

MARILIA MANTOVANI SAMPAIO BARROS

SECRETARIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
DO IB

DOSAGEM HISTAMINICA MUSCULAR DE RATOS EXERCITADOS

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
MARILIA MANTOVANI SAMPAIO
BARROS
e aprovada pela Comissão Julgadora.

R. Garcez Maril
28/06/93

CAMPINAS
1993

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

MARILIA MANTOVANI SAMPAIO/BARROS 278

DOSEAGEM HISTAMINICA MUSCULAR DE RATOS EXERCITADOS

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas, para a obtenção do
título de Mestre em Ciências
Biológicas na Área de Fisiologia.

Orientador :

Prof. Dr. Rui Errerias/Macielt

CAMPINAS
1993

A meus pais, pelo apoio e incentivo; ao meu irmão Nilton, pela colaboração computacional; à tia Nenê, pela alfabetização; ao Percival pelo carinho, compreensão e revisão ortográfica.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rui Errerrias Maciel, pela orientação, confiança e amizade.

A Prof.ª Dra. Regina Célia Spadari, que permitiu a realização da análise fluorimétrica em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Sérgio de Moraes, por ter cedido o equipamento para a dosagem da histamina.

Ao Prof. Dr. Aquiles E. Piedrabuena, pela amizade e pelos ensinamentos estatísticos.

A Prof.ª Dra. Marta H. Krieger - Azzolini, pelo empréstimo do tanque de natação.

A Prof.ª Eleonora E. Abra Blanco, pelos ensinamentos técnicos.

Ao Prof. José Roberto M. de Azevedo, pela colaboração em todas as fases deste trabalho.

A todos os professores do Depto. de Fisiologia e Biofísica da UNICAMP, pelo crescimento científico.

A todos os funcionários do Depto. de Fisiologia e Biofísica da UNICAMP, pelo auxílio experimental e burocrático, com amizade e dedicação.

Aos colegas do Depto. de Fisiologia e Biofísica da UNICAMP, em especial à Cecília B. J. Gallani, pelo incentivo.

A Prof.ª Margareth S. Freitas e à bibliotecária Ana Maria Rabetti, pela revisão ortográfica e bibliográfica.

Aos Profs. Carlos Alberto Anaruma e Norair S. dos Reis, pela avaliação histológica.

Aos Profs. Eduardo Kokubun, Everardo Magalhães e Angelina Zanescio, do Laboratório de Biodinâmica, pelas sugestões e participação.

Aos técnicos Clarice Y. Sibuya, Eduardo Custódio, José Roberto R. da Silva e Manuel J. de Oliveira, que não mediram esforços para a realização deste trabalho.

Ao Depto. de Educação Física do Instituto de Biociências da UNESP - Rio Claro e ao Centro de Bioterismo da UNESP - Botucatu.

Ao CNPq e ao FAEP pelo suporte financeiro.

SUMARIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Histamina : Origem, Liberação e Classificação	01
1.2. Efeitos Fisiológicos da Histamina	04
1.2.1. Função Cardíaca e Regulação Coronária	05
1.2.2. Função Vascular	08
1.3. Exercício Físico e Histamina	09
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAL E METODOS	14
3.1. Animais	14
3.2. Grupos Experimentais	15
3.3. Características do Treinamento Físico	17
3.4. Procedimento e Técnica Histológica	19
3.5. Determinação do Conteúdo Histamínico	21
3.5.1. Ensaio Fluorimétrico	21
3.5.2. Intensidade de Fluorescência relativa e Fluorescência do Branco	24
3.5.3. Recuperação da Histamina	26
3.5.4. Determinação da Curva Padrão	27
3.5.5. Cálculo da Concentração de Histamina	29
3.5.6. Lavagem da Vidraria	31
3.5.7. Análise Estatística	32

4.	RESULTADOS	33
4.1.	Variação Semanal da Massa Corporal durante o Período Experimental	33
4.1.1.	Relação entre a Massa das Amostras e a Massa Corporal	37
4.2.	Análise Histológica dos Músculos Gastrocnêmios	39
4.3.	Conteúdo de HA dos Músculos Gastrocnêmio e Cardíaco de Ratos Sedentários e Treinados em Repouso e após o Exercício Agudo de Natação	44
4.3.1.	Conteúdo de HA no Músculo Gastrocnêmio	44
4.3.2.	Conteúdo de HA no Músculo Cardíaco	45
5.	DISCUSSÃO	50
5.1.	Método	50
5.2.	Etapas Experimentais	54
5.2.1.	Animais, Grupos Experimentais e Treinamento Físico	54
5.2.2.	Variação Semanal da Massa Corporal de Ratos durante o Programa de Treinamento Físico	57
5.2.3.	Relação entre Massas das Amostras e Corporal de Ratos	57
5.2.4.	Exame Microscópico	58
5.2.5.	Concentração de HA nos Tecidos Musculares ..	59
6.	CONCLUSÕES	63
7.	RESUMO	64
8.	ABSTRACT	66
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
10.	ANEXOS	79

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 3.1	Exemplo do protocolo de treinamento 18
TABELA 4.1	Variação semanal da massa corporal (em gramas) de 11 ratos sedentários - SED (controles), durante o período experimental 34
TABELA 4.2	Variação semanal da massa corporal (em gramas) de 09 ratos treinados - TRE, durante o período experimental 35
TABELA 4.3	Relação entre a massa das amostras e a massa corporal de 19 ratos sedentários - SED (controles), após o sacrifício 38
TABELA 4.4	Relação entre a massa das amostras e a massa corporal de 17 ratos treinados - TRE, após o sacrifício 39
TABELA 4.5	Médias das áreas das secções transversais das fibras musculares do ventre medial, do músculo gastrocnêmio de ratos sedentários e treinados .. 40
TABELA 4.6	Conteúdo de histamina no músculo gastrocnêmio de ratos sedentários e treinados, a partir do repouso e após o exercício agudo de natação ... 46
TABELA 4.7	Conteúdo de histamina do músculo cardíaco de ratos sedentários e treinados, a partir do repouso e após o exercício agudo de natação ... 47

LISTA DE FIGURAS

Página

FIG. 3.1	Fixação do animal em placa cirúrgica e dissecação do músculo gastrocnêmio	20
FIG. 3.2	Representação esquemática das etapas estabelecidas no ensaio fluorimétrico	25
FIG. 3.3	Curva padrão (externo). Concentração de histamina em função da intensidade de fluorescência relativa..	28
FIG. 4.1	Variação semanal da massa corporal (g) de 11 ratos sedentários — SED (controles) e de 09 ratos treinados — TRE, durante o período experimental	36
FIG. 4.2	Média das áreas das fibras dos músculos gastrocnêmios de ratos sedentários e treinados	41
FIG. 4.3	Fotomicrografia de corte transversal do ventre medial do músculo gastrocnêmio de rato sedentário, corado por H/E. 275 X.	42
FIG. 4.4	Fotomicrografia de corte transversal do ventre medial do músculo gastrocnêmio de rato treinado, corado por H/E. 275 X.	43
FIG. 4.5	Conteúdo de histamina do músculo gastrocnêmio de ratos sedentários e treinados a partir do repouso e após o exercício agudo de natação	48
FIG. 4.6	Conteúdo de histamina do músculo cardíaco de ratos sedentários e treinados a partir do repouso e após o exercício agudo de natação	49

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histamina : Origem, Liberação e Classificação

A histamina (HA) ou betaimidazoliletetilamina [4 (ou 5) - (2 aminoetil -) imidazol] foi sintetizada por WINDAUS & VOGT (1907) como curiosidade química. Sua importância fisiológica foi inicialmente reconhecida por BARGER & DALE (1910) e KUTSCHER (1910), como estimulante uterino, em extratos do ergot (esporão do centeio). É formada pela descarboxilação do aminoácido histidina, uma reação efetuada pela enzima L-histidina descarboxilase, preparada por ACKERMANN (1910).

Somente em 1919, ABEL & KUBOTA demonstraram que a HA era inerente a muitos tecidos, sendo a todos, e não exclusivamente um produto de descarboxilação bacteriana da histidina, como pensava ACKERMAN (1910).

LEWIS (1927) reconheceu a propriedade de regulação histaminica na microcirculação tecidual, mas não foi conclusivo. ANREP & BARSOUN (1935) e ANREP et alii (1936, 1944) sugeriram que a hiperemia posterior à contração muscular era resultado da presença de substâncias vasodilatadoras locais, produzidas no tecido muscular. Esta resposta não era reproduzida por estimulação nervosa. A hiperemia era mediada por outros metabólitos, além dos ácidos láctico e carbônico, em conjunto com a histamina. Os autores revelaram

ainda uma interação destes compostos durante a contração muscular de longa duração.

Com os estudos de BURN (1950), acreditava-se que a liberação de HA estava relacionada às lesões teciduais. Em 1953, RILEY & WEST encontraram-na sob a forma inativa nos mastócitos.

SCHAYER (1952) associou o requerimento de fluxo sanguíneo tecidual para que a histamina exercesse controle da microcirculação, até sua neoformação.

O estudo das reações inflamatórias levou SCHAYER & GANLEY (1959) à conclusão de que a histidina descarboxilase é uma das poucas enzimas que aumentam na resposta ao estresse não específico. Sugeriram também os primeiros indícios da participação histamínica no processo de homeostasia, pela observação de seus efeitos nos pequenos vasos sanguíneos. SCHAYER (1960 a,b; 1962 a,b) incluiu nestas pesquisas a evidência de sítios anatômicos na microcirculação de mamíferos, responsáveis pela síntese de histamina sob a interferência de estímulos teciduais, como o teor de oxigenação. Desta forma, visando à homeostasia microcirculatória, através de estímulos que produziriam incremento sanguíneo nos tecidos, seria aumentada a atividade da histidina descarboxilase, responsável pela formação da histamina. BECK (1965) e RYAN & BRODY (1970, 1972) identificaram a mediação da HA na vasodilatação reflexa ativa, liberada de algum sítio não identificado. SCHAYER (1970, 1974) admitiu hipoteticamente que a HA continuamente pré-formada nas células do músculo liso microvascular, seria distribuída de três formas :

- a) intracelular - algumas moléculas permaneceriam no citoplasma para estimular receptores intrínsecos, envolvidos na vasodilatação;
- b) difusa na parede celular;
- c) extracelular - a HA atingiria o lúmen

dos vasos e seria arrastada pelo fluxo sanguíneo ou, poderia acumular-se no seu interior.

Segundo DOUGLAS (1978), a histamina e os anti-histamínicos estão entre as mais antigas e familiares substâncias do grupo dos "autacóides". Além destas substâncias, há um complexo de outras substâncias de atividade farmacológica intensa, que estão normalmente presentes no organismo ou nele podem ser formadas. Estas diferentes substâncias foram descritas diversamente como hormônios locais ou agentes autofarmacológicos, mas um termo genérico e apropriado é "autacóide", derivado do grego *autós* (próprio) e *akos* (medicamento ou remédio).

Até hoje persistem dúvidas quanto à importância deste grupo de autacóides, seu papel no organismo e suas relações com os outros sistemas. Respostas a estas questões são muito imprecisas. A própria classificação como autacóides é de certo modo uma constatação de que as provas não permitem, até o momento, uma classificação funcional muito precisa. Um dos obstáculos a esta maior precisão é que, enquanto os autacóides possuem uma larga amplitude de atividades farmacológicas e duração breve em pequenas quantidades, existe pouca segurança a respeito do papel fisiológico de algumas destas substâncias, como a HA. DOUGLAS questiona o problema do excesso de hipóteses ao afirmar que "os vários autacóides estão em busca de uma função".

1.2 Efeitos Fisiológicos da Histamina :

A relação da HA com patologias tem uma história que coincide com sua própria descoberta. Embora ainda persistam dúvidas a respeito de suas funções fisiológicas específicas, um maior conhecimento sobre a sua contribuição na homeostasia do homem poderá certamente auxiliar na compreensão de seu papel nas doenças (GREEN et alii, 1987). As dificuldades para se estabelecer uma relação causal entre a endoquímica e a fisiopatologia foram sugeridas por LORENZ et alii (1984). Avanços no conhecimento da fisiopatologia da HA têm sido limitados. Há dificuldades na precisão de métodos para sua determinação e deficiências dos mesmos para a determinação de seus metabólitos (GREEN et alii, 1987).

A histamina encontra-se distribuída nos tecidos e no sangue. É armazenada nos mastócitos teciduais, nos basófilos (leucócitos) e plaquetas do sangue. É liberada, entretanto, sob ativação de mastócitos e basófilos, pelos mecanismos imunológico e não-imunológico, sobretudo na alergia e anafilaxia. Seus efeitos biológicos são mediados através de três tipos distintos de receptores. A diferença entre eles está na ativação do mecanismo de transdução, isto é, o receptor tipo H1 está ligado à quebra de fosfoinosídeos e mobilização de cálcio, enquanto que o do tipo H2 está ligado à enzima adenil ciclase. As respostas mediadas pelos receptores H1 são antagonizadas pela mepiramina e clorfeniramina, enquanto que aquelas mediadas pelos receptores H2 são antagonizadas pela cimetidina e ranitidina. O mecanismo de ativação do receptor H3 ainda não está definido, embora se saiba que é antagonizado pela tioperamida.

Dentre as reações sistêmicas mais importantes envolvendo elevação do nível basal de histamina, estão a taquicardia, arritmias e hipotensão moderada, até condições ameaçadoras à vida, como hipotensão severa, fibrilação ventricular, broncoespasmo e falência dos sistemas cardiovascular e respiratório. No sistema cardiovascular do homem, a histamina tem efeitos circulatórios diretos - como na vasodilatação (rubor), queda da resistência vascular periférica com conseqüente diminuição da pressão arterial - e cardíacos - como efeito inotrópico e cronotrópico positivo e arritmias. Dentre as recentes constatações sobre as ações desta amina, destacam-se a homeostasia microcirculatória, a compatibilidade com os glicocorticóides (inflamação ou infecção), o controle da secreção gástrica, a função de neurotransmissor ou modulador do sistema nervoso, a influência em células tumorais, a função imune e a definição da terapêutica das reações imunes (alergia) e úlcera péptica. Resultados promissores ainda são esperados na solução dos problemas do sono (insônia) e da ansiedade (PEARCE, 1991).

1.2.1 Função Cardíaca e Regulação Coronária

Segundo PEREIRA (1981), o coração foi o órgão de onde partiram os primeiros estudos sobre a natureza da mediação histamínica. Não se sabia se o efeito da HA no miocárdio era devido à sua ação sobre receptores específicos do músculo cardíaco ou se envolvia a mediação de catecolaminas e de seus respectivos receptores.

Após sucessivos estudos, BURN & RAND (1958), MANNAIONI (1960),

BARTLET (1963) e FLACKE et alii (1967) chegaram à conclusão de que os efeitos da HA sobre o miocárdio eram devidos aos receptores específicos desta amina, sendo então afastada a hipótese de uma mediação por parte das catecolaminas e de seus receptores.

Inicialmente ARUNLAKSHANA & SCHILD (1959) descobriram em íleo de cobaia e em brônquios, um certo tipo de receptor, que, posteriormente, ASH & SCHILD (1966) denominaram receptor H1. Somente em 1972, BLACK et alii definiram os receptores H2. Finalmente, em 1983, ARRANG et alii propuseram a existência do receptor histamínico pré-sináptico H3. Com a descoberta de um agonista seletivo, (R) - alfa-metil-histamina (RAMH), e do antagonista tioperamida, foram obtidos maiores esclarecimentos sobre este receptor. Como este subtipo de receptor controla a liberação neuronal de noradrenalina (SCHILICKER et alii, 1989), de serotonina (SCHILICKER et alii, 1988), de acetilcolina (TRZECIAKOWSKY, 1987; CLAPHAM & KILPATRICK, 1992) e de neurotransmissores não-adrenérgicos e não-colinérgicos (ICHINOSE & BARNES, 1989 e TAYLOR et alii, 1992 a,b), atribuiu-se a ele função ambígua (auto e hetero receptividade).

REINHARDT, WAGNER & SCHUMANN (1974) revelaram que caberia aos receptores H1 a mediação da resposta inotrópica positiva do átrio esquerdo, e detectaram a sua presença no nodo átrio-ventricular e nos vasos coronários. LEVI & KUYE (1974) encontraram os receptores H2 nas fibras ventriculares e no nodo sino-atrial. Confirmando as conclusões anteriores, LEVI, ALLAN & ZAVECZ (1976) atribuíram aos receptores H2 os efeitos cronotrópico positivo e inotrópico ventricular, o controle da automaticidade, tanto atrial como ventricular, e revelaram que ambos os receptores estariam envolvidos na mediação da dilatação coronária.

