



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Participação do peptídeo natriurético atrial (anp) na
hipotensão e bradicardia de ratos espontaneamente
hipertensos após treinamento físico crônico em
diferentes modalidades**

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

Patrick Wander Endlich

Orientador:

Prof. Dra. Glaucia Rodrigues Abreu

Vitória, ES

**Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Fisiológicas
do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Espírito
Santo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Fisiológicas.**

Vitória, 31 de agosto de 2009

Endlich, Patrick Wander

Participação do Peptídeo Natriurético Atrial na Hipotensão e Bradicardia de Ratos Espontaneamente Hipertensos Após Treinamento Físico Crônico em Diferentes Modalidades.

Endlich, P.W. – Vitória, 2009.

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientador: Prof. Dra. Glaucia Rodrigues Abreu

1. Natação, 2. Corrida, 3. Treinamento de Resistência, 4. Receptores dos Peptídeos Natriuréticos, 5. Expressão Gênica, 6. Peptídeo Natriurético Atrial.

**PARTICIPAÇÃO DO PEPTÍDEO NATRIURÉTICO ATRIAL (ANP)
NA HIPOTENSÃO E BRADICARDIA DE RATOS
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS APÓS TREINAMENTO
FÍSICO CRÔNICO EM DIFERENTES MODALIDADES**

Patrick Wander Endlich

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde de Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Banca Examinadora:

**Prof. Dra. Glaucia Rodrigues Abreu – Orientador,
UFES**

Prof. Dra. Adelina Martha dos Reis – Co-orientadora - UFMG

Prof. Dr. José Geraldo Mill – UFES.

Coordenador do PPGCF – Prof. Dr. Luiz C. Schenberg

Vitória, 31 de agosto de 2009

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus por ter me dado forças para conduzir este trabalho;

aos meus pais por sempre estarem ao meu lado e por me conceder uma vida que me permitiu alcançar este feito;

à minha orientadora, Profa. Dra. Glauca Rodrigues Abreu, meu exemplo, minha grande mestra, por sempre ter dado credibilidade à minha pessoa e por ter me mostrado não somente os caminhos da ciência, mas também a importância da ciência em minha vida;

à Profa. Dra. Adelina Martha dos Reis, pois desde o início se mostrou à favor do trabalho e apesar de nossos poucos contatos, me deu uma grande lição de seriedade e competência;

à Profa. Dra. Nazaré Souza Bissoli, por buscar sempre ser uma grande pesquisadora e involuntariamente me contagiar com seus anseios;

aos professores do PPGCF/UFES, em especial o Prof. Dr. Luiz C. Schenberg que me cedeu gentilmente um espaço para que o treinamento físico dos animais pudesse ser realizado, Prof. José Geral Mill por permitir a utilização da esteira e a Profa. Dra. Margareth Ribeiro Moysés por se mostrar extremamente generosa, feitos estes de suma importância para realização do trabalho;

ao meu amigo Vinícius que durante este período, foi também um anjo em minha vida;

à minha irmã Paula, pela convivência harmoniosa em família;

ao Washington, Luciana Firmes, Patrícia e Janine que pacientemente me ensinaram os experimentos deste trabalho;

ao Prof. Dr. Anselmo José Perez e Profa. Msa. Erineusa Maria da Silva, pelo apoio no trabalho e por serem minhas referências na Educação Física;

às pessoas que me ajudaram (direta ou indiretamente) neste trabalho e também se tornaram meus grandes amigos, Washington, Lázaro, Aline, Mariela, Rafaela, Juliere, Luciana Celante, Luiz Henrique, Mariela, Thiago Dalcin, Helena Gomes, Walckiria, Amanda, Mariana Borgo, Mariana Lugon, Sônia Gouvea, Andressa, Cíntia, Edineuza, Ágata Gava, Alessandra Padilha, Miriam Fioresi, Fagna, Jones, Marcelo Baldo, Duba, Thiago Cott, Rodrigo Gallon, Rodrigo de BH, Dayana, Lays, Cida, Lucas, Késia, Aline Zandonadi, Ana Raquel e entre tantos outros;

... à todos vocês o meu mais sincero, MUITÍSSIMO obrigado!!!!

A ciência, a ciência, a ciência...
Ah, como tudo é nulo e vão!
A pobreza da inteligência
Ante a riqueza da emoção!

Aquela mulher que trabalha
Como uma santa em sacrifício,
Com quanto esforço dado ralha!
Contra o pensar, que é o meu vício!

A ciência! Como é pobre e nada!
Rico é o que alma dá e tem.

[...]

Fernando Pessoa, 4-10-1934

RESUMO

Introdução: Agudamente o Peptídeo Natriurético Atrial (ANP) tem um efeito natriurético e diurético renal e vasodilatação, conseqüentemente resultando em diminuição da pressão arterial. Contudo, o comportamento deste peptídeo e de seus receptores associado ao treinamento físico crônico em condições de hipertensão permanece desconhecido.

Métodos e Resultados: O objetivo do presente estudo foi identificar as possíveis alterações na síntese e secreção do ANP, expressão e sensibilidade dos receptores dos peptídeos natriuréticos (NPR)-A e NPR-C nos rins e tecido adiposo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) submetidos ao treinamento físico de natação ou corrida. SHR machos foram submetidos ao treinamento físico de corrida ou natação por 8 semanas com intensidades similares. Radioimunoensaio foi utilizado para as dosagens de ANP. RNAm do ANP atrial, assim como RNAm de NPR-A e NPR-C nos rins e no tecido adiposo visceral foram mensurados pelo reação de polimerização em cadeia em tempo real (RT-PCR). A autoradiografia foi utilizada para mensurar a sensibilidade do binding dos NPR no rim e tecido adiposo. Ambos os grupos apresentaram diminuição da pressão arterial, mas somente no grupo natação houve bradicardia. Houve aumento significativo da expressão de ANP no átrio direito e nos níveis plasmáticos deste peptídeo. Ainda, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na expressão do NPR-C no tecido adiposo. Todavia, o binding do ANP pelo NPR-C neste tecido foi alterado pela natação. A razão entre NPR-A/NPR-C no tecido nos rins foi estatisticamente menor no grupo corrida.

Conclusão: O mecanismo hipotensor e bradicárdico em ratos hipertensos submetidos ao treinamento físico apresentou diferença, podendo o ANP estar envolvido nestas adaptações no grupo natação, mas não nos animais treinados com corrida.

ABSTRACT

Background – Acutely the atrial natriuretic peptide (ANP) has an effect of renal natriuresis and diuresis, vasodilatation, resulting in decrease of blood pressure. However, the responses of this peptide and of his receptors associated to different chronics physical training in the hypertension remain unknown.

