamente 2 horas.

As amostras foram agitadas (Vortex Maxi Mix II, Thermolyne, Dubuque, Iowa, USA) a cada 15 minutos até a diluição dos tecidos no reagente.

Após a total diluição da amostra, os tubos foram removidos do banho e 8 ml de Reagente de Digestão I foram adicionados. As amostras eram então misturadas por inversão manual (5 vezes) e centrifugadas por 30 minutos a 2000g.

Após a centrifugação, o sobrenadante de cada amostra foi desprezado e 10 ml de Reagente de Digestão II (Reagente Ácido Deoxicólico Sódico) foi adicionado. As amostras foram novamente colocadas em BM (70ºC) por aproximadamente 3 horas.

Os tubos foram novamente agitados a cada 20 minutos até o momento em que fosse observada visualmente a total digestão das amostras.

Neste momento as amostras foram retiradas do BM, centrifugadas por 30 minutos a 2000g e o sobrenadante aspirado, permanecendo no tubo aproximadamente 100-200μl da amostra, ao qual foi adicionado etanol absoluto (4ºC).

Os tubos foram agitados para lavagem das amostras e logo após centrifugadas por 15 minutos a 2000g (4ºC). O etanol adicionado foi aspirado, permanecendo 100-200μl no fundo de cada tubo. Estes tubos contendo as amostras foram colocados para secagem em estufa (56ºC) durante aproximadamente 12 horas.

3.5.6 Extração do corante e medidas de absorbância

Para extração do corante, 250μL de dimetilformamida foi adicionado em cada tubo. As amostras foram agitadas vigorosamente por 30 segundos e centrifugadas durante 10 minutos a 2000g.

As leituras das absorbâncias no espectofotômetro (DU-640 Spectrophotometer, Beckmann Instruments, Inc., Fullerton, CA, USA) foram realizadas em cubeta de quartzo de 0,7ml (Sigma), onde foram colocados 200 μl do sobrenadante de cada amostra centrifugada.

Os picos dos espectros de absorbância das microesferas brancas e vermelhas foram respectivamente, 370 e 530nm, utilizando uma largura de banda de luz < 1,8nm. A absorbância mínima aceitável foi de 0,01 AU (absorbância da amostra) para ambas as microesferas. Absorbâncias menores que estas foram excluídas da análise.

3.5.7 Determinação do número de microesferas

Soluções com número conhecido de microesferas foram processadas para determinação do número de microesferas nos tecidos (brancas ou vermelhas). A média da absorbância destas amostras permite determinar uma constante de leitura do espectrofotômetro para as microesferas vermelhas e brancas. Desta forma, o número de microesferas nos tecidos foi calculado a partir da seguinte fórmula:

$$\text{N° esferas na amostra} = \frac{\text{AU amostra x N° de esferas padrão}}{\text{AU padrão}}$$, onde:

AU amostra = absorbância da amostra no tecido;

N° esferas padrão = número de esferas na solução padrão;

AU padrão = média das absorbâncias das soluções padrão.

O tempo de retirada da amostra de sangue (min) foi calculado dividindo o volume de sangue retirado durante a infusão das microesferas vermelhas e brancas pela velocidade da bomba de retirada (0,5 ml/min). A constante de retirada do sangue (Q sangue, ml/min) foi determinada pela divisão do volume de sangue (ml) pelo tempo de retirada da amostra (min).

3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.6.1 Preparo da Fração do Soro Sangüíneo

Para obtenção da fração de soro sanguíneo, os animais foram sacrificados por decapitação e o sangue recolhido e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos a 4ºC. O sobrenadante obtido de cada amostra centrifugada representa a fração de soro sanguíneo. Esta fração foi armazenada em tubos *eppendorf* (1,5ml) previamente identificados e mantidos a uma temperatura de - 20ºC até a sua utilização.

3.6.2 Determinação das Atividades Enzimáticas

3.6.2.1 Atividade da ATP-difosfohidrolase

A determinação das atividades enzimáticas de hidrólise do ATP e do ADP, por meio da utilização de soro, foram determinadas por meio de incubação contendo Tris-HCl 112.5mM (pH 8.0) como descrito por Oses e colaboradores (2004), juntamente com a proteína em uma temperatura de 37ºC por 10 minutos em um volume final de 190ul para ambos. A reação será iniciada pela adição de nucleotídeo (ATP, ADP) para uma concentração final de ATP 3 mM e ADP 2mM. O tempo de incubação e a quantidade de

proteína adicionada ao meio de reação foram escolhidos de modo a assegurar a linearidade da formação do produto.

3.6.2.2 Atividade da 5´-nucleotidase

A atividade da 5´-nucleotidase foi determinada de acordo com Oses et al. (2004) em um meio contendo Tris-HCl 100mM, pH 8.9. A este meio adiciona-se a proteína que foi pré-incubada por 10 minutos a 37ºC. A reação foi iniciada pela adição de AMP 2mM.

A reação enzimática foi interrompida pela adição de 200ul de ácido tricloro acético (TCA) concentração final de 10%. As amostras foram mantidas em gelo, por pelo menos 10 minutos, centrifugadas (5.000 rpm, 4°C, 15 minutos) e posteriormente alíquotas de 100ul foram retiradas para determinação do fosfato inorgânico pelo método de Lanzetta e colaboradores (1979).

Todas as amostras foram ensaiadas em duplicata ou triplicata, sendo que a hidrólise não enzimática foi corrigida através de controles, nos quais o material enzimático foi adicionado ao tubo após a reação ter sido interrompida com TCA.

As amostras foram lidas em espectofotômetro em comprimento de onda de 630nm e a atividade específica foi expressa em nmol de fosfato liberado por minuto e por mg de proteína (nmol Pi/ min/ mg) nas condições de ensaio descritas.

3.6.3 Determinação da Proteína

A proteína foi determinada pelo método de Bradford, MM (1976), utilizando como padrão albumina bovina (BSA, 1mg/ml).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de variância de duas vias (ANOVA) foi utilizada para analisar as diferenças entre os grupos e o *Post-hoc* de Tukey quando observadas significâncias estatísticas para todos os experimentos. Teste “t” de student foi utilizado para verificar a distribuição das microesferas antes e após a injeção de adenosina. Adotou-se como nível de significância em todos os experimentos $p \leq 0.05$.