A HA pode ser liberada por estímulos não-imunológicos (TRIGGIANI et alii, 1985), podendo também, ser encontrada em mastócitos e basófilos (MARONE et alii, 1984 e SCHULLMAN et alii, 1982). No coração humano, os mastócitos estão presentes no átrio direito e na região dos nodos sinoatrial e atrioventricular (LEVI et alii, 1982). O aumento de sua concentração pode ser suficiente para modular a função inotrópica, inibir a função dromotrópica e até induzir arritmias ventriculares (LEVI, 1972; LEVI et alii, 1981; TRZECIAKOWSKY & LEVI, 1982). Através da utilização de drogas, demonstrou-se que os receptores H1 coronários eram responsáveis pela vasoconstrição e os receptores H2, pela vasodilatação (HAGEN & PAGELOW, 1979; GINSBURG et alii, 1980; 1981; KONISHI et alii, 1981; TODA et alii, 1982; 1983 e GODFRAIND & MILLER, 1983).

WOLFF & LEVI (1986) enfocaram a ação arritmogênica da HA em mamíferos, mediada principalmente pelo receptor H1, por lentificar a condução átrio-ventricular e pelo receptor H2, por estimular a frequência cardíaca e a automaticidade ventricular. A ativação isolada dos receptores H1 pode precipitar vasoespasmo, exacerbando este estado se houver bloqueio simultâneo dos receptores H2 (MILLER & BOVE, 1988).

Mc LEOD et alii (1991) examinaram os efeitos centrais da modulação dos receptores H3 na função cardiovascular de preás. Concluíram que a estimulação central dos receptores H3, nestes animais, diminuiu a frequência cardíaca e a pressão arterial, por aumento do tônus vagal no coração.

1.2.2 Função Vascular

A HA está presente na parede vascular de ratos (HOWLAND & SPECTOR, 1972; EL-ACKAD & BRODY, 1975; HOLCSLAW & IMHOFF, 1978; HARVEY, 1978; GARLAND & KEATINGE, 1982), exercendo neste sítio a regulação da microcirculação (SCHAYER, 1974) e controlando a pressão arterial (HOLCSLAW et alii, 1984). Esta amina também pode ser sintetizada pelas células endoteliais (ABBOUD et alii, 1982) e a sua resposta vascular pode variar de acordo com o receptor ativado. TOBIA et alii (1969, 1970) confirmaram sua função vascular na mediação da vasodilatação durante o reflexo neurogênico em ratos.

HOLCKSLAW et alii (1984), estudando a capacidade de armazenamento e metabolização da HA em artérias e veias de ratos adultos, concluiu que é na porção vascular da circulação que se dá rapidamente o armazenamento e a inativação da HA. Esta propriedade é um mecanismo importante de remoção da HA liberada na circulação. A HA armazenada parece ser vital para a regulação do tônus vascular, quando liberada pelo estímulo apropriado.

Foi pesquisada a diversidade de resposta coronária à HA em vários animais (TODA, 1987; UEDA et alii, 1991). Estas ações controversas atribuídas à HA não decorrem somente da ativação de seus receptores nas células do músculo liso endotelial, mas também dos receptores endoteliais que medeiam a liberação de prostaglandinas (TODA, 1987) ou fator de relaxamento endotelial (FURCHGOTT, 1983).

1.3 Exercício Físico e Histamina

O exercício físico é capaz de alterar, no homem, os níveis de compostos biologicamente ativos no sangue e nos tecidos, além dos " hormônios clássicos ". Desta forma, exercícios físicos dinâmicos e executados em período de tempo prolongado podem resultar em elevação específica do nível de histamina (HA) no sangue e em outros tecidos (VIRU, 1985).

GRAHAM et alii (1964) estudaram a capacidade de formação da histamina (HFC - histamine forming capacity) em animais submetidos ao aumento do fluxo sanguíneo após o exercício, na presença de anóxia e na administração de outras substâncias farmacológicas. Nesse trabalho, os autores utilizaram o treinamento físico prolongado em camundongos, observando aumento da HFC em tecidos pobres em mastócitos, como é o músculo esquelético, dentre outros. Em ratos, foi encontrada uma situação antagônica à dos camundongos sob as mesmas condições de treinamento, talvez em decorrência da secreção de corticosteróides que, nesta espécie, diminuiu a HFC. Questionou-se ainda o significado fisiológico da transformação histaminérgica na HFC. HAKANSON (1965) sugeriu que a HFC era resultado da contração muscular, podendo ser facilitada pelo pH ácido, atuando no aumento da atividade enzimática.

Alguns pesquisadores observaram um período prolongado de vasodilatação, de aproximadamente 30 minutos, após o término de um exercício extenuante (CERRETELLI et alii, 1969; BERNE et alii, 1971; MORGANROTH et alii, 1975 ; OWEN et alii, 1975). Entretanto, MORGANROTH et alii (1977) determinaram condições necessárias para a indução dessa "vasodilatação tardia" e relacionaram o fato ao

provável envolvimento das prostaglandinas e da HA, como potentes substâncias vasodilatadoras da regulação local do fluxo sanguíneo.

Embora iniciados na década de 60, os estudos envolvendo o teor de histamina nos tecidos, durante o exercício físico, até hoje ainda não estão bem estabelecidos. EREZ & MESCHERYACOVA (1972) reproduziram um treinamento em esteira rolante em humanos, causando um aumento do nível de histamina no plasma, à temperatura ambiente de 36,7^o C. Após aclimação à esta temperatura, a resposta desapareceu e não ocorreu alteração alguma à temperatura de 21^o C. Juntamente com esses autores, VAISFELD & KASSIL (1981) publicaram que exercícios extenuantes, à uma temperatura ambiente confortável, eram capazes de aumentar a HFC sanguínea em atletas ou não atletas. Esta formação era acompanhada pela diminuição da histaminase no sangue. PAVLIK et alii (1980) observaram que, durante exercícios dinâmicos prolongados, o nível de histamina sanguínea não se alterava em não-atletas, ou em atletas especializados em exercícios de curta duração (tipo "explosivos"). Em atletas de provas de longa duração (tipo "endurance"), devido, provavelmente, ao alto teor de oxigenação requerido e ao baixo pH que apresentavam, havia uma sensível elevação do teor de histamina no sangue. De qualquer forma, conforme assinala VIRU (1985), não há conhecimento suficiente para decidir se a resposta ao aumento da HFC pode ser considerada adaptativa, ou se ocorre em conexão com a deterioração metabólica durante a fadiga.

JONES et alii (1989) identificaram três fases do treinamento físico. A primeira fase é caracterizada pelo aumento da habilidade de execução do exercício, fruto de um processo de aprendizado, não havendo melhora da força muscular. Na segunda fase, o aumento da força é concomitante ao aumento da área de secção transversal da

fibra. A terceira fase é comprovada cientificamente após 12 semanas de treinamento. Esta fase é marcada basicamente pelo cansaço na repetição do programa empregado, principalmente pelos não-atletas, e, mantendo-se o teste, um lento aumento da área de secção transversal da fibra e da força muscular.

KNIGGE et alii (1990) investigaram a possibilidade de neurônios histaminérgicos hipotalâmicos estarem envolvidos no estresse induzido pela liberação de catecolaminas periféricas. Este estudo foi realizado por meio de um bloqueio central de receptores H1 e H2 em ratos machos, na liberação de catecolaminas. Estes animais foram estimulados com infusão de HA intracerebroventricular (icv) ou pela exposição a um estresse moderado. Concluiu-se que a HA neuronal é um importante mediador do estresse moderado pela liberação induzida de catecolaminas periféricas, através de receptores H1 e H2 no sistema nervoso central. GREEN et alii (1990) enfatizaram, dentre os efeitos de adaptação precoce ao exercício de curta duração (três dias), a elevação do débito cardíaco, o aumento do volume de ejeção e a redução na frequência cardíaca. Da mesma forma, persistem, no exercício prolongado, durante o aumento da temperatura corpórea, o aumento do débito cardíaco (visando maior fluxo sanguíneo muscular e manter a demanda arterial de oxigênio), o aumento do volume de ejeção (para possibilitar maior reserva cardíaca) e a queda da frequência cardíaca (a fim de aumentar a tolerância à intensidade de resistência imposta pelo exercício prolongado).

A respeito da distribuição e de possíveis funções do sistema histaminérgico neuronal no SNC de ratos, WADA et alii (1991) enfatizaram a modulação deste sistema sobre as funções cardiovascular e termorregulatória. Com relação às atividades neuroendócrina e

autonômica, a HA central pode estimular ou inibir a presença de alguns hormônios relacionados à indução da hipotermia (BREZENOFF & LOMAX, 1970) e da hiperglicemia (NISHIBORI et alii, 1987). Através da manipulação hipotalâmica de ratos, SAKATA et alii (1991) pesquisaram os efeitos da HA neuronal e sua possível ação na termorregulação e no balanço energético.

OLTMAN et alii (1992) se propuseram a determinar as alterações na porção proximal de artérias coronárias de porcos, induzidas pelo treinamento físico. Embora nos vasos estudados houvesse a representação de um pequeno componente da resistência vascular e do fluxo coronário total, a importância destes achados decorre da alteração do controle vascular em grandes artérias coronárias, podendo ser indicativa da alteração no controle de todo o leito vascular. Estes achados também podem ter significado clínico com respeito aos efeitos do treinamento nas patologias das artérias coronárias e incidência de vasoespasmo.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Mediante a literatura apresentada e considerando a possível função histaminica na homeostasia microcirculatória, o presente trabalho teve por objetivos :

1. Determinar o conteúdo histaminico nos tecidos musculares estriado esquelético e cardíaco de ratos controles.
2. Comparar esses resultados com aqueles provenientes de ratos submetidos a três condições experimentais : 1) treinamento físico; 2) exercício agudo e 3) treinamento físico seguido de exercício agudo.

3. MATERIAL E METODOS

3. MATERIAL E METODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 94 ratos (*Rattus norvegicus*, Hannover, var. albina) Wistar, machos, com cerca de 90 dias de idade (adulto) e peso entre 200 e 250 gramas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Estadual Paulista - Campus de Botucatu, SP.

Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (no máximo de 5 ratos por gaiola), em sala climatizada com controle de temperatura (entre 24 °C e 28 °C) e luminosidade (ciclo de 12 horas - claro, 12 horas - escuro).

Água e ração (Labina - Purina) foram fornecidas "ad libitum", e o peso corporal de cada animal foi avaliado semanalmente.

3.2. Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos em 4 grupos experimentais para determinação dos conteúdos de histamina dos músculos gastrocnêmio e cardíaco.

Grupo 1 :

Sedentário - Repouso (SED-R) : animais mantidos em condições sedentárias (repouso) no cativeiro até o sacrifício - controle.

Grupo 2 :

Sedentário - Agudo (SED-A) : animais mantidos em condições sedentárias no cativeiro, que realizaram exercício agudo de natação durante 60 minutos, com resistência de 8% do peso corporal, imediatamente antes do sacrifício.

Grupo 3 :

Treinado - Repouso (TRE-R) : animais que realizaram exercício dinâmico prolongado de natação, com resistência de 8% do peso corporal, 60 minutos/dia, 5 dias/semana, durante 45 dias, e que foram mantidos em repouso (24 horas) após a última sessão de natação, até o sacrifício.

Grupo 4 :

Treinado - Agudo (TRE-A) : animais que realizaram o mesmo protocolo de treinamento do grupo anterior, e que realizaram 60 minutos de exercício agudo de natação, com resistência de 8% do peso corporal, imediatamente antes do sacrifício.

3.3. Características do Treinamento Físico

Após seu período de adaptação, os ratos do grupo treinado (TRE) foram submetidos a um programa progressivo de treinamento (vide tabela 3.1), que consistiu de exercício físico dinâmico prolongado de natação. Este treinamento foi realizado em tanques com dimensões de 100 cm x 80 cm x 80 cm, que permitiam o controle da temperatura da água ($31^{\circ}\text{C} \pm 1$) e, devido à sua profundidade, impossibilitavam que o animal apoiasse sua cauda no fundo dos mesmos. As sessões eram realizadas sempre no mesmo horário (das 9:00 às 10:00 horas), com 10 animais nadando simultaneamente.

Inicialmente, os animais foram adaptados à atividade física, não recebendo resistência corporal adicional durante os 3 primeiros dias. A partir daí, a cada 3 dias, até completar 21 dias do marco inicial do treinamento físico, o tempo de resistência era aumentado em 10 minutos e complementado com o nado livre, até os 60 minutos pré-estabelecidos (Tabela 3.1). A resistência consistia de um peso de chumbo conectado no dorso do animal, correspondente a 8 ou 10% do peso corporal. Os animais eram pesados semanalmente e os respectivos pesos de chumbo eram reavaliados e adaptados para cada animal, também semanalmente.

Os animais dos grupos sedentários foram apenas manipulados em suas gaiolas-moradia, para a realização da limpeza das mesmas, pesagem semanal e marcação numérica.

TABELA 3.1 - Exemplo de protocolo de treinamento

*** DIAS TREINAMENTO	DIA SEMANA	DURAÇÃO (min)	TEMPO RESISTENCIA (min)
* 1-3	17-18-21	60	livre
4-6	22-23-24	60	10' peso + 50' livre
7-9	25-28-29	60	20' peso + 40' livre
10-12	30-31-01	60	30' peso + 30' livre
13-15	04-05-06	60	40' peso + 20' livre
16-18	07-08-11	60	50' peso + 10' livre
19-21	12-13-14	60	resistência máxima
** 22-24	15-18-19	60	60
25-27	20-21-22	60	60
28-30	25-26-27	60	60
31-33	28-01-04	60	60
34-36	05-06-07	60	60
37-39	08-11-12	60	60
40-42	13-14-15	60	60
43-45	18-19-20	60	60

* **Fase de adaptação :** 60 minutos de nado livre com tempo de resistência parcial, até completar 21 dias do marco inicial do treinamento.

** **Fase de treinamento :** 60 minutos de natação com resistência de 8 a 10% do peso corporal (durante todo o tempo de sessão), até completar 45 dias do marco inicial do treinamento.

*** O experimento foi desenvolvido durante os meses Janeiro, Fevereiro, Março ; Outubro, Novembro e Dezembro.

3.4. Procedimento e Técnica Histológica

Após o término do período experimental, os animais sedentários e treinados foram distribuídos em dois subgrupos para serem submetidos ou não ao exercício agudo, imediatamente antes do sacrifício por decapitação.

A seguir, foram fixados em placa cirúrgica, para dissecação e pesagem do coração e dos músculos gastrocnêmios. A figura 3.1 ilustra como foram dissecados os músculos gastrocnêmios.

O coração, sem discriminar-se os átrios dos ventrículos, foi destinado para a determinação do conteúdo histamínico.

Os músculos gastrocnêmios foram divididos em duas porções. A porção ventro-medial foi utilizada para o exame histológico e a restante para a determinação do conteúdo de histamina (HA).

As amostras ventro-mediais, utilizadas para o exame histológico, foram congeladas em n-hexano e nitrogênio líquido, em suportes apropriados para que o material fosse cortado de forma a permitir cortes transversais de fibras musculares de 7 μ m, no criostato. Estes cortes, colhidos em laminulas e corados pela técnica H/E, segundo DUBOWITZ & BROOKE (1973), foram então desidratados em série ascendente de álcoois, diafanizados em xilol e montadas em lâminas, com resina sintética (Entelann).

Com o auxílio de câmara clara e planímetro, foram medidas as áreas dos perfis de 80 fibras musculares dos músculos dos grupos dos ratos sedentários, a fim de verificar o grau de hipertrofia muscular produzido pelo exercício.



FIGURA 3.1 - Fixação do animal em placa cirúrgica e dissecação do músculo gastrocnêmio. Músculo gastrocnêmio, porção ventro-medial (seta maior); músculo gastrocnêmio, porção ventro-lateral (seta média); músculo plantar (seta pequena).

3.5. Determinação do Conteúdo Histamínico

3.5.1. Ensaio Fluorimétrico

A determinação do teor de histamina em cada amostra de tecido muscular foi realizada por meio de análise fluorimétrica. Empregou-se o método de SHORE et alii (1959), com algumas modificações sugeridas por NOAH & BRAND (1961), REDLICK & GLICK (1965), ANTON & SAYRE (1968) e HAKANSON et alii (1972), visando obter maior sensibilidade e especificidade.