Methods and results - The aim was identified the possible alterations in the synthesis and release of atria ANP, expression and affinity of the NPR-A, NPR-C in the kidneys and fat tissue of spontaneously hypertensive rats (SHR) submitted to swimming or running physical training. Male SHR were subjected to 8-week of swimming or running under similar intensities. Radioimmunoassay was used to measure ANP levels. mRNA ANP in the atria, such as mRNA of natriuretic peptide receptor (NPR)-A and NPR-C in the kidneys and fat tissue was determined by real time- polymerase chain reaction. The autoradiography was used to determine the sensitivity of binding to ANP receptors. Both groups shown decrease in the blood pressure, but only swim group shown bradycardia. A significant increase of ANP expression in the right atrium and plasma levels was found in the swim group. Hence, not was found alteration in the expression of NPR-C in fat tissue, but the binding of ANP was altered in this tissue in the swim group. The index between NPR-A/NPR-C in the kidneys was significantly lower in run group. **Conclusions:** The mechanism hypotensor and bradycardic in hypertensive rats shown differences, with the ANP can be involved in this alterations by swimming, but not in the running training.

Key words: swimming; running; endurance training; natriuretic peptide receptors; gene expression.

INTRODUÇÃO

A integração entre o rim e o coração através de um fator já havia sido notada¹, mas somente em 1981 que De Bold e seus associados conseguiram uma evidência direta deste fator humoral². Estes pesquisadores tinham percebido que ambos miócitos atriais e ventriculares apresentavam a maioria das organelas celulares eucariotas em comum. No entanto, nos miócitos atriais a presença de vesículas semelhantes às presentes em células que sintetizam hormônios peptídeos, ainda não apresentava uma função reconhecida pela ciência. Sendo assim, testando sob a infusão de homogenato atrial e ventricular em ratos, estes pesquisadores perceberam que o extrato atrial era capaz de desencadear um efeito de natriurese e diurese renal, seguido pelo aumento no hematócrito e conseqüente diminuição da pressão arterial. Em estudos posteriores percebeu-se que este fator humoral até então denominado fator natriurético atrial (ANF; do inglês *atrial natriuretic factor*), cardionatrin, cardiodilatina e atriopeptina, tratava-se de um peptídeo e foi então chamado de peptídeo natriurético atrial (ANP; do inglês *atrial natriuretic peptide*)³.

O ANP compõe a família dos peptídeos natriuréticos, um sistema altamente conservado em todos vertebrados desde animais primitivos como os *hagfishs* (peixes apresentando somente crânio, mas ausente de coluna vertebral) até os seres humanos. Em peixes que vivem água doce, quanto em água salgada, este sistema torna-se importante para controle da ingestão de água, absorção e excreção de sódio (Na^+)⁴.

Nos seres humanos, a família dos peptídeos natriuréticos é composta pelo ANP, peptídeo natriurético do tipo-B (BNP; *a priori* este peptídeo foi denominado de peptídeo natriurético cerebral por ter sido isolado de cérebro de

porco) e peptídeo natriurético do tipo-C (CNP)⁵. Todos os componentes desta família apresentam estrutura e características bioquímicas similares, mas são sintetizados a partir de genes diferentes⁵. Na figura 1, podemos perceber na estrutura dos peptídeos natriuréticos que há um anel formado por 17 aminoácidos mantido por uma ponte de dissulfeto, sendo a manutenção desta imprescindível para a atividade biológica destes hormônios⁵. Embora estes peptídeos apresentem estrutura homóloga, os locais predominantes de síntese, ligação com o receptor de membrana e algumas funções são diferentes⁶. O ANP é expressado predominantemente nos átrios, seguido de ventrículos e rins (neste local o ANP apresenta 32 aminoácidos e sendo denominado de urodilatina⁷), enquanto o BNP é expressado predominantemente nos ventrículos e uma pequena proporção nos átrios e o CNP é expressado pelas células endoteliais, osso, cérebro e coração⁵. Por outro lado, outros autores reportam que embora tanto o ANP quanto o BNP sejam produzidos no coração, a síntese destes peptídeos nos ventrículos é entre 100 e 1000 vezes menor quando comparado aos átrios, sendo estes o local predominante para a síntese destes hormônios⁶. No entanto, durante o processo de hipertrofia cardíaca a expressão, síntese e secreção de ambos os peptídeos aumenta consideravelmente, tornando-se os ventrículos o local primário para a produção e secreção do BNP. Por isto os níveis plasmáticos aumentados deste peptídeo são utilizados clinicamente como um confiável marcador de hipertrofia cardíaca⁸. Cabe ressaltar, que o ANP é sintetizado como um pré-pró-hormônio contendo 151 aminoácidos em sua cadeia⁵. A clivagem da seqüência amino terminal resulta em um peptídeo de 126 aminoácidos, isto é, o pró-hormônio que é estocado em grânulos nos átrios⁵. Na presença do estímulo para a

secreção deste peptídeo, o pró-ANP é clivado por uma enzima transmembrana cardíaca denominada corin para a forma biologicamente ativa⁴, ou seja, o ANP, um peptídeo contendo 28 aminoácidos⁵.