4. RESULTADOS

Por meio destes resultados (Figura 2) podemos observar que no início do protocolo experimental os animais do grupo baby apresentavam pesos semelhantes, porém o grupo treinado ganhou menos peso ao longo do protocolo experimental quando comparado ao grupo sedentário controle, apresentando significância estatística a partir da sétima semana, prosseguindo desta maneira até o final do protocolo experimental.

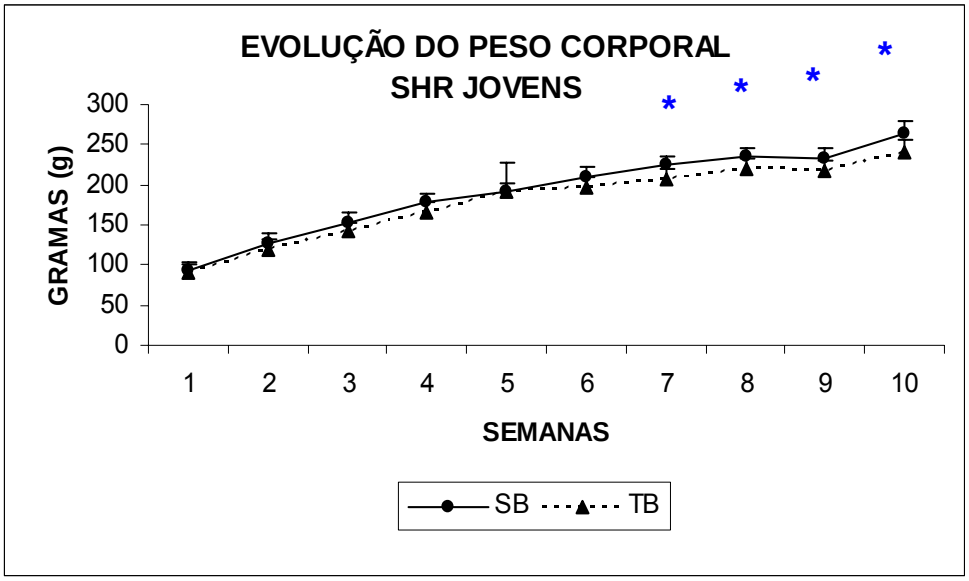

Figura 2: Evolução do peso corporal em gramas a cada semana do protocolo experimental. Sedentário baby (SB, n=7) e treinado baby (TB, n=7). Resultados apresentados com média ± erro padrão, (*) p< 0,05.

A evolução do peso corporal (PC) dos animais adultos sedentários e treinados SHR, a cada semana, está descrito na Figura 3. Pode ser observado que, no início do protocolo experimental, os animais do grupo adulto apresentavam pesos semelhantes, porém o grupo treinado ganhou menos peso ao longo do experimento quando comparado ao grupo sedentário controle, apresentando menor ganho ponderal a partir

da sexta semana, prosseguindo desta maneira até o final do protocolo experimental.

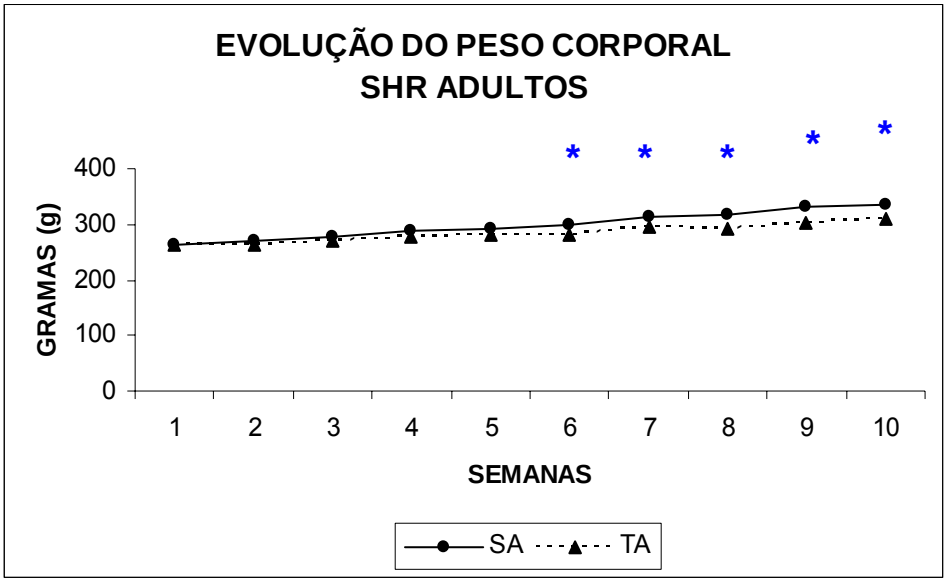

Figura 3: Evolução do peso corporal em gramas a cada semana do protocolo experimental. Sedentário adulto (SB, n=7) e treinado adulto (TB, n=7). Resultados apresentados com média ± erro padrão, (*)p<0,05.

Na Figura 4 estão demonstrados os dados da pressão arterial média dos grupos. O treinamento físico (TF) por natação mostrou-se eficiente em reduzir a pressão arterial de SHR adultos (SA: 161 ± 2; TA: 149 ± 2 mmHg) e atenuou a evolução da hipertensão arterial (HA) em SHR babies (SB: 145 ± 2; TB: 140 ± 2 mmHg).