O ensaio fluorimétrico consistiu de duas fases fundamentais :
extração da histamina dos tecidos e análise fluorimétrica com
o o-ftalaldialdeído (OPT).
*

FASE I - EXTRAÇÃO DA HISTAMINA DOS TECIDOS

Depois de limpa, seca e pesada, cada amostra tecidual foi submetida às seguintes etapas :

- a. homogeneização em 12 ml de ácido perclórico 0,4 N, mediante trituração com homogeneizador elétrico;
- b. transferência do volume total da suspensão obtida para um tubo de centrifuga, repouso de 5 minutos e centrifugação (1500 rpm);

*
o-Phthalic-dicarboxaldehyde, ALDRICH

- c. adição de 3 ml do sobrenadante em um balão (b¹) de vidro, arrolhado, com conteúdo prévio de 0,5 ml de solução de hidróxido de sódio 5 N, 1 grama de cloreto de sódio e 10 ml de n-butanol. Acréscimo, ainda, de 1 ml de ácido clorídrico 0,1 N, para corresponder à adição feita no "balão de recuperação", conforme será descrito a seguir (item 3.5.3);
- d. agitação da mistura por 10 minutos e transferência do conteúdo total para um tubo de centrifuga de vidro, arrolhamento e centrifugação;
- e. aspiração da fase aquosa inferior, que era desconsiderada, e posterior lavagem do butanol pela agitação com 5 ml de solução de hidróxido de sódio 0,1 N, saturada de cloreto de sódio, durante 3 minutos. Esta operação consistia na remoção da histidina residual, ficando retida na solução de hidróxido de sódio;
- f. nova centrifugação e transferência de 8 ml do sobrenadante para um balão (b²) de vidro, arrolhado, contendo 3 ml de Ácido clorídrico 0,1 N e 15 ml de n-heptano;
- g. agitação durante 5 minutos e centrifugação do conteúdo total em um tubo de centrifuga de vidro arrolhado;
- h. transferência de 2 ml da fase aquosa (inferior) para um tubo de ensaio.

FASE II - ANALISE FLUORIMETRICA COM O O-FTALDIALDEIDO (OFT)

A análise fluorimétrica foi composta pelas seguintes etapas :

- a. acréscimo de 0,4 ml de solução 1 M de hidróxido de sódio ao extrato ácido contido no tubo de ensaio;
- b. adição de 0,1 ml de solução de OFT a 0,2 % em metanol, o qual reage prontamente com a histamina, formando um produto que emite fluorescência específica a 450 μm , quando excitado a 360 μm ;
- c. acréscimo de 0,2 ml de solução 2 M de ácido cítrico, após 4 minutos, a fim de bloquear a reação OFT - histamina, por queda de pH. A fluorescência emitida pelo produto final praticamente se mantém por 30 a 40 minutos;
- d. transferência da solução problema para uma cubeta especial
*
de quartzo e leitura no espectrofotofluorímetro (Fig. 3.2).

*

Perkin Elmer - Modelo 204 a.

3.5.2. Intensidade de Fluorescência Relativa e Fluorescência do Branco

Para cada amostra, a intensidade de fluorescência relativa, que se obtém da leitura, pode ser considerada igual à soma das intensidades de duas fontes fluorescentes, que estão na cubeta : a do produto histamina - OPT, que é específico e a do solvente e demais solutos utilizados, que podem fluorescer inespecificamente e constituem o branco.

A partir desta consideração, a intensidade de fluorescência relativa correspondente à histamina foi determinada pela equação :

$$F_h = F_t - F_b \quad (I)$$

onde

F_h = intensidade de fluorescência relativa devido à histamina ligada ao OPT;

F_t = intensidade total de fluorescência relativa, obtida da leitura;

F_b = intensidade de fluorescência relativa do branco, obtida também da leitura.

O preparo da solução do branco realizou-se através do mesmo procedimento das demais amostras, em ácido perclórico 0,4 N, seguida de centrifugação. A seguir, procedeu-se conforme a descrição da primeira fase do ensaio fluorimétrico do item "c" em diante.

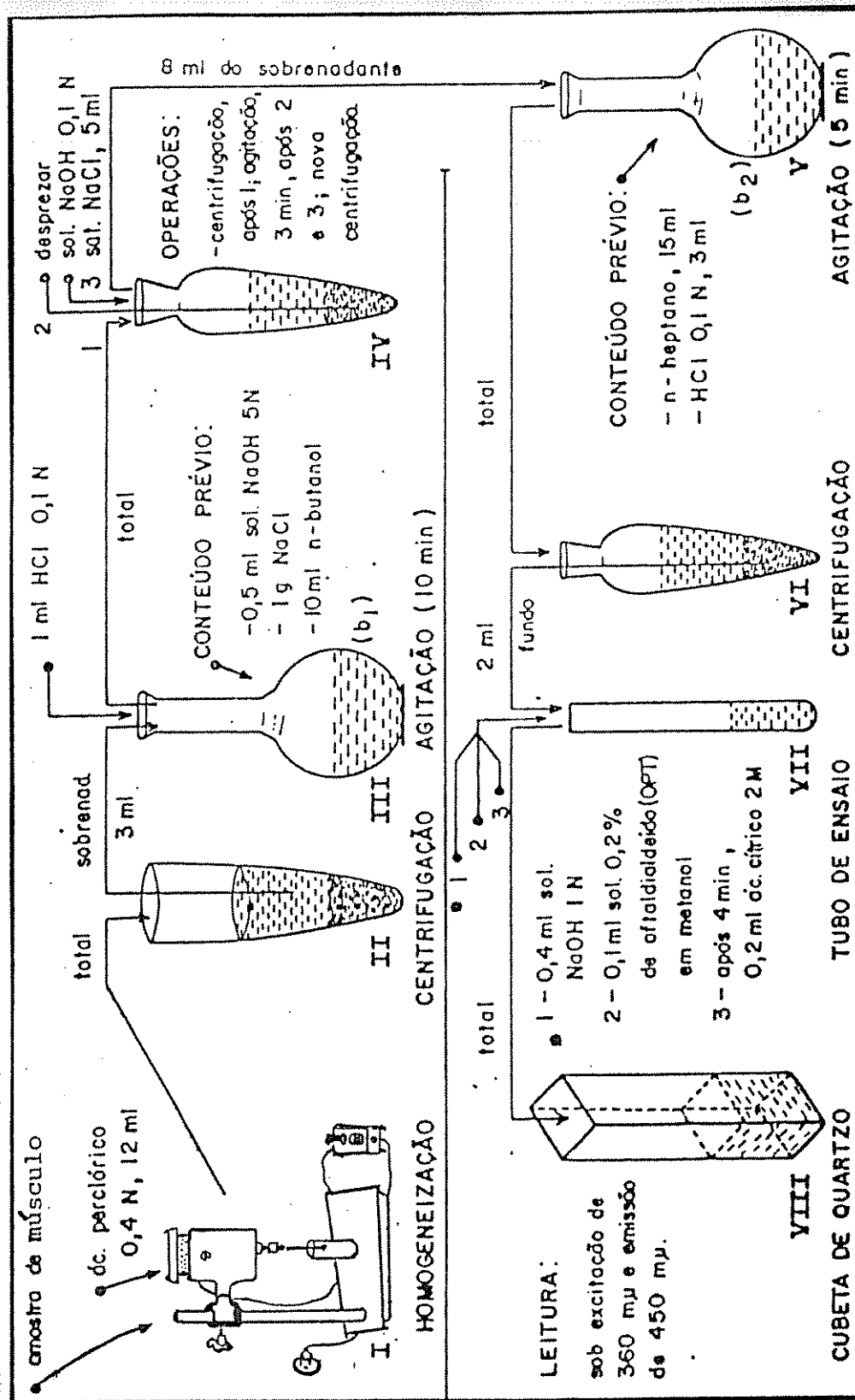


FIGURA 3.2 - Representação esquemática das etapas estabelecidas no ensaio fluorimétrico.

3.5.3 Recuperação da Histamina

Para detectar a quantidade de histamina recuperada pelo ensaio fluorimétrico, a 3 ml do mesmo sobrenadante empregado para o branco, acrescentou-se 1 ml de solução de ácido clorídrico 0,1 N, contendo 2 μg de histamina*. Os 4 ml de solução histamínica resultante (solução de recuperação ou padrão interno), de concentração 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, foram adicionados a um balão (b_{1R} = balão de recuperação) e prosseguiu-se ao tratamento conforme o item "c" da primeira fase do ensaio fluorimétrico.

Admitindo-se que a solução de recuperação (R) acrescentada à concentração de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, no seu balão b_{1R} , forneça na cubeta uma solução de concentração C_{cubR} ; então, uma solução problema (P) acrescentada numa concentração C_{b1P} , no seu balão b_{1P} , fornecerá na cubeta uma solução de concentração C_{cubP} , tal que é válida a proporção :

$$\frac{0,5 \mu\text{g}/\text{ml}}{C_{cubR}} = \frac{C_{b1P}}{C_{cubP}}$$

Desta relação, deduz-se que :

$$C_{b1P} = \frac{0,5 \cdot C_{cubP}}{C_{cubR}} \quad (\mu\text{g}/\text{ml}) \quad (\text{II})$$

* Histamine dihydrochloride, S I G M A.

Desta equação, pôde-se determinar a concentração C_b de uma solução-problema adicionada no balão b (extrato de miocárdio e gastrocênio, no caso), quando são conhecidas as concentrações C_{1P} , C_{cubP} da mesma solução-problema, e C_{cubR} da solução de recuperação, ambas na cubeta. O valor 0,5 exprime o módulo da concentração conhecida, adicionada ao balão b. Através da introdução das intensidades de fluorescência num gráfico de curva padrão, determinou-se tanto a concentração C_{cubP} como a C_{cubR} .

3.5.4. Determinação da Curva Padrão

Soluções histamínicas de concentrações 0,05; 0,10; 0,25; 0,50 e 1,00 $\mu\text{g/ml}$ (padrões externos) foram empregadas em cada experimento, a fim de traçar uma curva padrão. Os pontos representativos das concentrações histamínicas e suas respectivas intensidades de fluorescência relativa definiram uma reta no gráfico cartesiano. O branco padrão foi obtido com ácido clorídrico 0,1 N, que também foi utilizado como solvente da histamina.

O tratamento fluorescente seguiu os procedimentos descritos na segunda fase do ensaio fluorimétrico, sendo pipetados 2 ml de cada solução padrão, inclusive do padrão branco (FIG. 3.3).

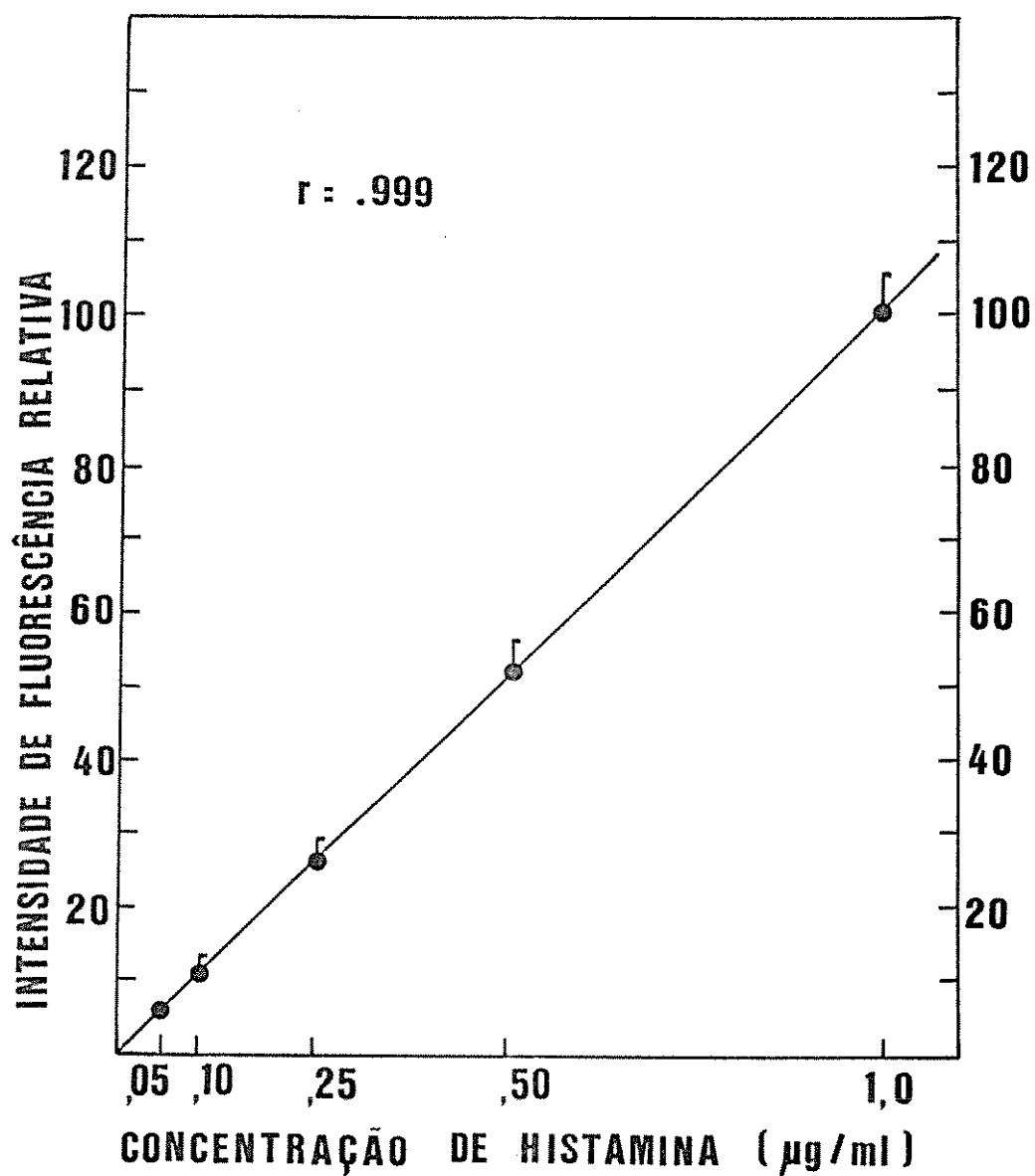


FIGURA 3.3 - Curva padrão (externo). Concentração de histamina em função da intensidade de fluorescência relativa. As barras verticais representam os desvios padrões das médias de dez experimentos.

3.5.5. Cálculo da Concentração de Histamina

A aplicação da equação II, a cada amostra, permitiu determinar a sua respectiva concentração de adição ao balão b1. Contudo, a histamina ao passar para o balão b1, já terá sofrido 2 processos de diluição.

Primeiro processo: ocorreu durante a homogeneização do tecido em 12 ml de ácido perclórico 0,4 N. A diluição está indicada pela equação :

$$FD1 = \frac{|Vap| \text{ ml} + |Va'| \text{ ml}}{|Ma| \text{ g}} \quad (III)$$

onde

FD1 = fator indicativo da quantidade de vezes em que a concentração de histamina tornou-se menor;

| Vap | ml = módulo do volume de ácido perclórico, expresso em ml (por conveniência 12 ml/g de tecido, em todos os experimentos);

| Va' | ml = módulo do volume da amostra de tecido, dissolvida, expresso em ml;

| Ma | g = módulo da massa da amostra, expresso em gramas.

Segundo processo : Ocorreu durante a diluição de 3 ml da solução da amostra em 4 ml, devido ao fato de ter havido um acréscimo de 1 ml da solução 0,1 N de ácido clorídrico ao balão b1. A diluição está indicada pela equação :

$$FD2 = 4/3 \quad (IV)$$

onde

FD2 = fator que indica quantas vezes a concentração de histamina tornou-se novamente menor, nesta segunda diluição.

Para determinar a concentração real de histamina nas amostras de tecido muscular, será então necessário multiplicar a concentração C_b , encontrada através da equação II, pelos dois fatores de diluição. Chamando de CHT (Concentração de Histamina nos Tecidos) à esta concentração, tem-se pois :

$$CHT (\mu g/g) = \frac{(VAP \text{ ml} + Va' \text{ ml})}{(Ma \text{ g})} \times \frac{4}{3} \times 0,5 \times \frac{C_{cubF}}{C_{cubR}} \quad (V)$$

Esta equação final permitiu determinar diretamente a concentração de histamina de uma amostra de tecido muscular, esquelético ou cardíaco.

3.5.6. Lavagem da Vidraria

Para a limpeza do material de vidro, empregou-se logo após o uso, o que se segue :

1. enxaguadura em água corrente, até a máxima remoção do material aderido;
2. submersão em forte solução detergente e agitação deste material no interior de cada frasco, inclusive pipetas;
3. lavagem com água de torneira até a completa remoção do detergente;
4. imersão em nova solução detergente, deixando-se pernoitar;
5. enxaguadura (6 vezes) em água corrente, repetindo-se esta operação com água destilada e, depois, com água bi-destilada;
6. tratamento do interior de todos os frascos com Ácido nítrico 50 % (as pipetas eram mergulhadas neste líquido, inclusive), onde se deixava permanecer por 20 minutos. Esta operação foi repetida a cada três experimentos;
7. finalmente, enxaguadura (4 vezes) em água destilada e, posteriormente, em água bi-destilada, . Secagem em estufa a 36 ° C;
8. lavagem da cubeta de quartzo no final de cada sessão experimental, com água destilada, e tratamento com Ácido nítrico. Remoção do ácido residual com água bi-destilada. Secagem espontânea, em ambiente livre de "contaminação".