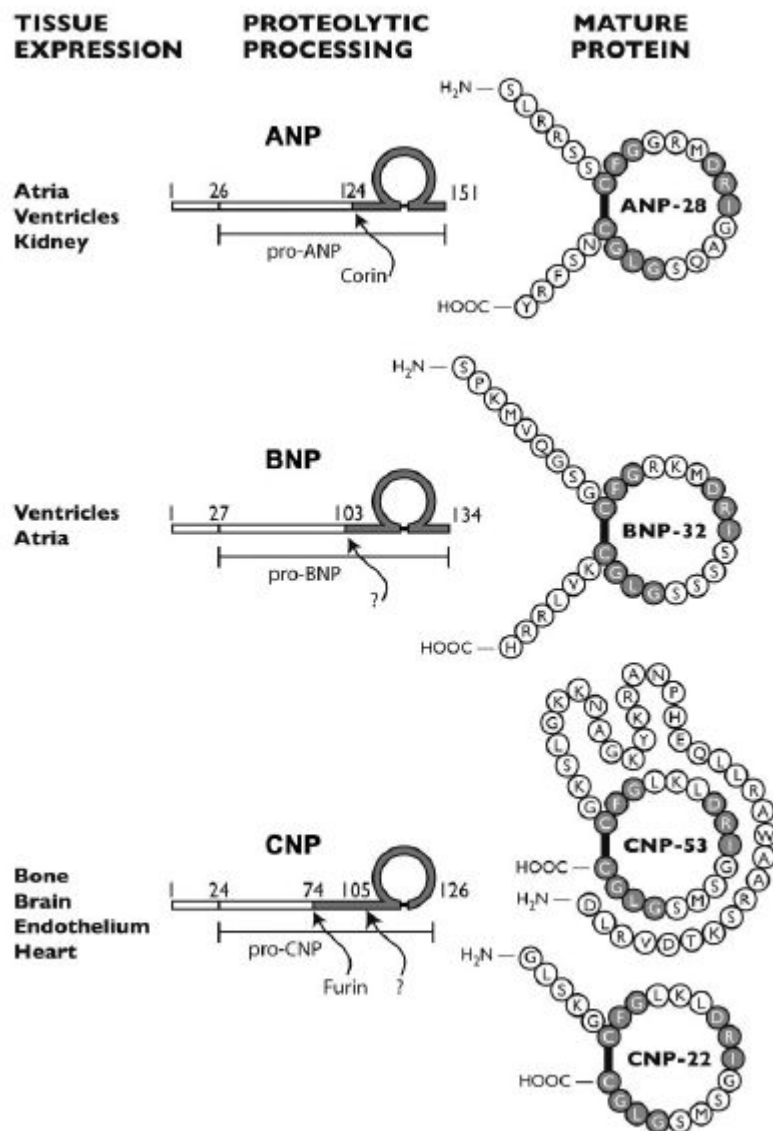


Fig.1- Expressão dos peptídeos natriuréticos, processamento e estrutura do ANP, BNP e CNP (Figura extraída de Potter et al., 2006).

Reconhecidamente, a distensão atrial funciona como o estímulo primário para a secreção do ANP, que ocorre devido à um aumento na pressão venosa central, acarretada pelo aumento no retorno venoso devido à ingestão de sal⁹. Todavia, outros estímulos alteram a secreção do ANP, tais quais: imersão na água, inclinação para baixo da cabeça, vasopressina, angiotensina II, endotelina,

encefalinas, citocinas, assim como, agonistas de fosbolester, foskolin, alfa- e beta - adrenérgico. Além disso, a estimulação neuronal também parece estimular a secreção de ANP⁶.

Uma vez na circulação sanguínea, o ANP pode exercer seus efeitos biológicos através da ligação com os receptores dos peptídeos natriuréticos do tipo A (NPR-A; do inglês *natriuretic peptide receptor*)⁵. O NPR-A e o NPR-B apresentam um domínio extracelular onde ocorre a interação com o hormônio contendo 450 aminoácidos, um domínio transmembrana contendo entre 20 e 25 aminoácidos e um domínio intracelular contendo 570 aminoácidos. Por sua vez, este último domínio apresenta uma cadeia de 250 aminoácidos denominados domínio catalítico guanilil-ciclase carboxi-terminal, apresentando atividade similar à guanilato ciclase solúvel¹⁰ (Fig.2). Este último domínio encontra sua atividade suprimida em repouso, mas a sua fosforilação desencadeia aumento na formação de GMP_c, segundo mensageiro no qual ocorre as ações celulares do ANP¹⁰. Cabe ressaltar, que estes receptores são expressos em diversos tecidos no organismo humano, destacando-se as adrenais, cérebro, músculo vascular liso, pulmão, rins, tecido adiposo e coração⁵. Em contrapartida, os receptores de clearance ou NPR-C apresentam atividade catalítica sobre o ANP. Estes receptores apresentam o domínio extracelular com 30% de semelhança ao NPR-A e NPR-B. Contudo, seu domínio intracelular apresenta-se curto, contendo apenas 37 aminoácidos e não apresentando qualquer atividade guanilil ciclase¹². Todos os três peptídeos são degradados através de dois processos: 1. NPR-C mediando a internalização seguida de degradação pelos lisossomos; 2. Degradação pela endopeptidase neutral 24.11 (neprilisina), uma enzima zinco-dependente

expressada na membrana plasmática que tem amplos substratos específicos e distribuição tecidual⁵. A maior afinidade destes receptores pelo ANP, seguido do BNP e CNP, explica o curto tempo de biodisponibilidade deste peptídeo, em torno de 1 a 2 minutos¹³.

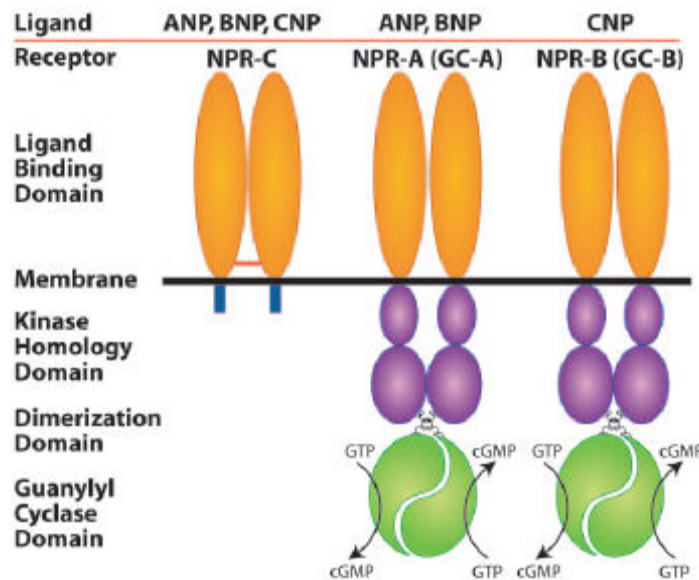


Fig.2- Estrutura dos receptores dos peptídeos natriuréticos e preferência de ligação.

A interação do ANP com o NPR-A desencadeia uma série de respostas fisiológicas, como reportado a seguir:

1. *Regulação da hemodinâmica renal e sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA)*: Nos rins são encontrados NPR-A no ducto coletor da medula interna, glomérulo e células mesangiais. Onde a interação do ANP com o respectivo receptor facilita a excreção de sódio e aumenta a taxa de filtração glomerular¹⁴.

1. **Henry JP, Gauer OH, Reeves JL** 1956 Evidence of the atrial location of receptors influencing urine flow. *Circ Res* 4:85–90.

2. **de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H** 1981 A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* 28:89–94.
3. **Flynn TG, de Bold ML, de Bold AJ** 1983 The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Biochem Biophys Res Commun* 117:859–865
4. **WU Q, Cai O, Chen S, Wang W.** Corin: new insights into the natriuretic peptide system. *Kidney Int.* 2009; 75: 142-146.
5. **Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM.** Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocrine reviews.* 2006; 27:47-62.
6. **Pandey KN.** Biology of natriuretic peptides and their receptors. *Peptides* 2005; 26: 901-932.
7. **Forssmann WG, Richter R, Meyer M.** The endocrine heart and natriuretic peptides: histochemistry, cell biology, and functional aspects of the renal urodilatin system. *Histochem Cell Biol.* 1998; 110: 335-357.
8. **Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, Suga S, Saito Y, Ogawa Y, et al.** Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans: evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, ANP and BNP. *J Clin Invest.* 1991; 87: 1402-1412.
9. **Dietz JR.** Mechanisms of atrial natriuretic peptide secretion from the atrium. *Cardiovascular research.* 2005; 68: 8-17.
10. **Potter LR.** Domain analysis of human transmembrane guanylyl cyclase receptors: implications for regulation. *Front Biosci.* 2005; 10: 1205-1220.