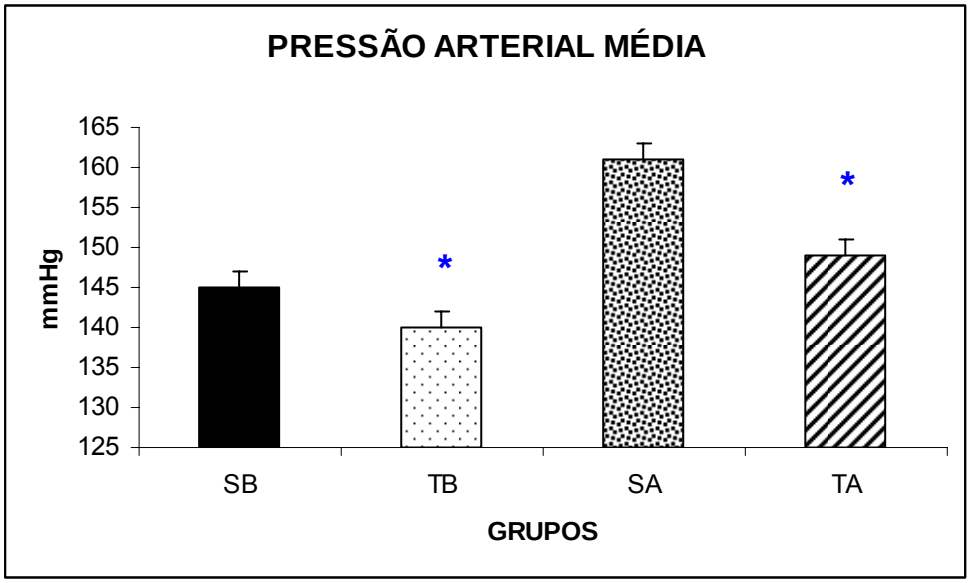

FIGURA 4: Pressão Arterial Média (mmHg). Sedentário baby (SB, n=7), treinado baby (TB, n=7), sedentário adulto (SA, n=7) e treinado adulto (TA, n=7). Valores estão expressos em média ± erro padrão, (*)p< 0,05.

Os dados da freqüência cardíaca (FC) no final do protocolo de treinamento estão demonstrados na Figura 5. A alteração hemodinâmica demonstrada pela queda de PA foi acompanhada por uma bradicardia de repouso em animais adultos (SA: 371 ± 10; TA: 312 ± 21 mmHg) estatisticamente significante.

Os resultados apresentados na Figura 6 demonstram a hipertrofia cardíaca, calculado por meio da fórmula: (peso do ventrículo esquerdo + ventrículo direito) / peso corporal. Os índices de hipertrofia obtidos após o protocolo foram de 12% e 10% para os grupos baby e adulto, respectivamente.

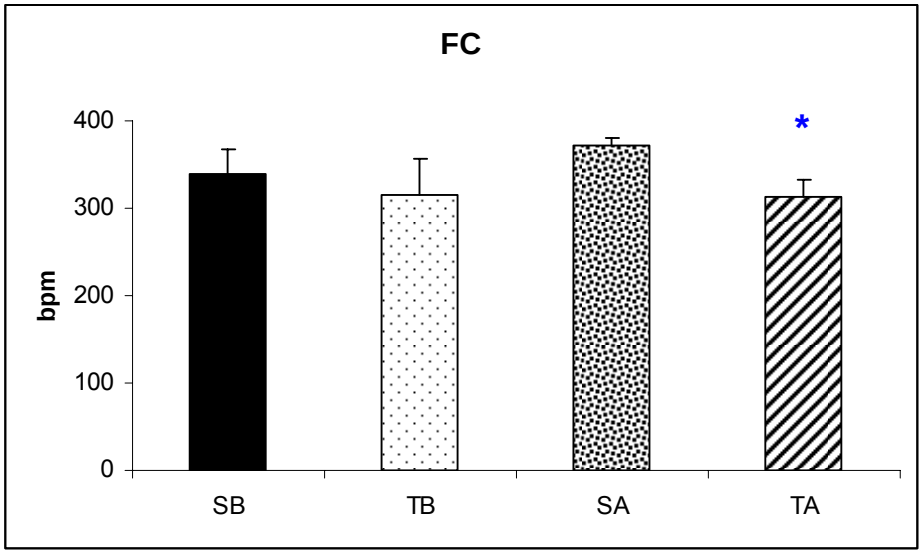

FIGURA 5: Freqüência cardíaca de repouso (bpm). Sedentário baby (SB, n=6), treinado baby (TB, n=6), sedentário adulto (SA, n=7) e treinado adulto (TA, n=7). Resultados apresentados em média ± erro padrão, (*)p< 0,05.

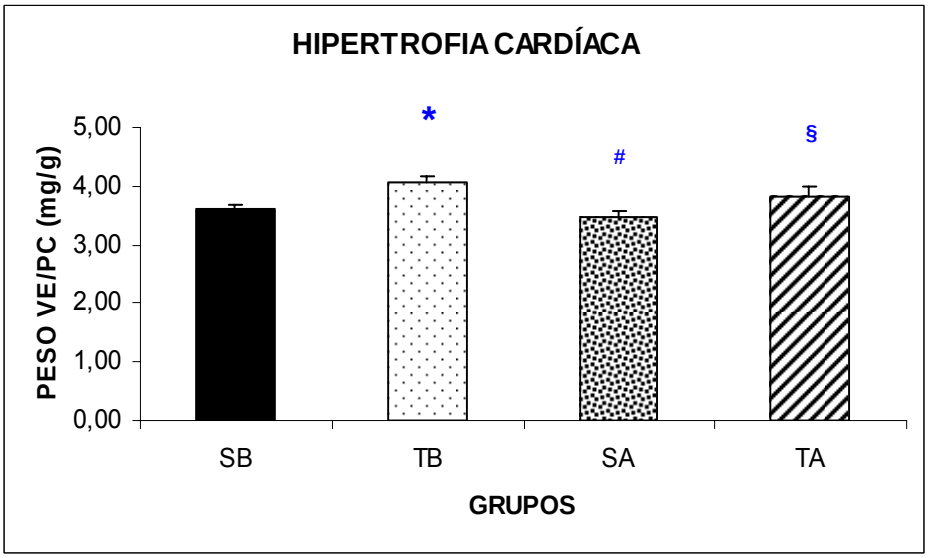

FIGURA 6: Hipertrofia cardíaca (mg/g). Sedentário baby (SB, n=7), treinado baby (TB, n=7), sedentário adulto (SA, n=7) e treinado adulto (TA, n=7). Resultados apresentados em média ± erro padrão, (*) p< 0,05. *P = 0,002 (SB vs. TB); #P < 0,001 (TB vs. SA); §P = 0,029 (SA vs. TA).