3.5.7. Análise Estatística

Os resultados provenientes da determinação histaminica foram analisados empregando-se o teste "t" de "Student" para amostras não-pareadas (quando os grupos experimentais foram comparados a seus respectivos controles) e o teste de "Mann-Withney" (U-test) para a comparação dos grupos experimentais entre si.

Para a avaliação semanal da massa corporal dos animais durante o programa de treinamento físico foi empregada a análise de variância por coeficientes ortogonais.

O teste "t" de "Student" também foi empregado para comparar as médias das áreas das secções transversais do músculo gastrocnêmio (ventro-medial), para as massas corporais e das amostras de gastrocnêmio e coração de animais SED vs TRE.

A relação "massas das amostras / corporais" foi analisada por regressão e correlação. Por não ser linear, a regressão em animais SED, utilizou-se o teste de correlação de "Sperman".

Na diferença entre as massas destas amostras foram empregados os testes de "Kolmogorov-Smirnov", "Hollander e Wolfe" e "Mann Withney".

Em todos os testes, consideraram-se, como indicativos de significância estatística, valores de p menores ou iguais a 0,05 ($p \leq 0,05$) (ROSCOE, 1975; BEIGUELMAN, 1988).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 - Variação Semanal da Massa Corporal durante o Período Experimental

Durante o período experimental (45 dias) foram avaliadas as massas corporais semanais de ambos os grupos de ratos, sedentários e treinados.

A variação semanal da massa corporal nestes grupos, representada nas tabelas 4.1, 4.2, Anexo 01 e na figura 4.1, demonstrou que, embora ambos os grupos ganhassem massa corporal durante o período estudado, houve uma tendência a maiores valores no grupo sedentário.

TABELA 4.1 - Variação semanal da massa corporal (gramas) de 11 ratos sedentários - SED (controles), durante o período experimental.
*

SEMANAS	M	DP
0	253,27	22,1318
1	267,27	24,9081
2	282,18	24,3385
3	301,27	26,0809
4	319,36	31,1007
5	328,90	31,7378
6	347,09	34,1187
7	357,09	34,4541
8	370,54	37,7660
9	373,81	39,8266
Mf-Mi	120,54	24,2749

M = Média

DP = Desvio Padrão

Mf-Mi = Massa Final - Massa Inicial

* Análise de Variância por Coeficientes Ortogonais (vide Anexo 01)

TABELA 4.2 - Variação semanal da massa corporal (gramas) de 09 ratos treinados - TRE₁ durante o período experimental.*

SEMANAS	M	DP
0	255,68	32,0056
1	272,77	36,6666
2	285,55	39,1762
3	296,33	43,3012
4	308,55	44,9725
5	315,68	47,7714
6	331,33	50,6581
7	341,14	51,2716
8	347,55	50,1500
9	353,00	51,1155
Mf-Mi	97,11	21,5258

M = Média

DP = Desvio Padrão

Mf-Mi = Massa Final - Massa Inicial

* Análise de Variância por Coeficientes Ortogonais (vide Anexo 01)

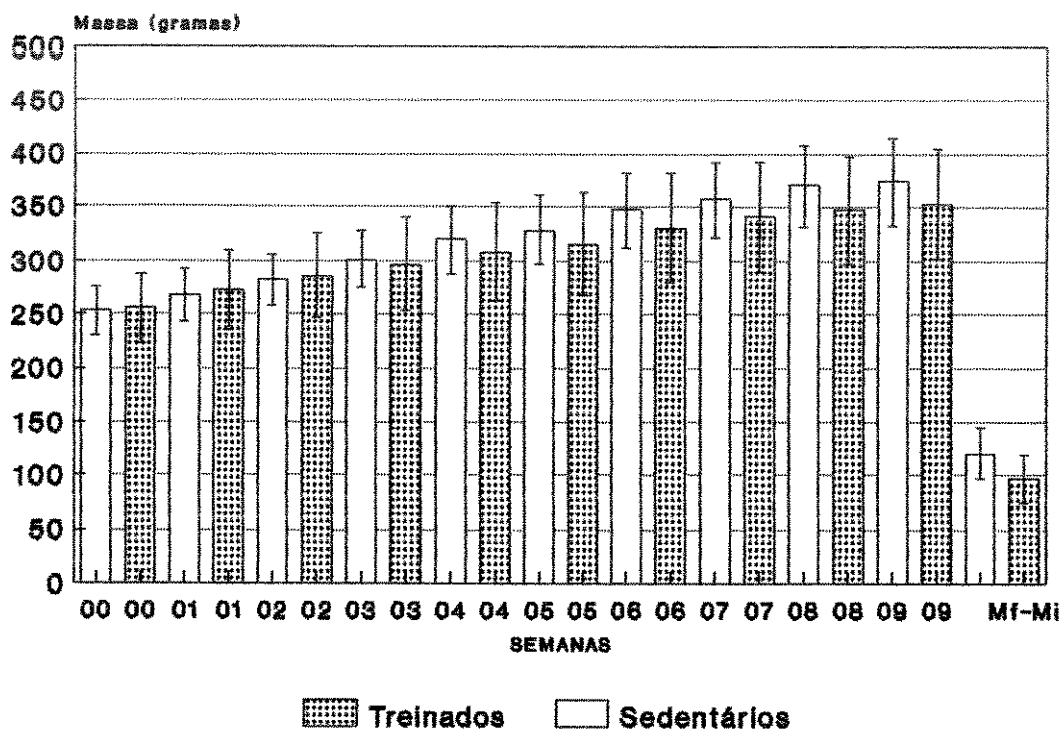


FIGURA 4.1 - Variação semanal da massa corporal (g) de 11 ratos sedentários - SED (controles) e de 09 ratos treinados - TRE, durante o período experimental. As barras verticais representam o desvio padrão da média.

4.1.1 - Relação entre a Massa das Amostras e a Massa Corporal

A análise entre a massa úmida das amostras de corações e de músculos gastrocnêmios dos animais foi realizada imediatamente após a dissecação. Para a razão entre a massa das amostras e a massa corporal, tomou-se a massa corporal do dia anterior da última sessão de treinamento físico, antes do sacrifício. Vide Tabelas 4.3, 4.4 e Anexo 02.

A análise estatística da relação entre a massa das amostras e a massa corporal não revelou significância entre estes resultados.

TABELA 4.3 - Relação entre a massa das amostras e a massa corporal de 19 ratos sedentários - SED (controles), após o sacrifício.

	M	DP	R	DF
Coração	1,09	0,1394	-	-
Gastrocnêmio	1,90	0,4009	-	-
Corpo	373,05	45,3118	-	-
Coração/Corpo	-	-	294,89	0,4005
Gastrocnêmio/Corpo	-	-	512,68	0,9763

TABELA 4.4 - Relação entre a massa das amostras e a massa corporal de 17 ratos treinados - TRE, após o sacrifício.

	M	DP	R	DF
Coração	1,14	0,1572	-	-
Gastrocnêmio	1,70	0,3584	-	-
Corpo	393,17	68,6779	-	-
Coração/Corpo	-	-	297,23	0,4708
Gastrocnêmio/Corpo	-	-	449,35	1,3037

M = Médias das massas das amostras e corporal (g)

DP= Desvio Padrão

R = Médias da relação : massa amostras/corporal (mg/100g)

4.2. Análise Histológica dos Músculos Gastrocnêmios

A Tabela 4.5 e as Figuras 4.2, 4.3 e 4.4 indicam as médias das áreas das secções transversais das fibras musculares (músculo gastrocnêmio), revelando um aumento significativo ($p \leq 0,05$) nas áreas das fibras referentes aos grupos dos animais treinados, quando comparados aos animais sedentários.

TABELA 4.5 - Médias das Áreas das secções transversais das fibras musculares do ventre medial, do músculo gastrocnêmio de ratos sedentários e treinados. Valores expressos como média e desvio padrão. * Diferença significativa ($p \leq 0,05$) quando comparados com o grupo dos sedentários.

	N	Area (μm^2)
Sedentários	80	4393,30 $\pm$ 522,0
Treinados *	80	5200,00 $\pm$ 608,6

N = Número de Ratos

t = 8,999 *** (altamente significativo)

Para 158 GL

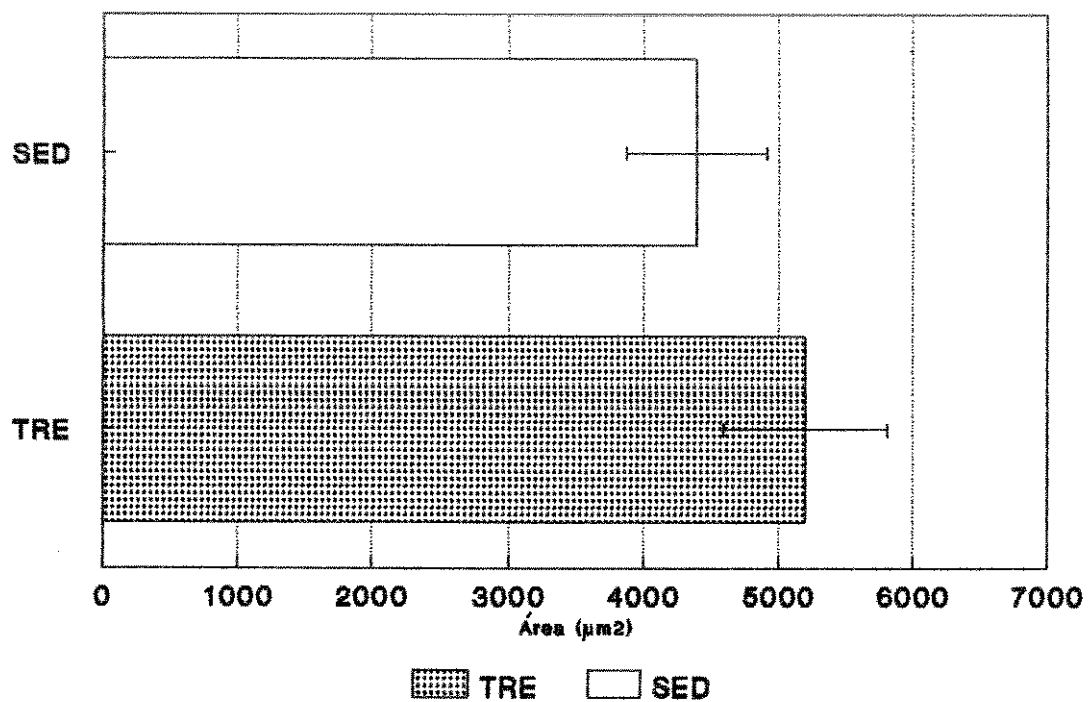


FIGURA 4.2 - Média das áreas das fibras dos músculos gastrocnêmios de ratos sedentários e treinados.

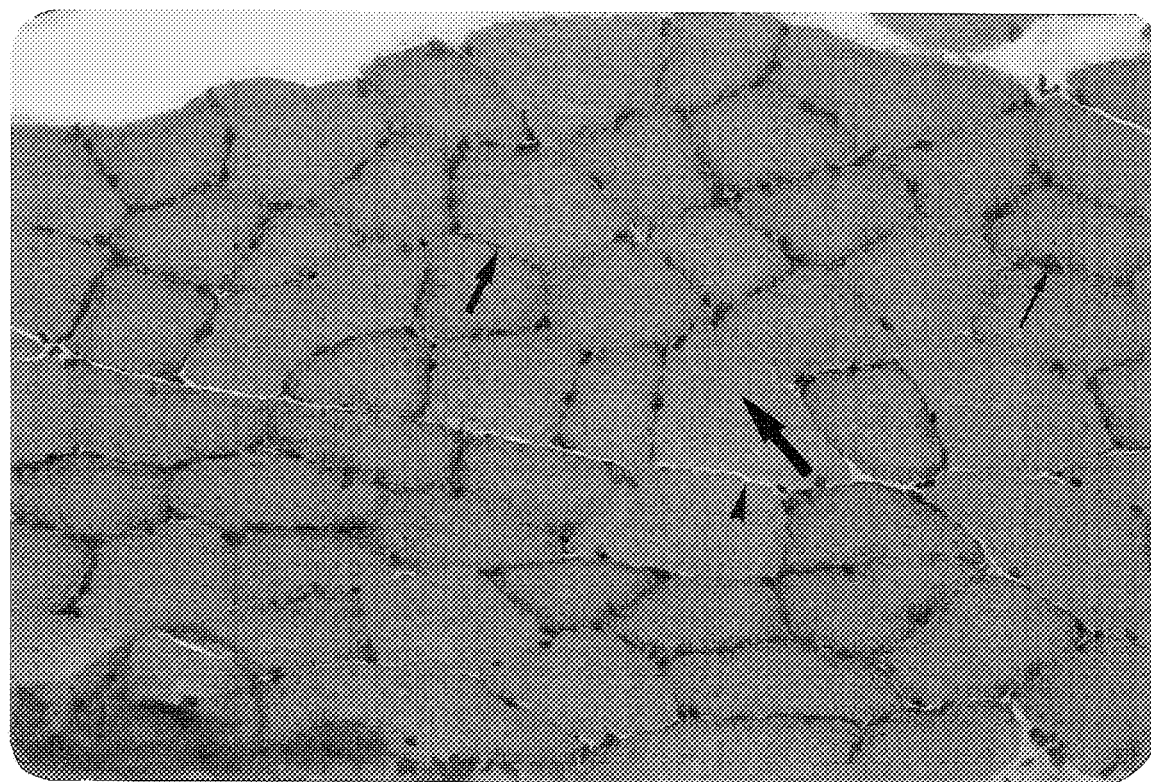


FIGURA 4.3 - Fotomicrografia de corte transversal do ventre medial do músculo gastrocnêmio de rato sedentário, corado por H/E. 275 X. Fibras musculares e miofibrilas (seta maior); endomísio (seta média); núcleo fibrilar (seta pequena) e perimísio (cabeça de seta).

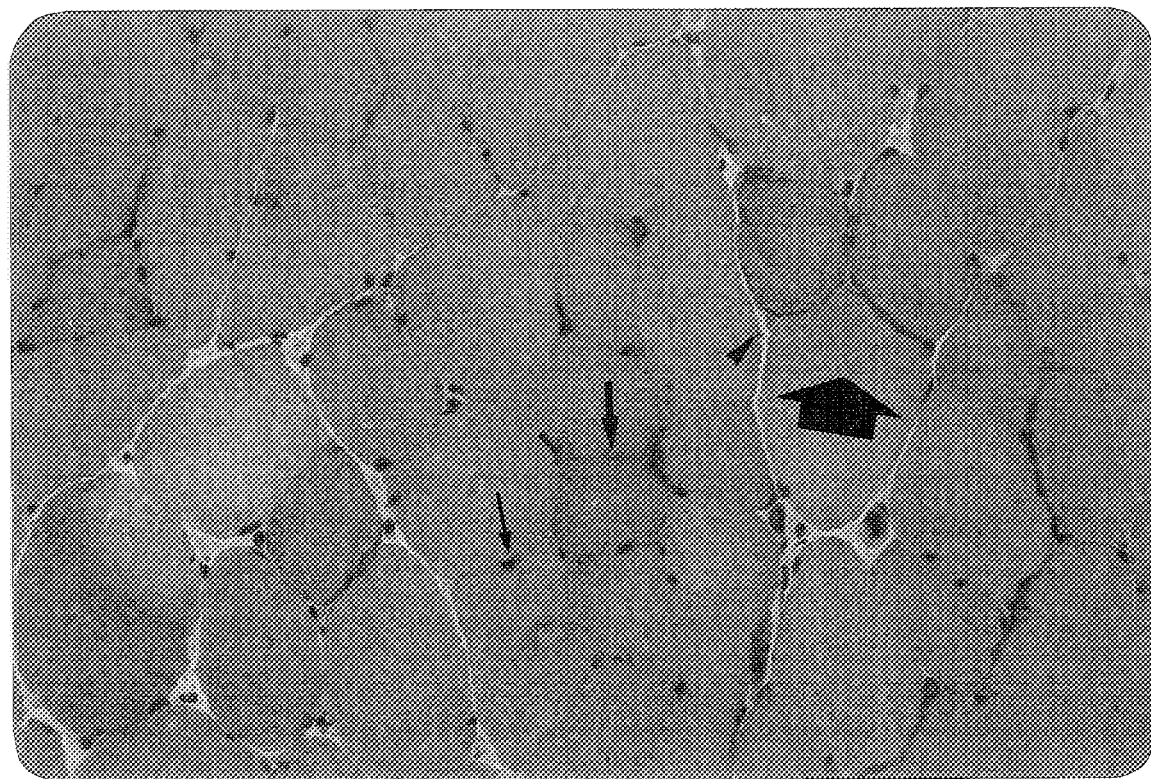


FIGURA 4.4 - Fotomicrografia de corte transversal do ventre medial do músculo gastrocnêmio de rato treinado, corado por H/E, 275 X. Fibras musculares e miofibrilas (seta maior); endomísio (seta média); núcleo fibrilar (seta pequena) e perimísio (cabeça de seta).