11. **Labrecque J, McNicoll N, Marquis M, De Lean A.** A disulfide-bridged mutant of natriuretic peptide receptor-A displays constitutive activity. Role of receptor dimerization in signal transduction. *J Biol Chem.* 1999; 274: 9752 - 9759.
12. **Fuller F, Porter JG, Arfsten AE, Miller J, Schilling JW, Scarborough RM, Lewicki JA, Schenk DB.** Atrial natriuretic peptide clearance receptor. Complete sequence and functional expression of cDNA clones. *J Biol Chem.* 1988; 263: 9395 - 9401.
13. **Vandlen RL, Arcuri KE, Napler MA.** Identification of a receptor for atrial natriuretic factor in rabbit aorta membranes by affinity cross-linking. *J Biol Chem.* 1985; 260: 10889-10892.
14. **Pandey KN, Nguyen HT, Sharma GD, Shi SJ, Kriegel AM.** Ligand-regulated internalization, trafficking, and down-regulation of guanylyl cyclase/atrial natriuretic peptide receptor-A in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 4618-27.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais Experimentais

Foram utilizados 20 ratos espontaneamente hipertensos (SHR; do inglês *spontaneously hypertensive rats*) provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP), com 14 semanas de vida e massa corporal variando entre 280 e 330 gramas. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (3 a 4 ratos por gaiola) no Biotério do anexo do Laboratório de Neurobiologia da Universidade Federal do Espírito Santo, sob controle da temperatura (23°C), umidade (50%) e ciclo de 12 horas com luz e 12 horas sem luz, tendo livre acesso à ração padrão do biotério (Nuvital Nutrientes S/A, Curitiba, PR, Brasil) e água mineral.

Os animais foram selecionados randomicamente para compor um dos três grupos experimentais, sendo eles: SHR sedentário (S), SHR treinado corrida (C) e SHR treinado natação (N).

Os protocolos obtiveram aprovação do conselho de ética e pesquisa com animais da Universidade Federal do Espírito Santo (nº) e os ratos foram tratados de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (Guia para Cuidado e Uso de Animais de Laboratório) publicado pelo *United States National Institutes of Health* (Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos).

2.2. Protocolos de Treinamento

2.2.1. Protocolo de Natação

Para realização da natação, foi montado um aparato especialmente projetado para o treinamento físico dos ratos (Figura 1). Este consiste de um tanque de vidro com 1,8 m de comprimento, 0,7m de altura (a profundidade da água era mantida em torno de 0,5m) e 0,6m de largura, dividido em seis raias individuais, cada uma com 0,3m comprimento. Ademais, o aparato conta com um sistema de filtragem e aquecimento da água, permitindo que a mesma seja mantida limpa e sob temperatura constante de $32^{\circ}\text{C}\pm 1$.



Figura 1. Aparato de natação para ratos.

Os animais seguiram a seguinte rotina durante os dias de treinamento:

1. quando necessário, acoplamento da sobrecarga na cauda com um peso correspondente de 2 a 5% da massa corporal total;
2. treinamento físico;
3. por fim, os animais tinham as orelhas enxutas, o corpo seco com toalha e secador de cabelo.

No tocante do treinamento, este foi realizado por um período de 8 semanas, no qual os animais treinavam cinco dias consecutivos com intervalo de dois dias de repouso. Aventa-se, que a periodização levou em consideração a interdependência volume x intensidade, ou seja, a cada aumento na sobrecarga, diminuía-se o tempo de treinamento. Sendo assim, o treinamento foi iniciado executando uma fase de adaptação sem sobrecarga caudal por 10 minutos, nos outros dias o tempo de treinamento foi aumentado até que os animais pudessem nadar por 1 hora ao final do quinto dia. A partir da segunda semana de treinamento os animais tiveram uma circunferência de chumbo atada à cauda, correspondente à 2% do peso corporal. Esta sobrecarga foi sendo aumentada gradativamente até atingir 5% do peso corporal, fato ocorrido na 6ª semana e mantido até o final do treinamento.

A pesagem dos ratos era realizada duas vezes por semana em intervalos regulares, mantendo um controle rigoroso da sobrecarga. Esta que respeitou o limite de 5% do peso corporal, evitando a transição metabólica do exercício aeróbio para anaeróbico, haja visto que a fase máxima estável de lactato (FMEL) ocorre em torno de 5,20 a 6,41mmol/l, correspondendo de 5 a 6% da massa corporal do rato^{1,2,3}. Ainda, este procedimento inviabiliza a flutuação, fato que interfere no tempo real de exercício.

2.2.2. Protocolo de corrida

Os animais realizaram a corrida em esteira elétrica para ratos (marca insigth, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Assim como na natação, o treinamento foi realizado por um período de 8 semanas, no qual os animais treinavam cinco dias

consecutivos com intervalo de dois dias de repouso. Por outro lado, os animais iniciaram o treinamento correndo à velocidade de 10 metros/minuto durante 1 hora, tempo mantido até o final do treinamento. Nas semanas seguintes os animais progrediram

com a intensidade até alcançar 20 metros/minuto na sexta semana, mantendo-se assim até o final do treinamento. Esta intensidade é reportada na literatura

como a FMEL para a corrida^{1,4}.



Figura 2. Esteira para ratos.

2.3. Medida da Pressão Arterial e Freqüência Cardíaca

Ao final do período de treinamento, foram obtidas medidas diretas da pressão arterial média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD) e freqüência cardíaca (FC) através da pressão de pulso. Para tal procedimento, 24 horas após a última sessão de treinamento os animais foram anestesiados com ketamina (30mg/kg) e xilazina (3mg/kg) e submetidos à cirurgia de implantação de um cateter de polietileno PE-50 acoplado a um PE-10 na artéria femoral através de uma incisão inguinal. Esta artéria foi canulada introduzindo a extremidade final do cateter de polietileno (PE-10)

previamente preenchido com solução de salina heparinizada (100U/ml) e ocluído com um pino metálico. A extremidade livre foi dirigida através de um trocater, sob a pele do dorso do animal até a posição médiocervical posterior, onde por meio de uma nova incisão, foi exteriorizada e fixada com um fio de sutura.