A distribuição do fluxo sanguíneo em repouso (basal) e após infusão do vasodilatador adenosina para o miocárdio, calculada pela relação entre o número de esferas encontradas no tecido e o peso do tecido, está demonstrada nas Figuras 7 e 8.

Na Figura 7 foi observado aumento do nº de esferas após infusão de adenosina, tanto no grupo sedentário baby como no treinado baby. Foi observado que o nº de esferas no grupo treinado baby basal é 1,92 maior que seu grupo controle basal, sem infusão de adenosina.

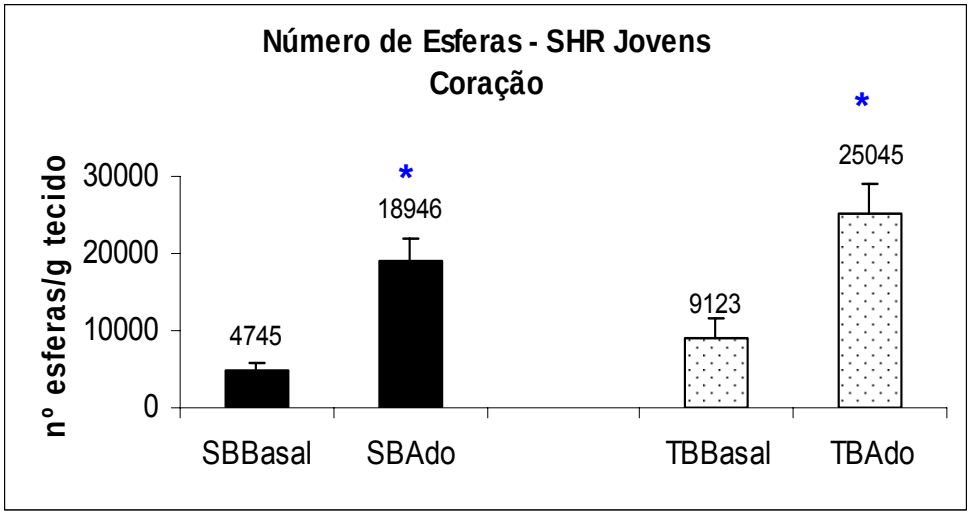

Figura 7: Fluxo sangüíneo coronário basal (n° de esferas / peso tecido). Sedentário baby (SB, n=5), treinado baby (TB, n=5), sedentário adulto (SA, n=5) e treinado adulto (TA, n=5). Resultados apresentados em média ± erro padrão, $p < 0,05$.

O aumento do nº de esferas após infusão de adenosina foi observado apenas no grupo sedentário adulto, conforme demonstrado na Figura 8. No grupo treinado adulto, pós infusão de adenosina, houve uma

tendência à vasodilatação, mas sem significância estatística. Foi observado que o nº de esferas no grupo treinado adulto basal é 1,83 maior que seu grupo controle basal, sem infusão de adenosina.

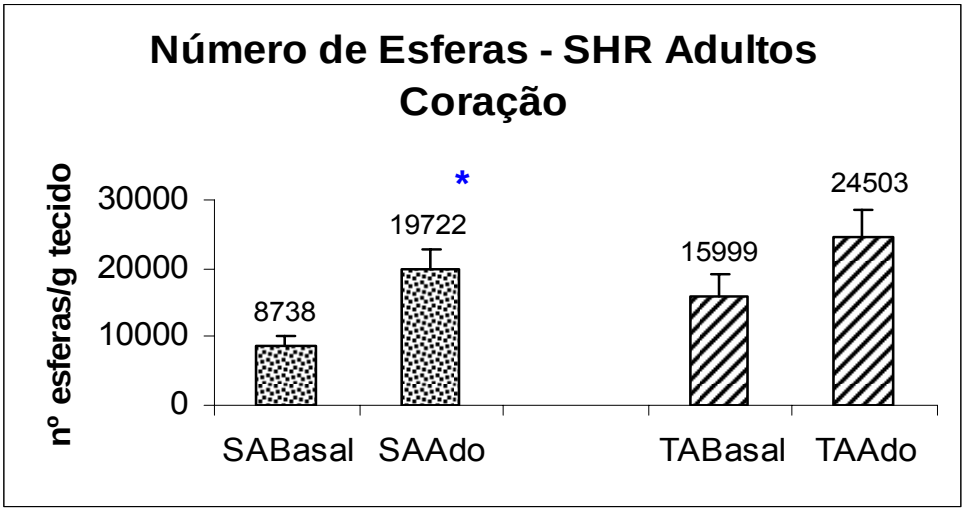

Figura 8: Fluxo sangüíneo coronário após adenosina (n° de esferas / peso tecido). Sedentário baby (SB, n=5), treinado baby (TB, n=4), sedentário adulto (SA, n=4) e treinado adulto (TA, n=4). Resultados apresentados em média ± erro padrão, p< 0,05.

A hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP na fração de soro sanguíneo estão, respectivamente, demonstradas nas Figuras 9 e 10, por meio da ação da enzima ATP-difosfohidrolase.

Não foi observada diferenças estatísticas entre os grupos na hidrólise de ATP e ADP, porém foi observado, na hidrólise de AMP, que os ratos treinados baby apresentaram maior atividade enzimática da 5´-nucleotidase, conforme Figura 11.