4.3. Conteúdo de HA dos Músculos Gastrocnêmio e Cardíaco de Ratos Sedentários (SED) e Treinados (TRE) em Repouso e após o Exercício Agudo de Natação (A).

As concentrações de HA obtidas das amostras de animais sedentários (controles) e treinados, mantidos em condições de repouso (SED-R; TRE-R) e exercitados agudamente (SED-A; TRE-A), para ambos os tecidos musculares pesquisados, estão representadas nas respectivas Tabelas 4.6 e 4.7 e nas Figuras 4.5 e 4.6.

4.3.1 Conteúdo de HA no Músculo Gastrocnêmio

A análise estatística das médias das concentrações de HA, obtidas de amostras de músculo gastrocnêmio, estão representadas na Tabela 4.6 e na Figura 4.5. Observa-se, em animais sedentários - repouso (SED-R), que a média de concentração de HA encontrada ($2,46 \pm 0,2444$) foi menor que a deste grupo de animais, quando exercitados agudamente ($3,06 \pm 0,6343$) ($p < 0,05$).

Nos grupos treinados, seguindo a mesma relação anterior, nota-se que, embora a média de concentração de HA encontrada no grupo treinado-repouso (TRE-R) ($2,53 \pm 0,4831$) fosse pouco menor, quando comparada à dos animais exercitados agudamente (TRE-A) ($2,83 \pm 0,5230$), não houve significância estatística nesse grupo.

Estes valores indicam que houve maior liberação de HA no músculo gastrocnêmio de animais sedentários, quando submetidos ao exercício agudo * (* valor significativo), em relação aos animais deste

grupo, que permaneceram em repouso. Por outro lado, não foi significativo o aumento de concentração da HA no grupo TRE-A, em relação ao grupo TRE-R. Também foi avaliada a relação entre os grupos SED-R com o TRE-R e SED-A com o TRE-A, não encontrando diferença estatisticamente significativa entre eles.

4.3.2. Conteúdo de HA no Músculo Cardíaco

A análise estatística das médias das concentrações de HA, obtidas de amostras de músculo cardíaco, estão representadas na Tabela 4.7 e na Figura 4.6. Observa-se em animais sedentários-repouso (SED-R), que a média de concentração de HA encontrada ($2,15 \pm 0,3505$) foi, ao contrário do músculo esquelético, maior que a deste grupo de animais, quando exercitados agudamente ($1,43 \pm 0,3164$) ($p \leq 0,05$).

Nos grupos treinados, seguindo a mesma relação anterior, nota-se que a média de concentração de HA encontrada no grupo treinado-repouso (TRE-R) ($1,42 \pm 0,6130$) foi menor quando comparada à dos animais treinados, exercitados agudamente (TRE-A) ($1,78 \pm 0,8108$) ($p \leq 0,05$).

Estes valores indicam que houve menor liberação de HA no músculo cardíaco de animais SED-A * (valor significativo), em relação aos animais deste grupo, mantidos em repouso. Por outro lado, quando foram relacionados os grupos SED-R com o TRE-R e SED-A com o TRE-A, foi também significativa a diminuição da concentração de HA no grupo TRE-R * ($1,42 \pm 0,6130$), em relação ao grupo SED-R ($2,15 \pm 0,3505$) ($p \leq 0,05$).

TABELA 4.6 - Concentração de HA do músculo gastrocnêmio, de ratos sedentários, sacrificados a partir do repouso (SED-R) e após 60 minutos de exercício agudo de natação, com carga equivalente a 8% do peso corporal (SED-A), e de ratos treinados em repouso (TRE-R) e após exercício agudo de natação (TRE-A), nas mesmas condições. Resultados expressos como média e desvio padrão. * Diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo repouso.

GRUPOS	N	HISTAMINA ($\mu\text{g/g}$)
SED-R	15	2,46 $\pm$ 0,2444
SED-A*	13	3,06 $\pm$ 0,6343
TRE-R	10	2,53 $\pm$ 0,4831
TRE-A	21	2,83 $\pm$ 0,5230

SED-A vs SED-R; onde $t = 3,210$ ** $> 2,056$; $p \leq 0,05$ para 26 GL.

TRE-A vs TRE-R (NS)

SED-A vs TRE-A (NS)

SED-R vs TRE-R (NS)

N = Número de indivíduos (ratos)

NS = Resultados não-significativos

GL = Graus de Liberdade

TABELA 4.7 - Concentração de HA do músculo cardíaco, obtida de ratos sedentários, sacrificados a partir do repouso (SED-R) e após 60 minutos de exercício agudo de natação, com carga equivalente a 8% do peso corporal (SED-A), e de ratos treinados em repouso (TRE-R) e após exercício agudo de natação (TRE-A), nas mesmas condições. Resultados expressos em média e desvio padrão. * Diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo sedentário-repouso.

GRUPOS	N	HISTAMINA ($\mu\text{g/g}$)
SED-R	08	2,15 $\pm$ 0,3505
SED-A*	10	1,43 $\pm$ 0,3164
TRE-R*	07	1,42 $\pm$ 0,6130
TRE-A	10	1,78 $\pm$ 0,8108

SED-A vs SED-R; onde $t = 4,520$; $p \leq 0,05$ para 16 GL.

TRE-A vs TRE-R (NS)

SED-A vs TRE-A (NS)

SED-R vs TRE-R; onde $t = 1,016$ (NS) $< 2,131$;

U min = 7,5 ** $< 9,0$; $p \leq 0,05$ para 13 GL

N = Número de indivíduos (ratos)

NS = Resultados não-significativos

GL = Graus de Liberdade

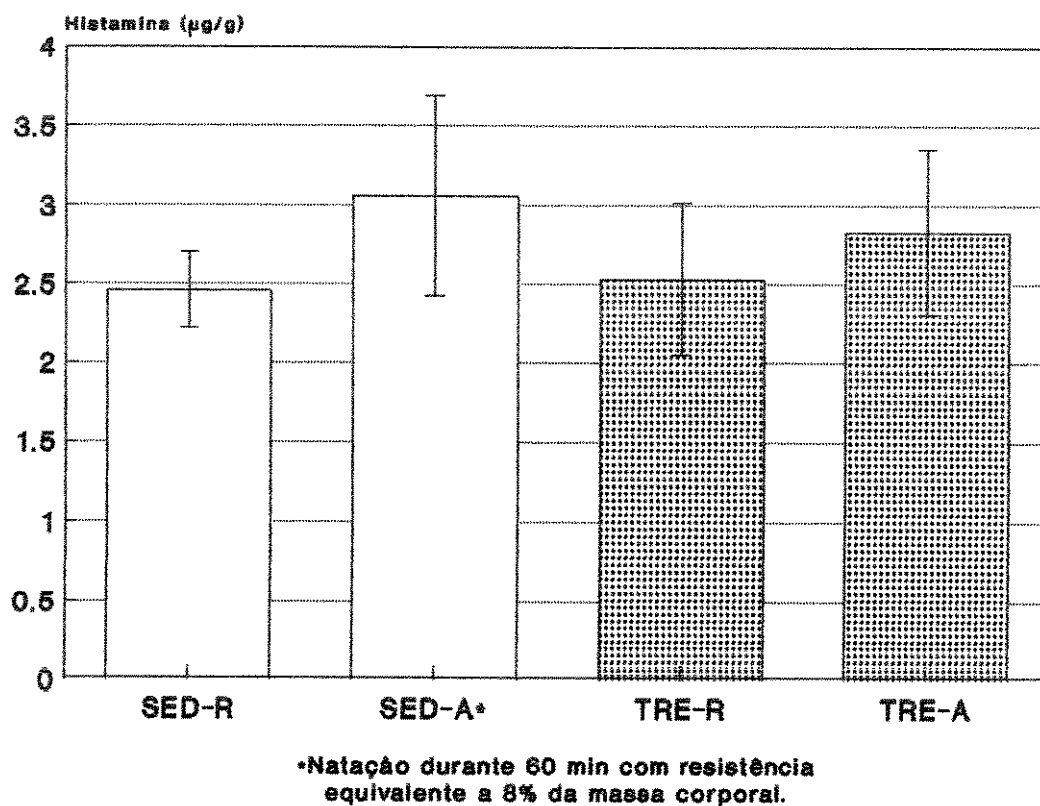
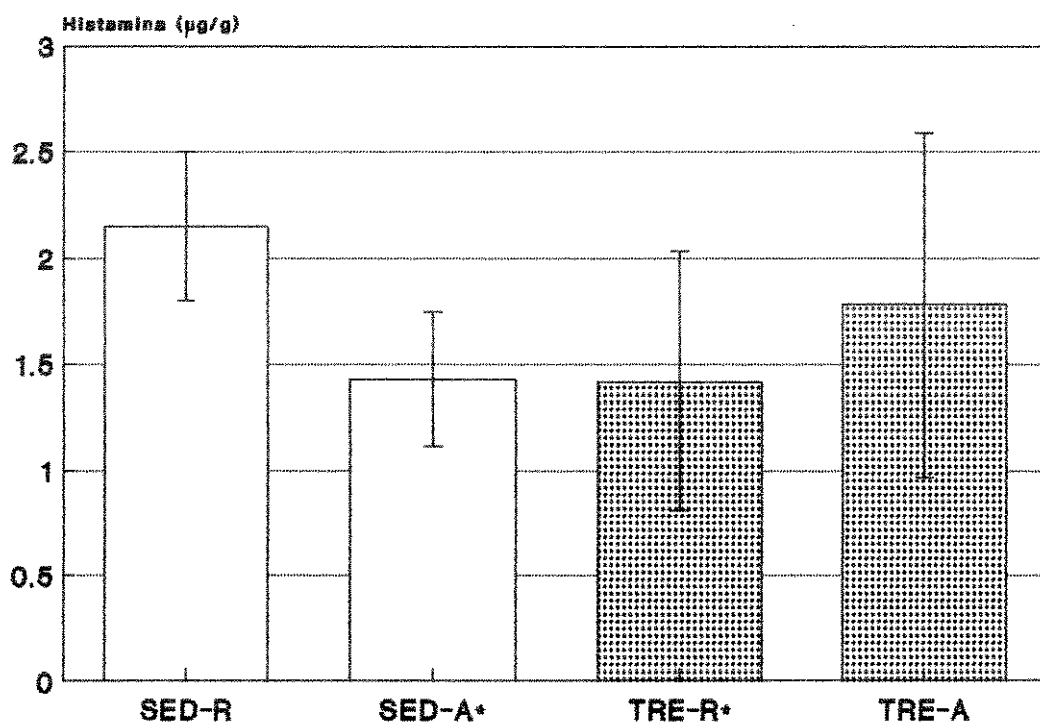


FIGURA 4.5 - Conteúdo histamínico do músculo gastrocnêmio de ratos sedentários e treinados a partir do repouso e após o exercício agudo de natação.



*Natação durante 60 min com resistência equivalente a 8% da massa corporal.

FIGURA 4.6 - Conteúdo histamínico do músculo cardíaco de ratos sedentários e treinados, a partir do repouso e após o exercício agudo de natação.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1. METODO

As primeiras técnicas empregadas para se estimar o teor histamínico dos tecidos baseavam-se na atividade biológica da HA em órgãos isolados, tais como íleo de cobaia (BARSCUM & GADDUM, 1935; McINTIRE, 1966; VUGMAN & ROCHA e SILVA, 1966). Mais tarde, foi usada a técnica do ensaio colorimétrico, baseada no tratamento da HA com sal diazônico (ROSENTHAL & TABOR, 1948; SAWICKI et alii, 1970) ou dinitrofluorobenzeno (McINTIRE, WHITE & SPROUL, 1950; LOWRI et alii, 1954).

A opção pela técnica do ensaio fluorimétrico (SHORE et alii, 1959), visando estimar o teor histamínico dos tecidos musculares pesquisados, baseou-se no fato de ser uma técnica simples e precisa, continuamente aperfeiçoada no sentido de se tornar mais sensível, reprodutível e específica.

Embora o método original preconizasse a utilização de amostras com peso em torno de 1 grama, homogeneizadas em 9 ml de ácido perclórico 0,4 N, foram utilizadas amostras de peso entre 1 e 2 gramas em 12 ml daquele ácido (PEREIRA, 1981), empregando homogeneizador elétrico, ao invés de areia lavada na homogeneização. O aumento do volume do solvente permitiu uma melhor homogeneização, para amostras de maiores massas, sem alteração sensível na concentração do homogeneizado, devidamente corrigida. Por outro lado, a utilização de amostras de tecido de pesos variáveis (entre 1 e 2 gramas) e do homogeneizador elétrico permitiram a realização de uma pesagem e de uma homogeneização mais rápidas, evitando as

influências do meio ambiente (temperatura, umidade relativa do ar, pressão, entre outras) sobre as frações de cada tecido muscular empregado. Desta forma, em concordância quanto ao uso do homogeneizador elétrico, empregado rotineiramente por SHORE et alii (1959), ANTON & SAYRE (1968) e HAKANSON et alii (1972), encontramos em ambos os tecidos musculares pesquisados, de animais-controles, um teor de HA de acordo com aqueles achados por FELDBERG & TALESNIK (1953).

Em desacordo com o preconizado por SHORE et alii (1959), foi empregada, para cada análise, uma alíquota de 3 ml e não de 4 ml, do homogeneizado tecidual (PEREIRA, 1981). Contudo, este volume de 4 ml era restabelecido quando se acrescentava 1 ml de ácido clorídrico 0,1 N no primeiro balão de ensaio (b 1), contendo a solução-problema, ou 1 ml de ácido clorídrico 0,1N, levando 2 µg de HA dissolvidos, em cada "balão de recuperação".

Embora NOAH & BRAND (1961) houvessem introduzido a utilização do OPT a 0,1 % em metanol, ao invés de 1 % , como no método original, optamos pela concentração de 0,2 % (0,08 mg/ml na solução reagente), considerada ótima por HAKANSON et alii (1972). Estes autores, testando a solução a 0,1 % e comparando os resultados obtidos com a solução a 0,2%, observaram que, na primeira, a intensidade de fluorescência da HA se reduzia em cerca de 10%, enquanto, na segunda, mantinha-se inalterada (em relação à solução de OPT a 1% em metanol). Além disso, com a solução a 0,2%, a intensidade de fluorescência do branco decaía para menos da metade, sem prejuízo nos ganhos de reprodutibilidade do método, fato já apontado por REDLICK & GLICK (1965) quando estudaram o ensaio com

solução a 0,1% .

A alcalinidade do meio em que deve ocorrer a condensação da HA com o OPT é muito importante. Trabalhamos com pH em torno de 12,6, que se encontra dentro da faixa observada como ótima (12,4 a 12,7) por HAKANSON et alii (1972), com respeito à intensidade de fluorescência.

Outra preocupação dos pesquisadores era conseguir a estabilidade do fluoróforo com alta sensibilidade, ou seja, com intensa fluorescência. SHORE et alii (1959) haviam conseguido boa estabilidade, acidificando o meio a um pH de aproximadamente 0,8. No entanto, KREZNER & WILSON (1961) conseguiram aumentar a sensibilidade em relação ao método original, trazendo o pH a valores entre 2 e 4. Posteriormente, HAKANSON et alii (1972) verificaram que a faixa de variação do pH para a estabilização da fluorescência dependia do ácido utilizado. Com a utilização do ácido cítrico, a intensidade ótima de fluorescência era obtida com pH entre 2 e 3,5; com ácido sulfúrico, com pH entre 2 e 7.

Optamos pela utilização do ácido cítrico 2 M, de acordo com as sugestões de ANTON & SAYRE (1968), que verificaram ser estável a intensidade de fluorescência quando este ácido é empregado na reação de condensação, mesmo com alguma variação de volume. Não utilizamos o ácido fosfórico, conforme preconizado por KREZNER & WILSON (1961), devido a sua grande capacidade tamponante. Já HAKANSON et alii (1972) propõem o emprego do ácido sulfúrico, além do ácido cítrico.

A preparação do branco é fundamental, pois do seu processo de obtenção dependerão os níveis histamínicos encontrados. O "branco reverso", utilizado no ensaio original, era conseguido, tratando-se com OPT uma das soluções originadas dos tecidos pesquisados, porém

após a acidificação final. Seus preconizadores acreditavam que nestas condições apenas a HA deixaria de fluorescer. Entretanto, foram constatados materiais que reagem com o OPT em meio alcalino, provocando fluorescência não específica, mas que não o fazem em solução ácida. Deste modo, o "branco reverso" daria uma leitura baixa de fluorescência não específica, conduzindo à estimação de valores falsos para a quantificação da HA (ATAACK, 1977). Diante destes fatos, decidimos preparar um reagente branco em que o extrato tecidual era substituído por ácido perclórico 0,4 N, homogeneizado e centrifugado. Análogo ao que se fazia com ambos os tecidos, 3 ml do sobrenadante eram tomados e seguia-se com o procedimento normal, preconizado por SHORE et alii (1959).