As medidas da pressão arterial e frequência cardíaca foram realizadas durante aproximadamente 50 minutos (20 minutos de estabilização e 30 minutos de registro) nos animais acordados 24 horas após a implantação do cateter, o qual foi conectado a um transdutor de pressão (modelo P23AA, Statham, USA) acoplado a um amplificador (modelo MP100, FUNBEC), registrado num software (“acqknowledge” para Windows; Biopac Inc.) e armazenadas no disco rígido de um computador.

2.4. Preparação do Plasma e Tecidos

Realizada a medida de pressão arterial, os animais foram sacrificados por decaptação e o sangue coletado em tubos de ensaio heparinizados contendo 50µl

de inibidores de proteases, à saber: pepstatin A (Sigma-Aldrich, EUA), fenilmetilsulfonilfluorido-PMSF (Sigma-Aldrich, EUA) e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA; Vetec, Brasil). Por conseguinte, o sangue foi centrifugado a 3000 rpm por 20 minutos, de onde o sobrenadante foi retirado e estocado a -80°C. Por fim, os ventrículos foram retirados, lavados em solução salina 0,9% e perfundidos através da aorta com solução krebs e estocados em formaldeído

10%, tampão fosfato pH 7,4; os átrios, rins e a gordura visceral retroperitoneal e mesentérica foram retirados e mergulhados em nitrogênio líquido, para posterior armazenamento a -80°C; as adrenais foram retiradas, lavadas em solução salina 0,9%, pesadas úmidas e mantidas em estufa a 96°C por 24 horas para realização do peso seco.

2.5. Dosagem de ANP

As dosagens de ANP foram realizadas por radioimunoensaio (RIE) de duplo anticorpo, conforme descrito por Gutkowska *et al.*⁵. O plasma foi descongelado em centrífuga a 4°C com velocidade de 13.500 rpm por 5 minutos e submetido à extração utilizando colunas Sep-Pak C18 (Waters Associates, Milford, MA), de acordo com o seguinte protocolo: primeiramente as colunas foram ativadas com 8ml de acetonitrila e lavadas com 8ml de acetato de amônio a 0,2% pH 4,0 (Figura 3). Por conseguinte, 1ml de plasma foi infundido na coluna, seguido de 5ml de acetato de amônio 0,2%. Por fim, o ANP absorvido foi eluído com 3ml de acetonitrila a 60% em acetato de amônio 0,2%, evaporado em centrífuga evaporadora (Speed-Vac, Eppendorf) e estocados em -20°C para o ensaio imunoreativo.

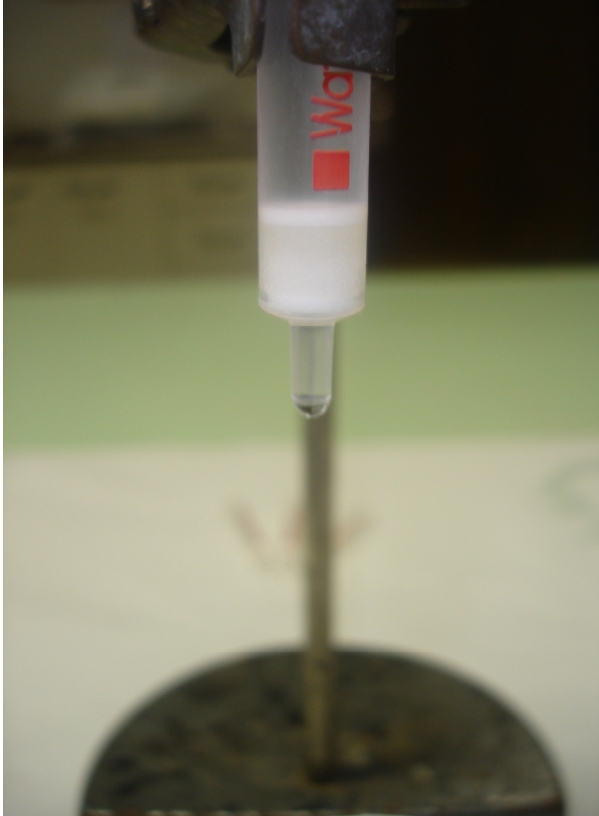


Figura 3. Processo ilustrativo de extração do ANP plasmático através de colunas Sep-Pak C18.

Para mensuração da concentração de ANP tecidual, cada metade dos átrios foi descongelada e colocada em um tubo preenchido contendo 0,1M de ácido acético com os inibidores de proteases: EDTA 10^{-5} M, PMSF 10^{-5} M e pepstatina 10^{-5} M. Em seguida, os tubos foram homogeneizados e cetrifugados a 20.000 x g durante 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi diluído em tampão fosfato (0,01mol/l fosfato de Sódio, 0,14mmol/l albumina bovina sérica, Triton X-100 0,1%, 0,1mol/l NaCl e azida sódica 0,01% a pH 7.4) para dosagem hormonal e protéica. A determinação do conteúdo de proteína no tecido foi realizada pelo método de Bradford⁶. Posteriormente, o homogenato passou por duas diluições seguidas: 20µl do sobrenadante do homogenato do átrio foi diluído em 1ml de solução tampão; 25µl desta diluição foi diluído em 1ml de solução tampão (1:2000). O RIE foi realizado com 100µl desta segunda diluição. Após incubação por 24 horas com 100µl do 1° anticorpo anti-ANP a

4°C, foi adicionado em todos os tubos 100µl de ^{125}I -ANP (8000cpm) e em seguida incubados por mais 24 horas. Por fim, a separação do imunocomplexo foi feita por precipitação com o 2º anticorpo soro de cabra anti gama-globulina de coelho. Após 2 horas à temperatura ambiente, foi adicionado 0,5ml polietileniglicol 6,25% em água destilada em todos os tubos. Então, os tubos foram centrifugados por 20 minutos a 3000rpm a 4°C. Aspirado o sobrenadante, a radioatividade do imunocomplexo precipitado foi determinada por contador gama (LKB) (Figura 4).



Figura 4. Contador gama.

2.5.1. Iodação do ANP

A iodação de ANP de rato (Ser¹⁰¹-Tyr¹²⁶) (Península Laboratories Inc, Belmont, CA, USA) foi feita pelo método de Lactoperoxidase com ^{125}I iodo sódico como descrito por Gutkowska *et al.*⁵. A purificação da fração monoiodinada foi feita por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

2.6. Expressão do Sistema do Peptídeo Natriurético

2.6.1. Isolamento do RNAm

O RNAm total foi extraído pelo método da Guanidina Isotiocinato obtidos dos átrios, rim, gordura visceral mesentérica e retroperitoneal conforme descrito previamente por Chomczynski e Sacchi⁷. A concentração do RNAm total foi determinada espectrofotometricamente (Genequant, General Electric, USA) a 260nm. A razão entre a leitura a 260nm e 280nm (A_{260}/A_{280}), permite estimar a quantidade de proteínas contaminadoras na solução, logo, determinando a eficácia da extração. A relação ideal entre A_{260}/A_{280} deveria estar entre 1,5 e 2,5, caso contrário a amostra foi descartada das análises da expressão gênica.