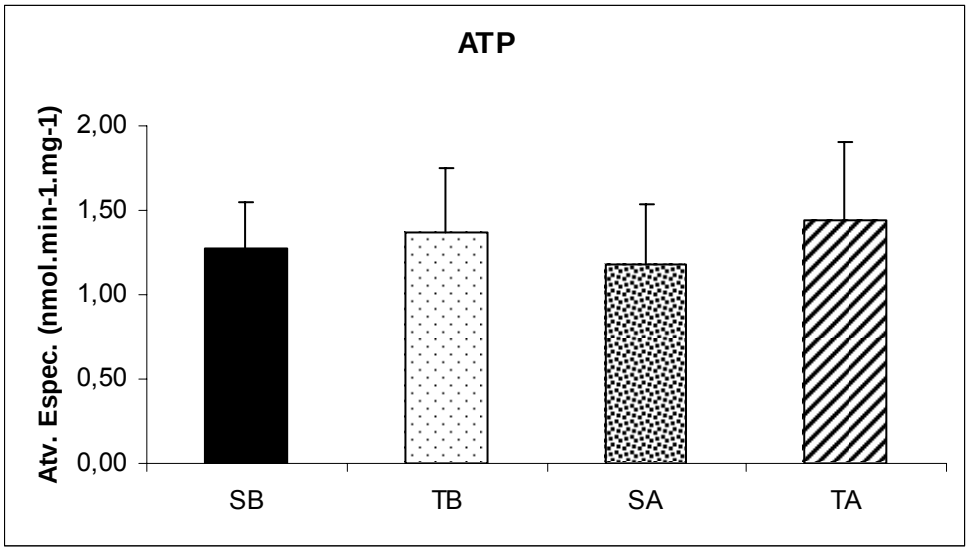

Figura 9: Medida da Atividade enzimática da ATP-difosfohidrolase na fração de soro sanguíneo por meio da hidrólise de ATP (nmol Pi/min/mg proteína). Sedentário baby (SB, n=8), treinado baby (TB, n=8), sedentário adulto (SA, n=9) e treinado adulto (TA, n=8).

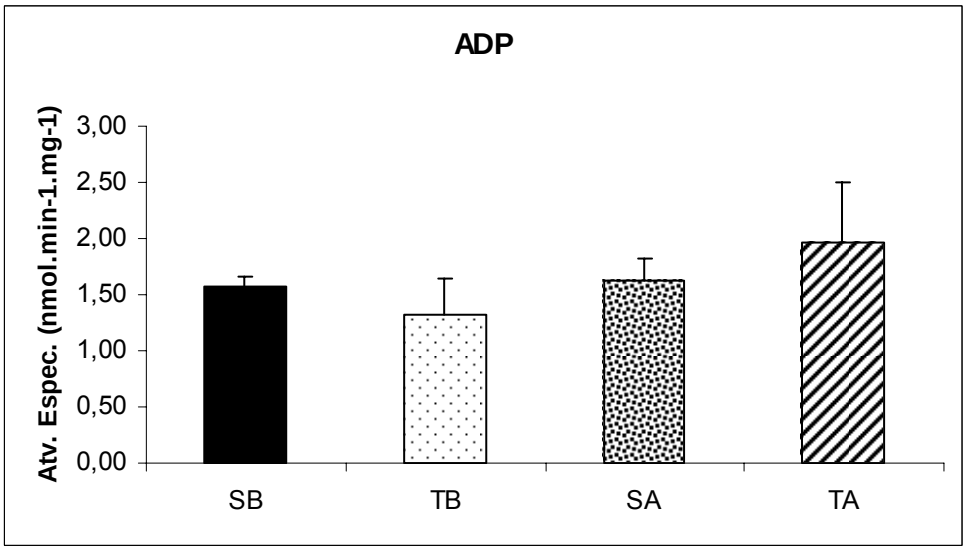

Figura 10: Medida da Atividade enzimática da ATP-difosfohidrolase na fração de soro sanguíneo por meio da hidrólise de ADP (nmol Pi/min/mg proteína). Sedentário baby (SB, n=6), treinado baby (TB, n=4), sedentário adulto (SA, n=7) e treinado adulto (TA, n=7).

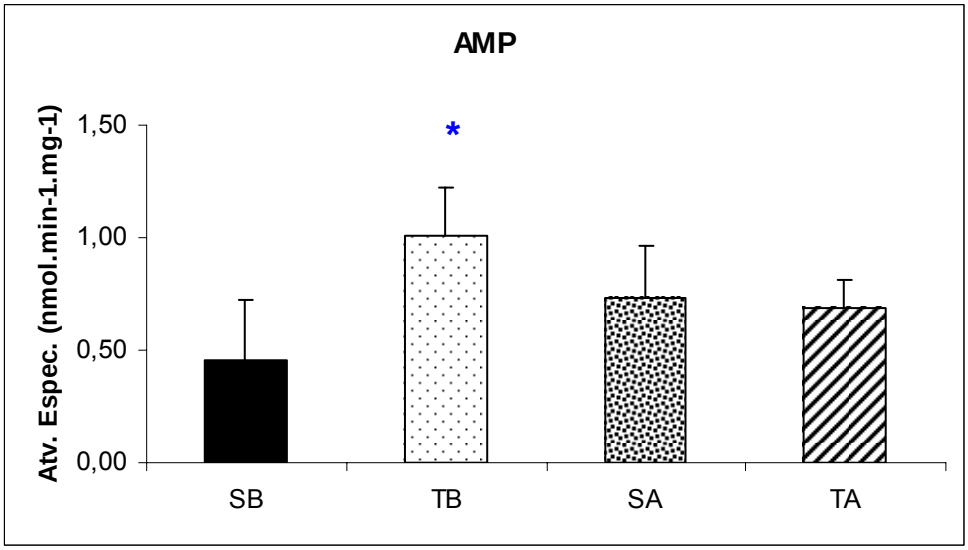

Figura 11: Medida da Atividade enzimática da 5´- nucleotidase na fração de soro sanguíneo por meio da hidrólise de AMP (nmol Pi/min/mg proteína). Sedentário baby (SB, n=7), treinado baby (TB, n=6), sedentário adulto (SA, n=10) e treinado adulto (TA, n=7).

5. DISCUSSÃO

Considerando a amostra estudada, na qual se investigou os efeitos do treinamento físico por natação em ratos SHR babies e adultos com 1 e 3 meses de vida, respectivamente, sobre as variáveis hemodinâmicas, desenvolvimento da hipertrofia cardíaca e o papel da adenosina com potente vasodilatador coronariano na prevenção e tratamento da hipertensão arterial, os principais resultados deste estudo sugerem que o treinamento físico por natação atenua os níveis pressóricos dos ratos espontaneamente hipertensos, independentemente se começaram o protocolo de atividade física antes (babies) ou após o desenvolvimento da hipertensão (adultos).

O treinamento físico por natação em ratos SHR promoveu bradicardia de repouso, alteração esta significativa apenas no grupo que iniciou o protocolo com 3 meses de vida e desenvolveu hipertrofia cardíaca em ambos os grupos, acompanhada de melhor perfusão sanguínea para o miocárdio nos grupos sedentários babies e adultos e treinado baby.