A opção pelo método fluorimétrico nos proporcionou excelentes condições para a quantificação histaminica muscular, o que será relatado nos resultados experimentais discutidos a seguir.

No cálculo da concentração de HA nas amostras, aplicamos sobre a fórmula II duas multiplicações referentes às diluições sofridas pela amostra antes de passar pelo balão b1 (primeira etapa do ensaio fluorimétrico), onde se iniciava a extração da HA. A primeira diluição obedeceu à equação (III) :

$$FD = \frac{[Vap] \text{ ml} + [Va'] \text{ ml}}{[Ma] \text{ g}}$$

O Va' referia-se ao volume da amostra dos músculos cardíaco e

gastrocnêmio, para extração e dosagem da HA.

Acreditamos que a metodologia aplicada para o cálculo do volume da amostra possa ter apresentado alguma forma de erro, constante para todas as amostras, o que consideramos insignificante em relação ao erro que existiria, estabelecendo-se a mesma proveta e uma densidade fixa para cada tipo de amostra muscular pesquisada.

5.2 ETAPAS EXPERIMENTAIS

5.2.1. Animais, Grupos Experimentais e Treinamento Físico

Foram utilizados ratos em idade adulta, porque esta é uma espécie que apresenta HFC nos tecidos investigados, resultante da contração muscular (GRAHAM et alii, 1964; HAKANSON, 1965).

Vários trabalhos utilizaram fármacos para induzir alterações provocadas ou não pelo teor histamínico "in vitro". Optou-se pela determinação do conteúdo de HA muscular dentro da maior proximidade ao estado fisiológico. A natação foi adotada como forma de treinamento físico prolongado, visando obter maior hipertrofia muscular, menor índice de "stress" emocional no animal (YAKOVLEV, 1975; OSTMAN-SMITH, 1979) e minimizar contradições entre os resultados. Este treinamento foi iniciado no rato jovem, com 60 dias de idade. A duração de 45 dias de treinamento com resistência dorsal teve por objetivo evitar que o treinamento se prolongasse, que o animal adquirisse uma idade avançada e que houvesse êxito com relação à hipertrofia muscular, no menor tempo

possível. Para isto, foi realizado um período de adaptação ao exercício físico prolongado, com cargas e tempos progressivos, até alcançar uma resistência equivalente de 8 a 10% do peso corporal, e período de tempo de 60 minutos de duração.

HOLMER & BERGH (1974) pesquisaram a existência de diferenças individuais na perda de calor durante a natação, em várias temperaturas. Nesta linha de pesquisa, GREEN et alii (1976) estudaram os efeitos centrais da HA na termorregulação de ratos e constataram que há pelo menos dois sítios para receptores de HA no sistema nervoso central (SNC), envolvidos na função termorregulatória.

Em ampla revisão, NOBLE (1992) estudou o aumento da "performance mecânica" de músculo estriado durante a contração. Em considerações energéticas de produção de calor e consumo de ATP, concluiu-se que, embora um aumento na temperatura pudesse ser decorrente da taxa metabólica elevada pelo trabalho muscular, este fator resultaria em decréscimo de força muscular.

A temperatura da água era mantida em torno de $31^{\circ}\text{C} \pm 1$, em concordância com MAGEL et alii (1969), HOLMER & BERGH (1974), SAGAWA et alii (1988) e DELIGIANNIS et alii (1992) que realizaram experimentos com nadadores e WADA et alii (1991), com ratos. A fim de não comprometer a força muscular do animal (NOBLE, 1992), não houve reaquecimento da água do tanque durante a sessão de natação.

O animal não retornava à sua gaiola-moradia enquanto não estivesse completamente seco. Este procedimento evitava qualquer patologia que pudesse interferir no resultado experimental.

Foram tomadas precauções para que o animal que obtivesse

oscilação semanal da massa corporal treinasse com a resistência dorsal de valor diferente do estipulado, ou seja, 8% da massa corporal do animal. A resistência dorsal de chumbo era reavaliada e adaptada semanalmente para cada animal, antes do início da sessão do treinamento. WILTERDINK et alii (1992) comprovaram a perda de peso dos animais treinados com natação, de até 11% em relação aos animais sedentários. A resistência dorsal de chumbo visava evitar que o animal flutuasse durante a natação, apesar do impedimento natural causado pela turbulência da água gerada por 10 ratos nadando simultaneamente no mesmo tanque (OSTMAN-SMITH, 1979).

Baseado nos efeitos fisiológicos primitivos da HA (SCHAYER, 1960 a,b; 1962 b), e nos efeitos comumente relevantes à regulação local da reação inflamatória (GARRISON & RALL, 1990), foi investigada a associação desta amina biogênica às trocas microcirculatórias nos tecidos musculares pesquisados, durante o repouso e no exercício de curta e de longa duração, condições não patológicas, motivo de esquematização dos grupos experimentais propostos.

Devido ao tipo de treinamento físico empregado, a natação, foi conveniente realizar todas as sessões de treinamento durante o período de outubro a março. Desta forma, dosagens histamínicas foram realizadas no período anual de temperaturas mais baixas, evitando demasiada volatilização dos reagentes empregados.

Foram utilizados dois tipos de tecidos musculares, esquelético (músculo gastrocnêmio) e cardíaco, visando maior especificidade de resultados, baseados nos efeitos fisiológicos que produzem e também para ser compatível com o método empregado (anteriormente citado).

5.2.2. Variação semanal da massa corporal durante o programa de treinamento físico.

O estudo da variação semanal da massa corporal de animais SED e TRE demonstrou que, apesar da escolha aleatória de animais de maior massa corporal para o grupo TRE, antes do início do programa adotado, foi a partir da terceira semana de treinamento que se verificou o menor ganho de peso dos animais TRE, em relação aos animais SED. A análise de variância por coeficientes ortogonais revelou que houve alta significância estatística na diferença entre os dois grupos, não havendo paralelismo entre eles ($p \leq 0,05$).

5.2.3 Relação entre a Massa das Amostras e a Massa Corporal

BIGARD et alii (1991) pesquisaram os efeitos da hipóxia crônica e do treinamento físico prolongado nos capilares de músculo esquelético de ratos. Dentre os resultados obtidos pelo programa de treinamento físico empregado (natação) e pela exposição em altitude simulada, houve significativa perda de peso corporal e aumento da razão "número de capilar por fibra muscular". O resultado desta razão era ainda maior quando decorrente do treinamento em um ambiente hipobárico.

De acordo com as tabelas 4.3 e 4.4 e com a análise estatística (Anexo 02), não foram encontradas diferenças significativas entre as massas corporais e das amostras, obtidas após o sacrifício. Da mesma forma, não houve significância estatística entre as relações das amostras com a massa corporal. De modo contrário, foi

altamente significativa a variação da massa corporal em animais SED e TRE, quando se descontaram as semanas e os ratos no decorrer do treinamento (vide discussão 5.2.2).

5.2.4 Exame Microscópico

GOLLNICK et alii (1972) diferenciaram a atividade enzimática e a composição das fibras do músculo esquelético de indivíduos treinados e sedentários. Entretanto, BARNARD et alii (1970) já haviam relatado que o treinamento físico aumentava a porcentagem de fibras musculares vermelhas, em relação às brancas, no músculo esquelético de cobaias. Na época, ainda não havia muitos estudos sobre as características metabólicas, a composição da fibra muscular no homem treinado e sedentário, e sobre a forma de se relacionarem essas fibras musculares ao treinamento.

SALTIN et alii (1977), ao estudarem o suprimento capilar de músculos esqueléticos em indivíduos sedentários e maratonistas, correlacionaram o aumento do número de capilares por fibra com o aumento do nível de atividade muscular. Dentre as adaptações decorrentes do treinamento físico prolongado, com resistência, TESCH (1988) observou aumento da síntese de proteína miofibrilar e da área de secção transversal muscular, hipertrofia das fibras de contração rápida e decréscimo das densidades mitocondrial e capilar.

Assim como o estudo da variação semanal da massa corporal mostrou ser fator auxiliar na comprovação do treinamento físico empregado, o exame histológico comprovou a eficácia da natação como treinamento físico.

O aumento das áreas de secção transversal das fibras do músculo gastrocnêmio dos animais treinados, em relação aos sedentários, pôde ser considerado um sinal de moderada hipertrofia deste músculo, frente ao exercício prolongado aplicado aos animais. Também pôde ser considerada positiva a escolha do músculo gastrocnêmio para a determinação da HA, nesta modalidade de exercício.

5.2.5 Concentração de Histamina nos Tecidos Musculares :

- Cardíaco
- Gastrocnêmio

Apesar das modificações técnicas ressaltadas, obtivemos médias de concentrações de HA para os músculos cardíaco e gastrocnêmio, em animais sedentários submetidos ao repouso (controles), entre os valores 1,7 - 2,5 µg/g e 2,2 - 3,0 µg/g, respectivamente, conforme os achados de FELDBERG & TALESNIK (1953).

Em músculos gastrocnêmios, não foi encontrada diferença significativa de concentração entre os níveis de HA de animais-controles, sacrificados a partir do repouso (SED-R), quando comparados aos animais treinados e mantidos nesta condição (TRE-R). Em músculo cardíaco, foi estatisticamente significativa uma redução do nível basal HA no grupo TRE-R em relação ao grupo SED-R ($p \leq 0,05$). Acredita-se que uma provável hipertrofia cardíaca, provocada pelo treinamento físico, possa ter induzido proliferação microcirculatória tecidual (SALTIN et alii, 1977; BIGARD et alii, 1991), e esta, por sua vez, metabolize a HA mais rapidamente que no tecido muscular esquelético. Segundo HOLCSLAW et alii

(1984), a HA liberada na circulação pode ser removida pelo próprio músculo liso do tecido vascular. Como foi estudado, no coração a função desta amina é induzir arritmia ventricular (TRZECIAKOWSKI & LEVI, 1982; DAI, 1991). Encontramos, no grupo adaptado ao treinamento físico, valores basais de HA em concentrações inferiores ao do grupo sedentário, no repouso.

O aumento da concentração da HA em gastrocnêmios no grupo SED-A, em comparação ao grupo controle SED-R ($p \leq 0,05$) foi significativo, conforme mostram a tabela 4.6 e a figura 4.5. Nossos resultados estão de acordo com a literatura em relação ao envolvimento da HA no processo fisiológico de vasodilatação, provocado pelo exercício agudo de natação em ratos (ANREP & BARSOUM, 1935; SCHAYER, 1952; SCHAYER & GANLEY, 1959; SCHAYER, 1960, a,b; 1962, a; 1963; REILLY & SCHAYER, 1970, 1971 a,b; OWEN et alii, 1982).

Foi observado ainda que, em músculos gastrocnêmios, este aumento da concentração de HA no grupo SED-A foi mais acentuado que o do grupo TRE-A. Acredita-se que, após o animal sedentário sofrer um esforço físico não-habitual, esta substância possa exercer um controle a curto prazo mais efetivo na microcirculação deste tecido.

No coração, ao contrário do tecido muscular esquelético pesquisado, houve redução dos níveis basais de HA encontrada no coração dos grupos SED-A e TRE-R em comparação com o grupo controle SED-R ($p \leq 0,05$). Estes resultados concordam com os achados de VIDRIO & FRIDLA (1990), DAI (1991), PEARCE (1991) e outros autores que enumeraram os efeitos biológicos da HA no sistema cardiovascular. Desta forma, acredita-se que a concentração de HA no coração do grupo SED-A diminua, por se tratar de um fator protetor de possível arritmia cardíaca a curto prazo, no exercício agudo com

resistência. Contudo, encontramos no coração do grupo TRE-A, níveis de HA mais elevados que os do grupo SED-A. Talvez devido à maior exigência decorrente do esforço físico, maior concentração de HA tenha sido liberada da provável hipertrofia cardíaca tecidual, induzida pelo treinamento físico prolongado - HFC (GRAHAM et alii, 1964).

Em relação aos animais treinados, submetidos ao exercício agudo de natação com resistência, no músculo gastrocnêmio, foi observado que as concentrações de HA não se apresentaram elevadas. Este fato se deve provavelmente a um aumento da capacidade de remoção da HA, induzida pela maior capacidade de captação e metabolização, desenvolvida pela musculatura lisa vascular deste tecido (HOLCKSLAW et alii, 1984). Uma segunda hipótese seria a existência de outras substâncias vasoativas envolvidas no controle local do fluxo sanguíneo dos músculos esqueléticos dos animais treinados, que poderiam oferecer um impedimento à liberação de HA (STAINSBY, 1973; GREEN, 1990). Para o tecido cardíaco em animais treinados, submetidos ao exercício agudo, as concentrações de HA apresentaram-se elevadas, mostrando talvez um atraso nesta captação e metabolização. Poderia haver no coração um número suficiente de outras substâncias vasoativas para competir com a HA.

Desta forma, tendo como valores significativos o aumento da liberação de HA em músculos gastrocnêmios de animais sedentários submetidos ao exercício agudo e a diminuição da mesma em corações de animais do mesmo grupo e no grupo TRE-R, em relação aos respectivos controles, esta substância parece corresponder aos ajustes do estado vascular tecidual a que é encontrado. Ora aumentando a concentração e favorecendo a possível vasodilatação do tecido muscular esquelético

onde é encontrada (WENNMALIN & PETERSON, 1991), ora prevenindo o coração de possível arritmia ventricular, principalmente em animais sedentários submetidos a esforços não-habituais (TRIGGIANI et alii, 1985).

Finalmente, nos animais treinados, com relação ao exercício agudo de natação, as devidas adaptações circulatórias foram realizadas no decorrer do treinamento, não havendo necessidade de liberação de HA tão acentuada para músculos gastrocnêmios. Para o tecido cardíaco pôde ter havido um aumento da concentração de HA devido à provável hipertrofia tecidual cardíaca, desenvolvimento da microcirculação tecidual, demora ou atraso na metabolização da HA e/ou menor número de substâncias vasoativas competitivas.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSOES

1. O exame histológico e o estudo da variação semanal da massa corporal comprovaram a eficácia do protocolo do treinamento físico de natação adotado. A histologia revelou hipertrofia moderada nas amostras de músculos gastrocnêmios;
2. em animais-controles, o teor de HA de ambos os tecidos musculares pesquisados concordou com a literatura, positivando as modificações técnicas adotadas;
3. o exercício agudo de natação (60 min) elevou o conteúdo histamínico nas amostras de gastrocnêmios de animais sedentários, mas este valor foi inferior nas amostras de corações de animais deste grupo quando comparados aos animais controles;
4. nos grupos submetidos ao treinamento físico, as amostras pesquisadas não mostraram oscilações significativas no conteúdo de HA, decorrentes do exercício agudo, exceto no coração do grupo TRE em repouso (24 horas), que apresentou valores basais de HA inferiores aos corações dos animais SED em repouso;
5. estes resultados sugerem que a HA pode participar da homeostasia microcirculatória de músculos esqueléticos e corações de ratos sedentários durante o exercício agudo de natação e de corações de ratos treinados em repouso.

7. RESUMO

7. RESUMO

Detectou-se o conteúdo histamínico nos tecidos muscular-esquelético (músculo gastrocnêmio) e cardíaco de ratos sedentários (controles). Estes índices foram comparados aos de animais treinados, sacrificados, respectivamente, a partir da condição de repouso e após 60 minutos de exercício agudo de natação em que ambos os grupos (sedentários - SED e treinados - TRE) foram submetidos.

Para esta finalidade, foram utilizados 94 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, distribuídos em grupos assim esquematizados :

- 1 - SED-R : Animais mantidos em condições sedentárias;
- 2 - SED-A : animais mantidos em condições sedentárias, que realizaram 60 minutos de exercício agudo de natação, imediatamente antes do sacrifício;
- 3 - TRE-R : animais que realizaram o treinamento de natação com resistência (8% do peso corporal), 60 min/dia, 5 dias/semana, durante 45 dias, mantidos em repouso de 24 horas após a última sessão de natação, até o sacrifício;
- 4 - TRE-A : animais que realizaram o mesmo treinamento do grupo anterior e que se submeteram a 60 minutos de exercício agudo de natação, imediatamente antes do sacrifício.

Após o sacrifício por decapitação em guilhotina, foram dissecados e pesados o coração e os músculos gastrocnêmios de ambos os membros inferiores, para a determinação do teor de histamina (HÁ), por meio de análise fluorimétrica, e para o exame histológico (H/E).

Os resultados obtidos permitiram concluir que houve moderada hipertrofia nas amostras de músculo gastrocnêmio de ratos submetidos ao treinamento físico adotado. A HÁ pode participar da homeostasia microcirculatória de músculos esqueléticos e corações de ratos sedentários durante o exercício agudo de natação e de corações de ratos treinados em repouso.