2.6.2. Real Time Quantitativo (Real Time - Polymerase Chain Reaction)

A expressão do ácido ribonucléico mensageiro (RNAm; do inglês *ribonucleic acid messenger*) do ANP, assim como de seus receptores, NPR-A e NPR-C, foi feita pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT – PCR; do inglês *Real Time - Polymerase Chain Reaction*) (Applied biosystems, USA). Cabe ressaltar, que foi realizada a expressão gênica do ANP nos átrios, dos receptores NPR-A e NPR-C nos rins e do receptor NPR-C na gordura visceral retroperitoneal e mesentérica.

Para o processo da transcrição reversa 5µl do RNAm de cada amostra total foi misturado em tubos plásticos a uma solução contendo os seguintes compostos: 17 µl de água dietilpirocarbonato (DEPC), 4 µl do primer reverso do gene alvo

(ANP ou NPR-A ou NPR-C), 4 μ l do primer reverso do gene normalizador (subunidade s26 ribossomal), 0,2 μ l de oligo dT, 0,5 μ l de desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP), 2 μ l de ditioneitol (DTT), 3,8 μ l de tampão e 0,2 μ l de solução contendo a enzima transcriptase reversa. Após este processo, os tubos plásticos foram aquecidos a uma temperatura de 40°C (Eppendorf, USA) durante 60 minutos e atingido a temperatura ambiente foram armazenados em -20°C.

É importante destacar no caso dos átrios, que previamente a transcrição reversa, foi aplicado um tratamento com DNase, processo que permite a eliminação destas enzimas da amostra. O tratamento foi feito misturando 0,5 μ g de RNAm total dos átrios, 4 μ l de água e 1 μ l de mix tampão contendo DNase (1:1). Esta mistura foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente e precisamente após este tempo foi adicionado EDTA encerrando a reação (este tempo foi respeitado para que não houvesse degradação de RNAm). Em seguida, as amostras foram aquecidas à 65°C durante 10 minutos. Construído o cDNA, foi feito o PCR em tempo real. Neste procedimento, 2 μ l de cDNA foram pipetados em duplicatas em poços de placas específicas para leitura no real time (Figura 5), ainda foram adicionados em cada poço 1,5 μ l primer sense (1pmol/ μ l) (Invitrogen), 1,5 μ l primer anti-sense (1pmol/ μ l) (Invitrogen), 10 μ l power Syber Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), 5 μ l de água DEPC e 2 μ l cDNA, totalizando um volume total de 20 μ l. Então, as placas foram lacradas e levadas ao aparelho para a leitura da expressão gênica em tempo real no termociclador (Figura 6).

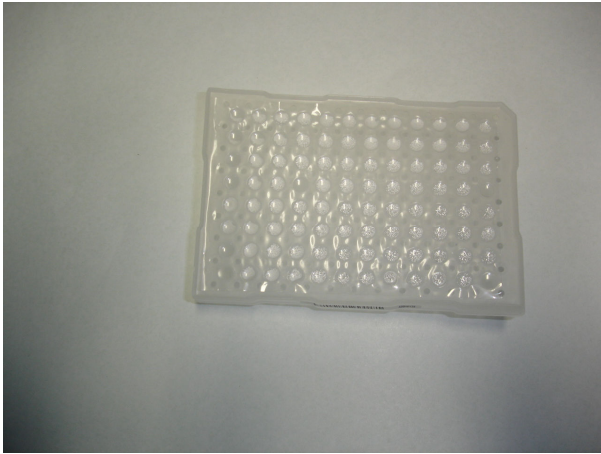


Figura 5. Placas



Figura 6. Termociclador em tempo real

2.7. Ensaio de ligação a receptores

Estes experimentos foram realizados utilizando a técnica de autoradiografia. Esta técnica permite não só a imagem autorradiográfica da ligação do peptídeo ao seu sítio de ligação no tecido como também sua qualificação e/ou quantificação. Para isso é necessário o uso de marcadores foto-sensíveis que são obtidos ou por radioisótopos ou por substâncias fluorescentes. No nosso trabalho, o marcador usado foi o radioisótopo 125 Iodo. Os resultados foram analisados através de um Phosphor-Imager (FUJI FILM BAS – 1800II) e quantificados pelo programa computadorizado Image Gauge 3.12. Para os experimentos de ligação (“binding”) do peptídeo ao seu receptor foram feitos cortes de congelação dos tecidos adiposos retroperitoneal e mesentérico, além do tecido renal. Foram utilizadas lâminas de vidro gelatinadas previamente. Para os tecidos adiposos a temperatura do criostato para a realização dos cortes foi em torno de -30°C enquanto que para o tecido renal, a temperatura do criostato variou entre -16°C e -19°C . A espessura dos cortes foi de $14\ \mu\text{m}$ e

teve-se o cuidado de realizar os cortes de forma seriada (\pm cortes/lâminas conforme quantidade de tecido). As lâminas foram identificadas e armazenadas a -80°C até o ensaio.

2.7.1. Autorradiografia

As lâminas escolhidas para o ensaio foram colocadas em “racks” para a pré-incubação por 15 minutos em temperatura ambiente, em solução contendo 50nM de Tris-HCl, pH 7,4 e 0,1% PEI (polietilnimine) (Figura 7). O tampão ensaio, Tris-HCl 50mM, pH 7,4, contendo 150mM NaCl; 5mM MgCl_2 , 40 $\mu\text{g/ml}$ de Bacitracina (Sigma), 0,5% de albumina bovina sérica (BSA, Sigma) e 50 pM de ^{125}I -ANP (20.000 com/100 μl) foi preparado imediatamente antes do uso. A radioatividade do peptídeo marcado foi determinada pelo contador gama (LKB).

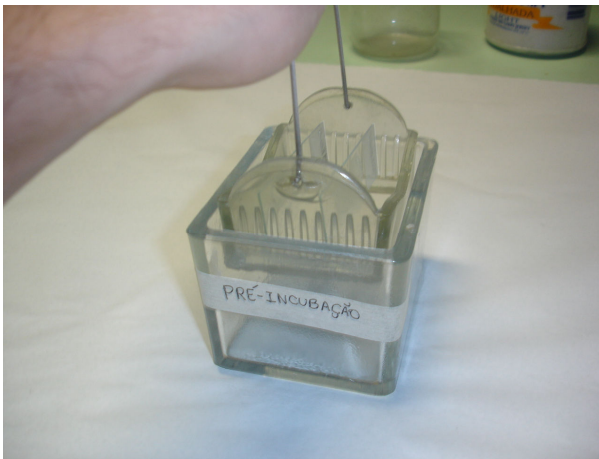


Figura 7. Racks sendo pré-incubadas em solução.