Além disso, os SHR treinados babies apresentaram maior atividade da enzima 5´-nucleotidase, a qual pode estar relacionada à maior formação de adenosina extracelular e consequentemente melhor efeito protetor no desenvolvimento da hipertensão.

Neste estudo, considerando a média ponderal dos animais acompanhados semanalmente, podemos observar que os animais treinados por natação de ambos os grupos babies e adultos apresentaram menor ganho de peso corporal ao longo das semanas de desenvolvimento do protocolo quando comparados ao grupo sedentário controle.

Embora haja discrepância na literatura, o menor ganho de peso observado está de acordo com trabalhos anteriores descrito por Zamo (2004) onde se observou uma diminuição ($p<0,01$) do comprimento tibial dos animais do grupo treinado baby com natação.

Zamo sugere que a redução de peso observada nestes animais não seja uma “perda de peso”, e sim que estes animais deixaram de ganhar peso no decorrer do protocolo porque não cresceram.

Por outro lado, Medeiros e colaboradores (2000) descrevem que após protocolo de treinamento físico os ratos normotensos sedentários apresentaram maior ganho de peso, porém este aumento não foi significativo quando comparados ao grupo de ratos treinados.

A partir dos resultados hemodinâmicos obtidos, observou-se que a FC ao final do treinamento por natação do grupo TA mostrou atenuação significativa após o protocolo. Apesar de ter sido observado uma tendência à bradicardia de repouso também no grupo TB, esta alteração não foi significativa. A bradicardia de repouso é uma característica de adaptação ao organismo ao treinamento aeróbico e é considerada como marcador de treinamento físico.

Resultados similares foram descritos em experimentos prévios realizados por Zamo (2004) onde os SHR treinados babies apresentaram bradicardia de repouso após protocolo de exercício e que essa bradicardia foi mantida a partir da quarta semana de treinamento. Conforme a literatura, a bradicardia de repouso ocorre tanto em humanos (Katona et al., 1982)

quanto em animais experimentais (Medeiros et al., 2000; Negrão & Rondon, 2001).

Medeiros e colaboradores em 2004 relatam que a bradicardia de repouso decorrente do TF por natação não acontece pela diminuição da atividade simpática (Negrão et al., 1993) ou pela diminuição da freqüência intrínseca do coração (Negrão et al., 1993), mas devido ao aumento do tônus vagal.

No presente estudo o protocolo de 10 semanas de treinamento por natação mostrou-se eficiente na redução dos valores de PAM dos animais adultos treinados e atenuou a evolução da hipertensão em ratos babies treinados. Essa redução dos níveis pressóricos está condizente com estudos anteriores feitos em indivíduos hipertensos (Forjaz et al., 2000), assim como em ratos babies SHR com TF em esteira (Brum et al., 2001) e natação (Zamo, 2004).

Para evidenciar os mecanismos envolvidos na atenuação da PA induzida pelo exercício, uma sugestão seria a redução do débito cardíaco verificado em animais treinados (Negrão et al., 1992), pois a redução da FC poderia justificar o efeito do exercício aeróbico em diminuir o débito cardíaco e, consequentemente, a PA.

Outro fator responsável pela diminuição dos valores pressóricos de SHR treinados poderia ser a atenuação da resistência vascular periférica total, pelo aumento da complacência vascular, principalmente arterial, induzido pelo exercício. Amaral e colaboradores (2001) verificaram que ratos

SHR submetidos ao treinamento em esteira apresentam aumento na densidade das vênulas.

Em relação à hipertrofia cardíaca desenvolvida, os dados descritos na literatura demonstram índices de relação ventrículo esquerdo / peso corporal (VE/PC) em torno de 7% de hipertrofia ventricular esquerda em SHR adultos treinados com natação (Gomi & Sasaki, 1994). Neste estudo, foi observado índices de 12% em ratos treinados babies e de 10% em ratos treinados adultos, acima dos encontrados na literatura.

Resultados semelhantes foram observados por Sasaki (2003) utilizando o mesmo protocolo de treinamento e por Redondo (2007), que observou hipertrofia cardíaca de 16% em ratos normotensos treinados por natação.

Evangelista et al. (2003) descreve que o índice de hipertrofia ventricular é dependente das características do treinamento físico e sugere que as diferenças entre os resultados obtidos na literatura estejam relacionadas aos protocolos de treinamento adotados.

A hipertrofia cardíaca neste modelo experimental pode ser avaliada por meio de medida direta do diâmetro dos miócitos cardíacos. O aumento do diâmetro dos cardiomiócitos pode ser observado como resposta ao treinamento físico aeróbico de natação, decorrente de sobrecarga de volume pelo aumento da pré-carga (Lemitsu et al., 2001).

Dados do nosso laboratório confirmam estes resultados, onde foi observado aumento no diâmetro dos cardiomiócitos de 32% em ratos SHR treinados babies e de 38% em ratos SHR adultos treinados com protocolo

de natação, quando comparados aos seus controles, e estes aumentos não foram acompanhados por alterações na fração do volume de colágeno intersticial. Como não se verificou aumento na deposição de colágeno, a HVE foi considerada fisiológica.

Rocha (2005) demonstrou que o uso de esteróides anabolizantes não exerce influência neste parâmetro, pois seu estudo observou aumento similar no diâmetro dos cardiomiócitos de animais treinados por natação e no grupo treinado e tratado com anabolizante. Estes dados sugerem que os animais desenvolveram hipertrofia cardíaca pelo treinamento físico aeróbico de natação.

Neste trabalho, o fluxo cardíaco coronário foi avaliado por meio da técnica das microesferas coloridas e estudado com os animais em repouso, sendo este considerado fluxo coronário basal e com os animais sob efeito do vasodilatador adenosina, para que a vasodilatação induzida pelo exercício fosse mimetizada. Os efeitos vasodilatadores dependem da variedade da droga utilizada e a adenosina não requer participação endotelial no relaxamento.