8. ABSTRACT

8. ABSTRACT

Dynamic physical exercise and those realised in long time can result in an elevation of histamine (HA) level in blood and other tissues, besides of classic hormones. This research compared the HA levels in gastrocnemius and cardiac muscles of rest rats (controls) with the same muscles on physical exercise : short term (SRG-SRC) and long-term swimming (T). The efficacy of long-term swimming was confirmed by histologic method (H/E). The determination of the HA levels was done by fluorimetric assay. Regarding the short-term exercise, the increase of the HA level in SRG $3,06 \pm 0,6343 \mu\text{g/g}$ (N= 13) and the decrease of its basal levels in SRC $1,43 \pm 0,3164 \mu\text{g/g}$ (N= 10) in comparison with respective controls $2,46 \pm 0,2444 \mu\text{g/g}$ (N= 15) and $2,15 \pm 0,3505 \mu\text{g/g}$ (N= 08) were significant. There was also significant decrease of the HA levels in the trained group of cardiac muscle in rest $1,42 \pm 0,6130 \mu\text{g/g}$ (N= 07) in comparison with control group $2,015 \pm 0,3505 \mu\text{g/g}$ (N=08). The statistical significance was $p \leq 0,05$.

These results suggest that there was moderate hypertrophy in gastrocnemius muscles samples by long-term swimming. The HA can mediate the microcirculatory homeostasis of skeletal and cardiac muscles in short-term physical exercise of controls rest rats and hearts of trained rest rats.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABBOUD, H.E.; MURRAY, J. & THORGEIRSSON, G. Histidine decarboxylase mediated histamine synthesis in cultured human endothelial cells (abstract). *Clin. Res.*, **30**: 166 A, 1982.
- ABEL, J. J. & KUBOTA, S. On the presence of histamine (beta-imidazolylethylamine) in the hypophysis cerebri and other tissues of the body and its occurrence among the hydrolytic decomposition products of proteins. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, **13** : 243, 1919.
- ACKERMANN, D. Über den bakteriellen Abbau des Histidins. *Hoppe Seyler's. Z. physiol. Chem.*, **65** : 504, 1910, Apud GOODMAN, L.S. & GILMAN A., eds. *As bases farmacológicas da terapêutica*, 5 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1978, p. 527.
- ANREP, G.V. & BARSOUN, G.S. Appearance of histamine in the venous blood during muscular contraction. *J. Physiol.* **85** : 409, 1935.
- ANREP, G.V.; BARSOUN, G.S. & TALAAT, M. Liberation of histamine by the heart muscle. *J. Physiol.*, **86**: 431, 1936.
- ANREP, G.V.; BARSOUN, G.S.; SALAMA, S. & SOUDIAN, Z. Liberation of histamine during reative hyperaemia and muscle contraction in man. *J. Physiol.*, **103** : 297, 1944.
- ANTON, A.H. & SAYRE, D.F. A modified fluorimetric procedure for tissue histamine and its distribution in various animals. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **166** (2) : 285, 1968.
- ARRANG, J.M.; GARBARG, M. & SCHWARTZ, J.C. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. *Nature*, **302** : 832, 1983.
- ARUNLAKSHANA, O. & SCHILD, H.O. Some quantitative uses of drug antagonists. *Brit. J. Pharmacol. Chemoter.*, **14**: 48, 1959.
- ASH, A.S.F. & SCHILD, H.O. Receptors mediating some actions of histamine. *Brit. J. Pharmacol.*, **27**: 427, 1966.
- ATAK, C. Measurement of biogenic amines using cation exchange chromatography and fluorimetric assay. *Acta Physiol. Scand.* (Suppl. **451**): 28, 1977.
- BARGER, G. & DALE, H. H. The presence in ergot and physiological activity of beta-imidazolylethylamine. *J. Physiol.*, **40** : 38, 1910, Apud GOODMAN, L.S & GILMAN, A. eds. *The pharmacological basis of therapeutics*, New York, Macmillan, 1970. p. 620.

- BARNARD, R.J.; EDGERTON, V.R. & PETER, J.B. Effect of exercise on skeletal muscle. I. Biochemical and histological properties. *J. Appl. Physiol.*, 28 : 762, 1970.
- BARSDUM, G.S. & GADDUM, J.H. The pharmacological estimation of adenosine and histamine in blood. *J. Physiol.*, 85: 1, 1935.
- BARTLET, A.L. The action of histamine on the isolated heart. *Brit. J. Pharmacol.*, 21: 450, 1963.
- BECK, L. Histamine as the potential mediator of active reflex dilation. *Fed. Proc.*, 24: 1298, 1965.
- BEIGUELMAN, B. Curso práctico de bioestadística. Ribeirão Preto, Rev. Bras. de Genética, 1988. p. 135 - 152.
- BERNE, R.M.; RUBIO, R. & DOBSON, J.G. Adenosine and adenine nucleotides as possible mediators of cardiac and skeletal muscle blood flow regulation. *Circ. Res.*, Suppl. 28: 115, 1971.
- BIGARD, A.X.; BRUNET, A.; GUEZENNEC, C.Y. & MONOD, H. Effects of chronic hypoxia and endurance training on muscle capillarity. *Pflügers Arch.*, 419 : 225, 1991.
- BLACK, J.W.; DUNCAN, W.A.M.; DURANT, C.J.; GANELLIN, C.R. & PARSONS, E.M. Definition and antagonism of histamine H₂ - receptors. *Nature*, 236: 385, 1972.
- BREZENOFF, H.E. & LOMAX, R. Temperature changes following microinjection of histamine into the thermoregulatory centers of the rat. *Experimentia*, 26 : 51, 1970.
- BURN, J. H. A discussion on the action of local hormones. *Proc. Roy. Soc., Ser. B*, 137 : 281, 1950.
- BURN, J.H. & RAND, M.J. Action of nicotine on the heart. *Brit. Med. J.*, 1: 137, 1958.
- CERRETELLI, P.; DIPRAMPERO, P.E. & PIIPER, J. Energy balance of anaerobic work in the dog gastrocnemius muscle. *Am. J. Physiol.*, 217 : 581, 1969.
- CLAPHAM, J. & KILPATRICK, G.H. Histamine H₃ receptor - mediated modulation of [3H] acetylcholine release from slices of rat entorhinal cortex. *Br. J. Pharmacol.*, 105 : 42 P, 1992.
- DAI, S. Circulatory depression and ventricular arrhythmias induced by compound 48/80 in anaesthetized rats. *Agents Actions*, 34 (3/4) : 316, 1991.

- DELIGIANNIS, A.; KOULDI, E. & FAHADIDOU, A. Effect of water temperature on non-invasive cardiac indices of endurance swimmers. **Med. Sci. Res.**, 20 : 589, 1992.
- DOUGLAS, W.W. Histamina e anti-histamínicos; 5-hidroxitriptamina e antagonistas. In : GOODMAN, L.S. & GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**, 5 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1978. p. 528-562.
- DUBOWITZ, V. & BROOKE, M.H. **Muscle biopsy : a modern approach.** London, Philadelphia, Toronto, Saunders, 1973. p. 475.
- EL-ACKAD, T.M. & BRODY, M.J. Evidence for nonmast cell histamine in vascular wall. **Blood Vessels**, 12: 181, 1975.
- EREZ, V.P. & MESCHERYAKOVA, S.A. Action of muscular exercise on the histamine content and histaminase activity in blood in dependence of fitness. **Sechenov Physiol. J.U.S.S.R.**, 58: 712, 1972.
- FELDBERG, W. & TALESNIK, J. Reduction of tissue histamine by compound 48/80. **J. Physiol**, 120 : 550, 1953.
- FISHER, R.A. **Tabelas estatísticas : para pesquisa em biologia, medicina e agricultura**, 6 ed., São Paulo, Ed. da Universidade de São Paulo e Ed. Polígono, 1971.
- FLACKE, W.; ATANACKOVIC, D.; GILLIS, R.A. & ALPER, M.H. The actions of histamine on the mammalian heart. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 155: 217, 1967.
- FURCHGOTT, R. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. **Circ. Res.**, 53 : 557, 1983.
- GARLAND, C.J. & KEATINGE, W.R. Constrictor actions of acetylcholine, 5-hydroxytryptamine and histamine on bovine coronary artery inner and outer muscle. **J. Physiol.**, 327: 363, 1982.
- GARRISON, J.C. & RALL, T.W. Autacoids; Drug Therapy of Inflammation. In: GOODMAN, L.S. & GILMAN, A. eds. **The pharmacological bases of therapeutics**. 8 ed., USA, Pergamon, 1990. p. 574 - 599.
- GINSBURG, R.; BRISTOW, M.R.; STINSON, E.B. & HARRISON, D.C. Histamine receptors in the human heart. **Life Sci.**, 26: 2245, 1980.
- GINSBURG, R.; BRISTOW, M.R.; KANTROWITZ, N.; BAIM, D.S. & HARRISON, D.C. Histamine provocation of clinical coronary artery spasm : implications concerning pathogenesis of variant angina pectoris. **Am. Heart J.**, 102: 819, 1981.

- GODFREY, T. & MILLER, R.C. Effects of histamine and the histamine antagonists mepyramine and cimetidine on human coronary arteries in vitro. **Br. J. Pharmacol.**, 79 : 979, 1983.
- GOLLIJCK, P.D.; ARMSTRONG, R.B.; SAUBERT IV, C.W.; PIEHL, K. & SALTIN, B. Enzyme activity and fiber composition in skeletal muscle of untrained and trained man. **J. Appl. Physiol.**, 33(3) : 312, 1972.
- GRAHAM, P.; KAHLSON, G. & ROSENGREN, E. Histamine formation in physical exercise, anoxia and under the influence of adrenaline and related substances. **J. Physiol.**, 172 : 174, 1964.
- GREEN, H. J. How important is endogenous muscle glycogen to fatigue in prolonged exercise ? **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 69 : 290, 1990.
- GREEN, H. J.; JONES, L. L. & PAINTER, D. C. Effects of short-term training on cardiac function during prolonged exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.**, 22 (4) : 488, 1990.
- GREEN, J.P.; PRELL, G.D.; KHANDELWAL, J.K. & BLANDINA, P. Aspects of histamine metabolism. **Agents Actions**, 22 (1/2) : 1, 1987.
- GREEN, M.D.; COX, B. & LOMAX, P. Sites and mechanisms of action of histamine in the central thermoregulatory pathways of the rat. **Neuropharmacol.**, 15 : 321, 1976.
- HAGEN, M. & PAGELOW, I. Histamine H1- and H2- receptor in coronary arteries of pigs. **Agents Actions**, 9 : 253, 1979.
- HAKANSON, R. **Biochem. Pharmacol.**, 12 : 1289, 1963. Apud KALHSON, G. & ROSENGREN, E. Histamine. **Ann. Rev. Pharmacol.**, 5 : 305, 1965.
- HAKANSON, R.; RONNBERG, A.L. & SJOLUND, K. Fluorimetric determination of histamine with OPT : optimum reaction conditions and tests of identity. **Ann. Biochem.**, 47 : 356, 1972.
- HARVEY, S.C. Studies on myocardial histamine. Effects of catecholamine-depleting drugs. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, 232 : 141, 1978.
- HOLCSLAW, T. L. & IMHOFF, L. Alterations in levels of vascular histamine in the DOCA - hypertensive rat. **Clin. Exp. Pharmac. Physiol.**, 5 : 405, 1978.

- HOLCSLAW, T.; WILSON, C. & NICHOLS, G. Histamine uptake and metabolism in the blood vessels of rats. **Agents Actions**, 15 (3/4) : 202, 1984.
- HOLMER, I. & BERGH, U. Metabolic and thermal response to swimming in water at varying temperature. **J. Appl. Physiol.**, 37 (5): 702, 1974.
- HOWLAND, R.D. & SPECTOR, S. Disposition of histamine in mammalian blood vessels. **J. Pharmac. Exp. Ther.**, 182: 239, 1972.
- ICHINOSE, M. & BARNES, P.J. Histamine H3 receptors modulate nonadrenergic noncholinergic neural bronchoconstriction in guinea-pig in vivo. **Eur. J. Pharmacol.**, 174 : 49, 1989.
- JONES, D.A.; RUTHERFORD, O.M. & PARKER, D.F. Physiological changes in skeletal muscle as a result of strenght training. **Quart. J. Exp. Physiol.**, 74 (3): 233, 1989.
- KNIGGE, U.; MATZEN, S. & WARBERG, J. Histamine as a neuroendocrine regulator of the stress-induced release of peripheral catecholamines. **Endocrinology**, 126 : 1430-1434, 1990.
- KONISHI, M.; TODA, N. & YAMAMOTO, M. Different mechanisms of action of histamine in isolated arteries of the dog. **Br. J. Pharmacol.**, 74 : 111, 1981.
- KREMZNER, L. T. & WILSON, I. B. A procedure for the determination of histamine. **Biochem. Biophys. Acta.**, 50: 364, 1961.
- KUTSCHER, F. Die physiologische wirkung einer secalabase und des imidazolytathylamins. **Zentbl. Physiol.**, 24 : 163, 1910, Apud DOUGLAS In: GOODMAN, L.S. & GILMAN, A. eds. *As bases farmacológicas da terapêutica*, 5 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1978, p. 527.
- LEVI, R. Effect of exogenous and immunologically release histamine on the isolated heart: a quantitative comparison. **J. Pharmac. Exp. Ther.**, 182: 227, 1972.
- LEVI, R. & KUYE, J.O. Pharmacological characterization of cardiac histamine receptors : sensitivity to H1 - receptor antagonist. **Eur. J. Pharmacol.**, 27 : 330, 1974.
- LEVI, R.; ALLAN, G. & ZAVECZ, J.H. Cardiac histamine receptors. **Fed. Proc.**, 35 (8): 1942, 1976.

- LEVI, R.; MALM, J. R.; BOWMAN, F.O. & ROSEN, M. R. The arrhythmogenic actions of histamine on human atrial fibers. *Circ. Res.*, **49**: 545, 1981.
- LEVI, R.; OWEN, D. A. A. & TRZECIAKOWSKI, J. Actions of histamine on the heart and vasculature. In : Ganellin, Parsons, *Pharmacology of histamine receptors*, London, Wright, 1982. p. 236-297.
- LEWIS, T. The blood vessels of the human skin and their responses. London, Shaw, 1927, Apud KAHLSON, G. & ROSENGREN, E. New approaches to the physiology of histamine. *Physiol. Rev.*, **48** (1): 155, 1968.
- LORENZ, W.; ROHER, H.D.; DOENICKE, A. & OHMANN, C.H. Histamine release in anaesthesia and surgery : a new method to evaluate its clinical significance with several types of causal relationship. *Clin. Anaesthesiol.*, **2**: 403, 1984.
- LOWRI, O. H.; GRAHAM, M. T.; HARRIS, F.B.; FRIEBOT, M. K.; MARKS, A. R. & BREGMAN, R. V. The chemical measurement of histamine in blood plasma and cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **112**: 116, 1954, Apud SHORE, P. A.; BURKHALTER, A. & COHN, V. H. A method for the fluorimetric assay of histamine in tissue. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **127**: 182, 1959.
- MAGEL, J.R.; McARDLE, W.D. & GLASER, R.M. Telemetered heart rate response to select competitive swimming events. *J. Appl. Physiol.*, **26** (6) : 764, 1969.
- MANNAIONI, P. F. Interaction between histamine and dichloroisoproterenol, hexamethonium, pempidine and diphenhydramine, in normal and reserpine-treated heart preparations. *Brit. J. Pharmacol.*, **15**: 500, 1960.
- MARONE, G.; AMBROSIO, G.; BONADUCE, D.; GENOVESE, A.; TRIGGIANI, M. & CONDORELLI, M. Inhibition of IgE-mediated histamine release from human basophils and mast cells by fenoterol. *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.*, **74**: 356, 1984.
- McINTIRE, F. C.; WHITE, F. B. & SPROUL, M. The determination of histamine with 2,4-dinitrofluorobenzene. *Archs. Biochem.*, **29**: 376, 1950.
- McINTIRE, F. C. Determination of histamine by chemical means. In: EICHLER, O. & FARAH, A. eds. *Handbook of experimental pharmacology*. New York, Springer-Verlag, 1966. v. 18, pt 1. p 57-80.