Para experimentos de ligação competitiva, diferentes concentrações (10^{-12} a 10^{-6}M) de peptídeos não-iodados, ANP ($\text{Arg}^{99}\text{-Tyr}^{126}$) e c-ANF (des-[$\text{Glu}^{116}\text{-Ser}^{117}\text{-Gly}^{118}\text{-Leu}^{119}\text{-Gly}^{120}$]) foram utilizadas. Após a pré-incubação, as lâminas foram

escorridas e secas suavemente. Numa superfície plana, as lâminas foram dispostas e identificadas adequadamente. A seguir, cada corte de tecido foi coberto pela solução, utilizando pequenos volumes (100 a 200 μ l) de cada diluição pré-preparada. O tempo de incubação foi de 1 hora; durante esse período, as lâminas permaneciam cobertas para se evitar a evaporação. Após a incubação, as lâminas foram escorridas individualmente com bastante cuidado para se evitar contato entre elas, assim como a contaminação da mesa de trabalho. Por conseguinte, estas foram colocadas em “racks” e lavadas 4 vezes, por 1 minuto cada lavagem, em tampão Tris-HCl gelado e finalmente, rapidamente, passadas em água destilada gelada para a remoção de sais. As lâminas foram então secadas com jato de ar frio. Ao término, as lâminas foram dispostas para a sensibilização das telas por 24-48 horas. Após esse período, as telas sensibilizadas foram escaneadas pelo Phosphor-Imager (Figura 8) e os dados analisados pelo programa computadorizado Image Gauge 3.12.



Figura 8. Phosphor Image

2.8. Análise Estatística

Os resultados são apresentados como média \pm erro-padrão da média. Previamente à aplicação da estatística inferencial, foi feito o teste de Shapiro-Wilk para elucidar se a amostra apresentava distribuição normal. Desta forma, como todas as variáveis tiveram distribuição normal, foi adotado análise de variância (ANOVA) de uma-via e caso fosse constatado diferença entre os grupos, esta foi identificada utilizando-se o pós-teste de Tukey. Diferença estatisticamente significativa foi considerada quando $p < 0,05$.

REFERÊNCIAS

1. Manchado, F.B.; Gobatto, C.A.; Contanterze, R.V.L.; Papoti, M.; de Mello, M.A.R. Máxima fase estável de lactato é ergômetro-dependente em modelo experimental utilizando ratos. **Rev Bras Med Esporte**, Brasil, v.12, n.5, p.259-62, 2006.
2. Voltarelli, F.A.; Gobatto, C.A.; de Mello, M.A.R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Braz J Med Biol Res**, Brasil, v.35, n.11, p.1389-94, 2002.
3. Gobatto, C.A.; de Mello, M.A.R.; Sibuya, C.Y.; de Azevedo, J.R.M.; dos Santos, L.A.; Kokubun, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.130, p.21-27, 1996.
4. Manchado, F.B.; Gobatto, C.A.; Contarteze, R.V.L.; Papoti, M.; De Mello, M.A.R. Maximal lactate steady state in running rats. **Journal of Exercise Physiology**, v.8,n.4, p.29-35, 2005.
5. Gutkowska, J.; Genest, J.; Thibault, G.; Garcia, R.; Larochelle, P.; Cusson, J.R.; Kuchel, O.; Hamet, P.; De Lean, A.; Cantin M. Circulating forms and radioimmunoassay of natriuretic factor. **Endocrinol Metabol Clin N Am**, v.16, p.183-98, 1987.
6. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, p.248-54, 1976.
7. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by Acid Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**, v.162, p.155-159, 1987.