O fluxo sanguíneo coronário foi determinado através do número de esferas fixadas no tecido e em ml/min e embora demonstrem resultados semelhantes, diferenças estatísticas não foram igualmente observadas. Isto se deve ao fato do menor número de animais que compõem a amostra quando o fluxo sanguíneo é determinado em ml/min, sendo que esta menor amostra é resultado de limitações que ocorreram durante o desenvolvimento do experimento.

Em nosso estudo foi observado um maior fluxo sanguíneo no período basal dos ratos treinados com protocolo de natação, demonstrado através do número de esferas encontradas no tecido. Esse maior fluxo sanguíneo pode ser resultado de um maior enchimento ventricular que ocorre durante a diástole cardíaca em resposta ao treinamento físico.

Desta forma, a bradicardia de repouso observada como resposta ao treinamento físico neste estudo é a possível explicação para o aumento do fluxo sanguíneo coronário observado nos ratos treinados.

Rocha (2005) em um estudo realizado em nosso laboratório e com o mesmo protocolo de treinamento físico promoveu melhora do estado inotrópico positivo cardíaco observado pelo aumento dos valores dos índices de contratilidade (+dP/dt) e melhora da função diastólica através da redução da pressão diastólica inicial do ventrículo esquerdo de ratos.

Em ratos SHR submetidos ao protocolo de natação, o treinamento também promoveu melhora da derivada de contração do ventrículo esquerdo, porém sem diferença estatística na pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (Zamo, 2004).

Dessa forma, o treinamento físico promoveu hipertrofia cardíaca e proporcional aumento no fluxo sanguíneo coronário, associado à manutenção da função cardíaca. Muders & Elsner em 2000 demonstraram preservação da função diastólica de SHR durante o 1º ano de vida.

Ao considerar a resposta vasodilatadora à adenosina, podemos observar que nos grupos SB, TB e SA houve um aumento no fluxo sanguíneo coronário pela presença de um maior número de esferas no

tecido cardíaco. Estudos demonstram que na circulação coronariana o treinamento físico é capaz de aumentar a sensibilidade a agentes vasodilatadores em animais saudáveis (Muller et al., 1994; Oltman et al., 1992).

O número de esferas do grupo TA pós infusão de adenosina não se demonstrou estatisticamente significante, apesar de se observar uma tendência ao aumento de fluxo sanguíneo nessa amostra. Por partirem de uma condição basal de maior vasodilatação, os ratos adultos treinados não tiveram maior resposta à vasodilatação pela droga, pois já devem possuir mecanismos de auto-regulação em resposta à hipertensão já estabelecida.

Neste estudo, a adenosina foi avaliada através da atividade de enzimas envolvidas na cascata de hidrólise dos nucleotídeos extracelulares de adenina, os quais têm como produto final a formação de adenosina.

A atividade das enzimas ATP-difosfohidrolse, que hidrolisa ATP e ADP em AMP, e 5´-nucleotidase, que hidrolisa AMP em adenosina foram medidas na fração de soro sanguíneo que representa a formação de adenosina sistêmica.

Trabalhos vêm demonstrando uma participação da adenosina, e um aumento da atividade das ectonucleotidases na vasodilatação durante o exercício. O aumento da produção de adenosina observada no grupo TB em nosso estudo corrobora com os dados de Pierce et al. (1989) que demonstrou que o treinamento de natação em ratos promove aumento da atividade da enzima 5’-nucleotidase e aumentos na liberação de adenosina

no miocárdio, levando a uma maior vasodilatação e influenciando no fluxo sangüíneo para o miocárdio.

Além disso, o efeito vasodilatador depende da variedade da droga utilizada e a adenosina não requer participação endotelial no relaxamento.

A maior hidrólise de AMP também foi observada em estudo realizado por Roque et al. (2007) onde o grupo de ratos normotensos submetidos ao treinamento com protocolo de natação também apresentou maior formação de adenosina, indicando mais uma vez a participação da via desse nucleotídeo na prevenção e tratamento da hipertensão durante o exercício.

6. CONCLUSÃO

O treinamento físico atenua os níveis pressóricos de SHR independente da idade que se inicia o protocolo experimental, promove bradicardia de repouso e leva a um remodelamento cardíaco pelo aumento da hipertrofia ventricular esquerda.

Esses fatores, associados ao aumento no fluxo sanguíneo coronário, provavelmente mediado pela maior formação de adenosina circulante em ratos babies treinados, desempenha, desta forma, um importante papel na prevenção da HA e melhor perfusão sangüínea no músculo cardíaco.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

Amaral SL, Silveira NP, Zorn TM, Michelini LC. Exercise training causes skeletal muscle venular growth and alters hemodynamic responses in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2001 May;19(5):931-40.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* May 7; 72: 248-254, 1976.

Brandão, Andréa Araujo ; Brandão, Ayrton Pires ; Magalhães, Maria Eliane Campos; Pozzan, Roberto. Epidemiologia da Hipertensão Arterial. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo*, São Paulo, v. 13, p. 7-16, 2003.

Brum PC, Forjaz CL de Moraes, Tinucci T, Negrão CE. Adaptações agudas e crônicas do exercício no sistema cardiovascular. *Rev. Paul. Educ. Fís.,* São Paulo, v.18, p.21-31, ago. 2004.

Coade SB e Pearson JD. Metabolism of adenine nucleotides in human blood. *Circulation Research* 65: 531-7, 1989.

Emter CA, McCune SA, Sparagna GC, Radin MJ, Moore RL. Low-intensity exercise training delays onset of decompensated heart failure in spontaneously hypertensive heart failure rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Nov; 289(5):H2030-8, 2005.

Evangelista, F. S.; Brum, P. C. ; Krieger JE . Duration controlled swimming exercise training induces significant cardiac hypertrophy in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research,* São Paulo, v. 36, p. 1751-1759, 2003.

Forjaz, CLM; Santaella, DF; Rezende, LO. Exercise duration determines the magnitude and duration of post-exercise hypotension. Arq. Bras. Cardiol., vol.70 n.2, p.99-104, Feb. 1998.

Hagg U, Andersson I, Naylor AS, Gronros J, Jonsdottir IH, Bergstrom G, Gan LM. Voluntary physical exercise-induced vascular effects in spontaneously hypertensive rats. Clin Sci (Lond). 2004 Dec;107(6):571-81.