- McLEOD, R.L.; GERTNER, S.B. & HEY, J.A. Modulation of cardiovascular function by central histamine H3 receptors in conscious guinea pigs. *Eur. J. Pharmacol.*, 209 : 141, 1991.
- MILLER, W. L. & BOVE, A. A. Differential H1 - and H2 - receptor - mediated histamine responses of canine epicardial conductance and distal resistance coronary vessels. *Circ. Res.*, 62 : 226, 1988.
- MORGANROTH, M.L.; MOHRMAN, D.E. & SPARKS, H.D. Prolonged vasodilation following fatiguing exercise of dog skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, 229: 38, 1975.
- MORGANROTH, M.L.; YOUNG, E.W. & SPARKS, H.V. Prostaglandin and histaminergic mediation of prolonged vasodilation after exercise. *Am. J. Physiol.*, 223 (1): H 27, 1977.
- NISHIBORI, M.; ITOH, Y.; OISHI, R. & SAEKI, K. Mechanism of the central hyperglycemic action of histamine in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 241 : 582, 1987.
- NOAH, J. W. & BRAND, A. A fluorimetric method to determine levels of histamine in human plasma. *J. Allergy*, 32 : 236, 1961.
- NOBLE, M.I.M. Enhancement of mechanical performance of striated muscle by stretch during contraction. *Exp. Physiol.*, 77 : 539, 1992.
- OLTMAN, C.L.; PARKER, J.L.; ADAMS, H.R. & LAUGHLIN, M.J. Effects of exercise training on vasomotor reactivity of porcine coronary arteries. *Am. J. Physiol.*, 263 (Heart Circ. Physiol., 32) : H 372, 1992.
- OSTMAN-SMITH, I. Adaptative changes in the sympathetic nervous system an some effector organs of the rat following long term exercise or cold acclimation and the role of cardiac sympathetic nerves in the genesis of compensatory cardiac hipertrophy. *Acta Physiol. Scand.*, (Suppl. 477): 1, 1979.
- OWEN, T.L.; EHRHART, I.C.; SCOTT, J.B. & HADDY, F.J. A comparison of recovery times from exercise and ischemic dilations at constant pressure and flow. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 149 : 1040, 1975.
- OWEN, D. A. D.; HARVEY, C. A. & ROYCE, M. J. Effects of histamine on the circulatory system. *Klin. Wochenschr.*, 60: 972, 1982.

- FAVLIK, G.; FRENKL, R.; SZOTS, G. & MALMOZOKY, J. Effect of dynamic exercise on the blood histamine level. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, **56** : 66, 1980.
- PEARCE, E. L. Biological effects of histamine : an overview. *Agents Actions*, **33** (1/2) : 4, 1991.
- PEREIRA, G. R. Influência de esteróides sexuais sobre o conteúdo histamínico no miocárdio de cães. Campinas, UNICAMP, 1981. 77 p. Tese (Mestre) Instituto de Biologia, Departamento de Fisiologia e Biofísica, UNICAMP.
- REDLICH, D. & GLICK, D. Studies in histochemistry LXXVI. Fluorimetric determination of histamine in microgram samples of tissue or microliter volumes of blood fluids. *Ann. Biochem.*, **10** : 459, 1965.
- REILLY, M. A. & SCHAYER, R. W. In vivo studies on histamine catabolism and its inhibition. *Br. J. Pharmac.*, **38** : 478, 1970.
- REILLY, M. A. & SCHAYER, R. W. Techniques for measuring histamine formation in mice. *Br. J. Pharmac.*, **42** : 375, 1971a.
- REILLY, M. A. & SCHAYER, R. W. Further studies on histamine catabolism in vivo. *Br. J. Pharmac.*, **43** : 349, 1971b.
- REINHARDT, D.; WAGNER, J. & SCHUMANN, H. J. Differentiation of H1 and H2 receptors mediating positive chronotropic and inotropic responses to histamine on atrial preparations of the guinea-pig. *Agents Actions*, **4** : 217, 1974.
- RILEY, J. F. & WEST, G.B.. The presence of histamine in tissue mast cells. *J. Physiol.*, **120** : 528, 1953.
- ROSCOE, J.T. Fundamental research statistics for the behavioral sciences. 2 ed., Holt, Rinehart and Winston, 1975. p. 217-223; 230-237.
- ROSENTHAL, S. M. & TABOR, H. An improved colorimetric method for the estimation of histamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **92** : 425, 1948.
- RYAN, M. J. & BRODY, M. J. Distribution of histamine in the canine autonomic nervous system. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, **174** (1) : 123, 1970.
- RYAN, M. J. & BRODY, M. J. Neurogenic and vascular stores of histamine in the dog. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, **181** : 83, 1972.

- SAGAWA, S.; SHIRAKI, K.; YOUSEF, M.K. & KONDA, M. Water temperature and intensity of exercise in maintenance of thermal equilibrium. *J. Appl. Physiol.*, 65 (6) : 2413, 1988.
- SAKATA, T.; OOKUMA, K.; FUJIMOTO, K.; FUKAGAWA, K. & YOSHIMATSU, H. Histaminergic control of energy balance in rats. *Brain Res. Bull.*, 27 (3/4) : 371, 1991.
- SALTIN, B.; HENRIKSSON, J.; NYGAARD, E. & ANDERSEN, P. Fiber types and metabolic potentials of skeletal muscles in sedentary and endurance runners. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 301 : 3, 1977.
- SAWICKI, E.; SAWICKI, C. R.; GOLDEN, C. C. & KOBER, T. Fluorimetric and colorimetric methods of analysis for histamine. *Microchem. J.*, 15: 25, 1970.
- SCHAYER, R.W. Biogenesis of histamine. *J. Biol. Chem.*, 199 : 245, 1952.
- SCHAYER, R.W. & GANLEY, O.H. Adaptative increase in mammalian histidine decarboxylase activity in response to nonspecific stress. *Ann. J. Physiol.*, 197 : 721, 1959.
- SCHAYER, R.W. Relationship of induced histamine decarboxylase activity and histamine synthesis to shock from stress and from endotoxin. *Am. J. Physiol.*, 168 : 1187, 1960 a.
- SCHAYER, R.W. Relationship of stress induced histidine decarboxylase to circulatory homeostasis and shock. *Science*, 131 : 226, 1960 b.
- SCHAYER, R.W. Evidence that induced histamine is an intrinsic regulator of the microcirculatory system. *Am. J. Physiol.*, 202 (1): 66, 1962 a.
- SCHAYER, R.W. Role of induced histamine in tourniquet shock in mice. *Ann. J. Physiol.*, 203 : 412, 1962 b.
- SCHAYER, R.W. Histidine decarboxylase in mast cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 103 : Art. 1, 164; 1963, Apud EICHLER, O. & FARAH, A. Handbook of experimental pharmacology. Berlin : Springer, 1966. p. 688 - 725. v. 18.
- SCHAYER, R. W. Biogenic amines and microcirculatory homeostasis In: BLUM, J.J. Biogenic amines as physiological regulators. Englewood Cliffs, New Jersey, 1970.
- SCHAYER, R.W. Histamine and microcirculation. *Life Science*, 15 (3): 391, 1974.

- SCHLICKER, E.; BETZ, R. & GOTHERT, M. Histamine H3 receptor - mediated inhibition of serotonin release in the rat brain cortex. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.*, 337 : 588, 1988.
- SCHLICKER, E.; FINK, K.; HINTERTHANER, M. & GOTHERT, M. Inhibition of noradrenaline release in the rat brain cortex via presynaptic H3 receptors. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.*, 340 : 633, 1989.
- SCHULLMAN, E. S.; MACGLASHAN, Jr. D. W. ; PETERS, S. P.; SCHLEIMER, R. P.; NEWBALL, H. H. & LICHTENSTEIN, L. M. Human lung mast cells: purification and characterization. *J. Immun.*, 129: 2662, 1982.
- SHORE, P. A.; BURKHALTER, A. & COHN, V. H. A method for the fluorimetric assay of histamine in tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 127 : 182, 1959.
- STAINSBY, W. N. Local control of regional blood flow. *Ann. Rev. Physiol.*, 35: 151, 1973.
- TAYLOR, S.J. & KILPATRICK, G.J. Characterization of histamine -H3 receptors controlling non-adrenergic non-cholinergic concentrations of the guinea-pig isolated ileum. *Br. J. Pharmacol.*, 105 : 667, 1992 a.
- TAYLOR, S.J.; MICHEL, A.D. & KILPATRICK, G.J. In vivo occupancy of histamine H3 receptors by thioperamide and (R) -alfa - methylhistamine measured using histamine turnover and an ex vivo labeling technique. *Biochem. Pharmacol.*, 44 (7) : 1261, 1992 b.
- TESCH, P.A. Skeletal muscle adaptations consequent to long-term heavy resistance exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 20 (5) : S 132, 1988.
- TOBIA, A.J.; ADAMS, M.D.; MIYA, T.S. & BOUSQUET, W.F. Histamine and reflex vasodilation in the rat. *Life Sci.*, 8 : 745, 1969.
- TOBIA, A.J.; ADAMS, M.D.; MIYA, T.S. & BOUSQUET, W.F. Altered reflex vasodilation in the hypertensive rat : possible role of histamine. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 175 : 619, 1970.
- TODA, N.; KONISHI, M. & MIYAZAKI, M. Involvement of endogenous prostaglandin I2 in the vascular action of histamine in dogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 223 : 257, 1982.
- TODA, N. Isolated human coronary arteries in response to vasoconstrictor substances. *Am. J. Physiol.*, 245 : H 937, 1983.

- TODA, N. Mechanism of histamine actions in human coronary arteries. *Circ. Res.*, **61** : 280, 1987.
- TRIGGIANI, M.; GENOVESE, A.; VIGORITO, C. & MARONE, G. Histamine and human heart. *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.*, **77**: 174, 1985.
- TRZECIAKOWSKI, J. P. & LEVI, R. Reduction of ventricular fibrillation threshold by histamine : resolution into separate H1- and H2- mediated components. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **223**: 774, 1982.
- TRZECIAKOWSKI, J. P. Inhibition of guinea-pig ileum contractions mediated by a class of histamine receptor resembling the H3 subtype. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **243**: 874, 1987.
- UEDA, H.; DOI, Y.; YOSHIZUKA, M.; SAKAMOTO, Y.; MORI, N.; ARAKI, H. & FUJIMOTO, S. Electron microscopy of histamine-induced contraction of the in vitro swine coronary artery. *Acta Anat.*, **142** : 62, 1991.
- VAISFELD, I. L. & KASSIL, G. N. **Histamine in Biochemistry and Physiology.**, Moscow, Nauka, 1981.
- VIDRIO, H. & FRIDLA, D. V. Effects of histamine on atrial and ventricular contractility in the canine isovolumic heart. *Agents Actions*, **29** (3/4): 144, 1990.
- VIRU, A. **Hormones in muscular activity.** Flórida, CRC, 1985. p. 101-109. v. 1.
- VUGMAN, I. & ROCHA e SILVA, M. Biological determination of histamine in living tissue and body fluids. In : EICHILE, O. & FARAH, A., eds. **Handbook of experimental pharmacology.** New York, Springer-Verlag, 1966. p. 81 v. 18, pt 1.
- WADA, H.; INAGAKI, N.; ITOWI, N. & YAMATODANI, A. Histaminergic neuron system in the brain : distribution and possible functions. *Brain Res. Bull.*, **27** (3/4) : 367, 1991.
- WENNMALM, A. & PETERSSON, A. S. Endothelium independent vascular relaxation by histamine in the rabbit aorta. *Acta. Physiol. Scand.*, **142**: 525, 1991.
- WILTERDINK, E. J.; BALLOR, D. L. & KEESEY, R. E. Amount of exercise per day and weeks of training : effects on body weight and daily energy expenditure. *Med. Sci. Sports Exerc.*, **24** (3): 396, 1992.
- WINDAUS, A. & VOGT, W. Synthese des imidazolylathylamins. *Ber. dt. chem. Ges.*, **40** : 3691, 1907, Apud DOUGLAS In : GOODMAN, L.S. & GILMAN, A. eds. *As bases farmacológicas da terapêutica*, 1978, p. 527.

WOLFF, A. A. & LEVI, R. Histamine and cardiac arrhythmias.
Circ. Res., **58** (1): 1, 1986.

YAKOVLEV, N.N. Biochemistry of sport in Soviet Union :
begining, development, and present status. **Med. Sci.**
Sports, **7** : 237, 1975.

10. ANEXOS

10. ANEXOS

ANEXO 01 - Análise de variância por coeficientes ortogonais da oscilação semanal da massa corporal de 11 ratos sedentários - SED (controles) e de 09 ratos treinados - TRE, durante o período experimental.

Causas de Variação	GL	F
Entre treinos	1	75,395 ***
Regressão de Io grau	1	4683,213 ***
Paralelismo	1	84,871 ***
Regressão de IIo grau	1	40,321 ***
Paralelismo	1	0,156 NS
Regressão de IIIo grau	1	3,966 *
Paralelismo	1	1,848 NS
Regressão de IVo grau	1	2,666 NS
Paralelismo	1	0,782 NS
Regressão de Vo grau	1	0,402 NS
Paralelismo	1	1,164 NS
Regressões superiores e Paralelismos superiores	8	0,828 NS
SEMANAS	19	257,969 ***
Indivíduos (Ratos)	17	261,896 ***
Resíduos	143	-
TOTAL	179	-
Ratos	b	a
TRE (T)	10,83527	262,03915
SED (S)	14,11703	256,55237
SbT - bS ou aT - aS	0,7178039	2,0617348
Valor de t (tb1 - b2)	4,572 ***	2,661 * (ta1-a2)
GL	16	16

GL = Graus de Liberdade

F = Tabela de Fisher (FISHER, 1971)

*** = Resultados altamente significativos

* = Resultados significativos

NS = Resultados não significativos

b = Coeficiente angular

a = Ordenada à origem (altura)

SbT - bS = Variância conjunta (TRE - SED)

10. ANEXOS

10. ANEXOS

ANEXO 01 - Análise de variância por coeficientes ortogonais da oscilação semanal da massa corporal de 11 ratos sedentários - SED (controles) e de 09 ratos treinados - TRE, durante o período experimental.

Causas de Variação	GL	F
Entre treinos	1	75,395 ***
Regressão de Io grau	1	4683,213 ***
Paralelismo	1	84,871 ***
Regressão de IIo grau	1	40,321 ***
Paralelismo	1	0,156 NS
Regressão de IIIo grau	1	3,966 *
Paralelismo	1	1,848 NS
Regressão de IVo grau	1	2,666 NS
Paralelismo	1	0,782 NS
Regressão de Vo grau	1	0,402 NS
Paralelismo	1	1,164 NS
Regressões superiores e Paralelismos superiores	8	0,828 NS
SEMANAS	19	257,969 ***
Indivíduos (Ratos)	17	261,896 ***
Resíduos	143	-
TOTAL	179	-
Ratos	b	a
TRE (T)	10,83527	262,03915
SED (S)	14,11703	256,55237
SbT - bS ou aT - aS	0,7178039	2,0617348
Valor de t (tb1 - b2)	4,572 ***	2,661 * (ta1-a2)
GL	16	16

GL = Graus de Liberdade

F = Tabela de Fisher (FISHER, 1971)

*** = Resultados altamente significativos

* = Resultados significativos

NS = Resultados não significativos

b = Coeficiente angular

a = Ordenada à origem (altura)

SbT - bS = Variância conjunta (TRE - SED)

ANEXO 02 - Valores do teste "t" de "Student" para as massas das amostras (de coração, de músculo gastrocnêmio e da massa corporal de animais sedentários versus animais treinados : coração $t = 1,100$ (NS); músculo gastrocnêmio $t = 1,596$ (NS) e massa corporal $t = 1,025$ (NS) para 134 GL.

A relação entre a massa das amostras de coração e de músculo gastrocnêmio (mg/100 g) e a massa corporal (g) de 19 ratos sedentários - SED (controles) e de 17 ratos treinados - TRE foi analisada por regressão e correlação. As relações entre as massas "coração/corporal" e "músculo gastrocnêmio / corporal" foram denominadas, respectivamente, b_1 , a_1 e b_2 , a_2 . Onde $b_1 = 0,64423$; $b_2 = 1,64254$.

$b_1 = b_2$; $t = 1,230$ (NS); para 32 GL

$a_1 = 3,227$; $a_2 = -0,389$

$a_1 \neq a_2$; $t = 1056,817$ ** ; para 32 GL

$r_1 = 0,26425$; $t_1 = 1,130$ (NS); para 17 GL

$r_2 = 0,59323$; $t_2 = 2,854$ *; para 15 GL

Por não ser linear a regressão em animais SED, utilizou-se o teste de correlação de "Sperman" (r_s) :

Para sedentários $r_{s1} = 0,46073$ * ($p \leq 0,05$)

Para treinados $r_{s2} = 0,56039$ ** ($p \leq 0,05$)

Na comparação entre as massas "coração/corporal" de SED versus TRE, empregou-se o teste de "Kolmogorov-Smirnov", onde $D_{\text{máx.}} = 0,29413$; o teste de "Hollander e Wolfe", onde $X = 95$ (NS); e o teste de "Mann-Whitney", onde $U_{\text{min.}} = 152$ (NS) para 19 e 17 GL.

Na comparação entre as massas "músculo gastrocnêmio/corporal" de SED versus TRE, empregaram-se os mesmos testes anteriores, onde $D_{\text{máx.}} = 0,35152$; $X = 120$ (NS) e $U_{\text{min.}} = 106$ (NS) para 19 e 17 GL.

Obs : (NS) := valores não significativos; b = coeficiente angular;
a = coordenada à origem; r = coeficiente de correlação;
GL= graus de liberdade