RESULTADOS

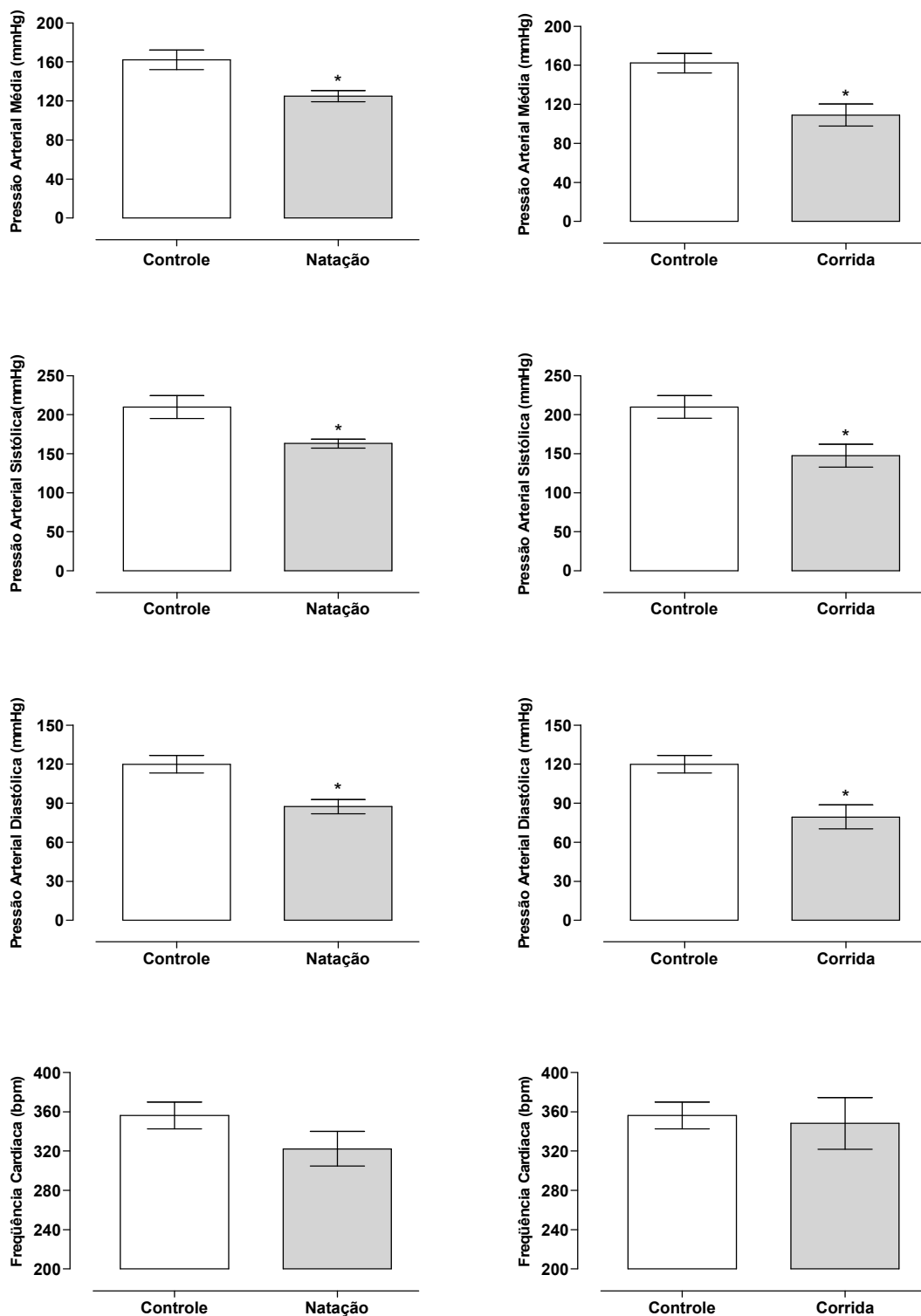


Figura 1. Valores de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca FC, dos grupos controle (CON), corrida (COR) e natação (NAT). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs controle (teste t para amostras independentes).

Na figura 1, podem ser observados os valores de pressão arterial e frequência cardíaca. O grupo natação quando comparado com o grupo controle apresentou menores valores de pressão arterial média ($125 \pm 5,89$ vs $162 \pm 10,01$, diminuição de 29,6%), pressão arterial sistólica ($163 \pm 5,77$ vs $210 \pm 14,62$, diminuição de 28,8%) e pressão arterial diastólica ($87 \pm 5,50$ vs $119 \pm 6,72$, diminuição de 36,7%). Similarmente, o grupo corrida quando comparado com o grupo controle, apresentou menores valores de pressão arterial média ($109 \pm 11,28$ vs $162 \pm 10,01$, diminuição de 48,6%), pressão arterial sistólica ($147 \pm 14,88$ vs $210 \pm 14,62$, diminuição de 42,8%) e pressão arterial diastólica ($79 \pm 9,21$ vs $119 \pm 6,72$, diminuição de 50,6%). Por outro lado, tanto o grupo natação ($322 \pm 17,63$ vs $356 \pm 13,66$, diminuição de 10,5%), quanto ao grupo corrida ($348 \pm 26,22$ vs $356 \pm 13,66$, diminuição de 2,2%), não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle nos valores de frequência cardíaca.

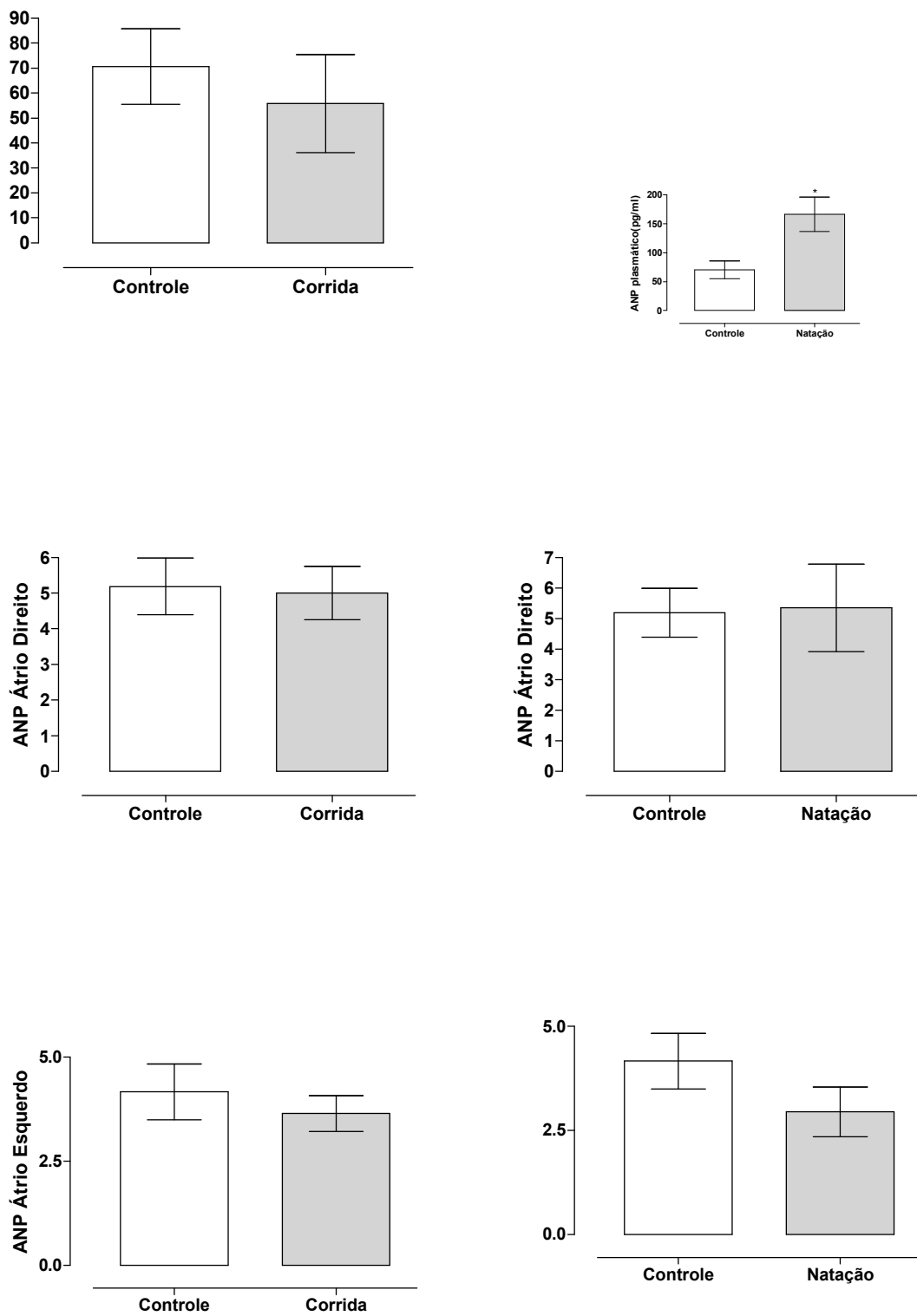


Figura 2. Valores de peptídeo natriurético atrial no plasma (ANP plasmático), ANP no átrio direito e ANP no átrio esquerdo, dos grupos controle (CON), corrida (COR) e natação (NAT).

Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs controle (teste t para amostras independentes).