Hakkinen J.P e col. Measurement of organ blood flow with coloured microspheres in the rat. *Cardiovasc Res* Jan; 29 (1): 74-79, 1995.

Horta PP, de Carvalho JJ, Mandarim-de-Lacerda CA. Exercise training attenuates blood pressure elevation and adverse remodeling in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 2005 Nov 12; 77(26):3336-43.

Irigoyen MC, De Angelis K, Schaan BD, Fiorino P, Michelini LC. Exercício Físico no Diabetes Mellitus. Rev Bras Hipertens vol 10(2): abril/junho de 2003.

Jacobson KA, Gao ZG. Adenosine receptors as therapeutic targets. Nat Rev Drug Discov. 2006 Mar;5(3):247-64. Review.

Jas Barreto-Filho, Je Krieger - Genética e Hipertensão Arterial: Conhecimento Aplicado à Prática Clínica, Rev Soc Cardiol de São Paulo;1:46-55, 2003.

Kaplan NM. Clinical Hyppertension. 6th ed. Cap 3, pp44-108, 1994.

Lanzetta PA et al. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Analytical Biochem* 100: 95-97, 1979.

Lemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, Sakai S, Fujii N, Miyazaki H, Kakinuma Y, Matsuda M, Yamaguchi I. Cardiac hypertrophy by hypertension and exercise training exhibits different gene expression of enzymes in energy metabolism. *Hypertens Res.* 2003 Oct; 26(10):829-37.

Lopes HF, Barreto-Filho JAS, Riccio GMG. Tratamento Não-Medicamentoso da Hipertensão Arterial, Rev Soc Cardiol de São Paulo, 2003; 1:148-55.

Medeiros A, Negrão CE, Brum PC. Efeito do treinamento físico de natação sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos. *Revista Paulista de Educação Física* 14(1): 7-15, 2000.

Melo RM, Martinho, EJ, Michelini LC. Training-Induced, Pressure-Lowering Effect in SHR: Wide Effects on Circulatory Profile of Exercised and Nonexercised Muscles Hypertension, Oct; 42: 851 – 857, 2003.

Motoyuki I, Takashi M, Seiji M, Satoshi S, Nobuharu F, Hitoshi M, Yoshihiko K, Mitsuo M and Iwao Y: "Cardiac Hypertrophy by Hypertension and Exercise Training Exhibits Different Gene - Expression of Enzymes in Energy Metabolism". Hypertens Res; Vol. 26: 829-837 (2003).

Muders F, Elsner D. Animal models of chronic heart failure. *Pharmacol Res.* 2000 Jun;41(6):605-12

Natali, A.J. Effects of chronic exercise on cardiac myocytes: a review about mechanical adaptations. *R. bras. Ci e Mov.;* 12(1): 91-96, 2004.

Natali. A.J. Effects of voluntary exercise on the function of cardiac myocytes. Doctor of Philosophy Thesis, School of Biomedical Sciences, University of Leeds, 2000.

Negrão CE e Rondon MUPB. Exercício físico, hipertensão e controle barorreflexo da pressão arterial. *Rev Bras Hipertensão* 8: 89-95, 2001.

Okamoto K, Aoki K. Development of a Strain of Spontaneously Hypertension Rats. *Japanese Circulation Journal;* 27:282-293, march, 1963.

Oses JP, Sarkis FJJ et al. Soluble NTPDase: An additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *Life Sciences* 74: 3275-3284, 2004.

Overton JM, Joyner MJ, Tipton CM - Reductions in blood pressure after acute exercise by hypertensive rats. *J Appl Physiol;* 64: 748-52, 1988.

Pierce GN, Sekhon PS, Meng HP, Maddaford TG. Effects of chronic swimming training on cardiac sarcolemmal function and composition. *J Appl Physiol* Apr; 66(4): 1715-21, 1989.

Rocha, F. L. ; Everton Crivoi Carmo ; Roque, F. R. ; Hashimoto NY ; Rossoni, LV ; Clovis Frimm ; Ivy Aneas ; Negrão, C A ; Krieger, J.E. ; Oliveira, Edilamar Menezes de. Anabolic Steroids Induce Cardiac Renin-Angiotensin System and Impair the Beneficial Effects of Aerobic Training in Rats. *American Journal of Physiology.* Heart and Circulatory Physiology, v. 293, p. H3575-H3583, 2005.

Roque, F.R.; Rocha, FL ; Hashimoto, N. Y. ; Alves, MJNN ; Negrão, CE ; OLIVEIRA, EM . Efeitos do uso de esteróides e anabolizantes: do atleta ao paciente. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo,* v. 17, p. 21-24, 2007.

Rossatto ER, Silva LB, Pereira GS, et al. ATP diphosphohydrolase in human platelets from patients with coronary arteries heart disease. Platelets; 14: 47-52, 2003.

Shen FM, Zhu GM, Miao CY, Guan YF, Su DF. ATP-sensitive potassium channels are involved in adenosine-induced reduction of blood pressure variability in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004 Jul; 44(1):87-92.

Véras-Silva AS, Mattos KC, Gava NS, Brum PC, Negrão CE, Krieger EM. Low-intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol.;* 273:H2627-2631, 1997.

Zamo, F. S.; Oliveira, Edilamar Menezes de; Krieger, E.M. ; Irigoyen, MC. The effects of swimming training on blood pressure and heart hypertrophy depends on the age of spontaneously hypertensive rats. *J of Hypertension*, 2004.

Ziada AM, Hassan MO, Tahlilkar KI, Inuwa IM. Long-term exercise training and angiotensin-converting enzyme inhibition differentially enhance myocardial capillarization in the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens.* Jun;23(6):1233-40, 2005.

Weber KT e Brilla CG. Pathological hypertrofy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin - angiotensin - aldosterone system. Circulation 83: 1849-1865, 1991.

Yamori, Yukio. Development of the spontaneously hypertensive rat (SHR), the stroke-prone (SHRSP) and their various substrain models for hypertension-related cardiovascular diseases. *Handbook of hypertension – Experimental and Genetic of Hypertension*, vol 16, 1994.