

**Artigo original****Determinação da histamina no coração de ratos exercitados*****Determination of heart histamine in trained rats***

Marília Mantovani Sampaio Barros<sup>a</sup>, José Roberto Moreira de Azevedo<sup>b</sup>, Carlos Alberto Anaruma<sup>2</sup>, Eduardo Kokubun<sup>b</sup>, Rui Errereias Maciel<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, SP

<sup>b</sup>Departamento de Educação Física do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP

**Resumo**

Este trabalho comparou os níveis de histamina (HA) no coração de ratos submetidos aos exercícios físicos agudo e prolongado de natação com os níveis de HA no coração de ratos sedentários (controles). A eficácia do treinamento foi confirmada pela histologia e a determinação dos níveis de HA foi realizada pelo método fluorimétrico. A respeito do exercício agudo, houve diminuição do nível de HA no coração de ratos sedentários  $1,43 \pm 0,3164$  mg/g (N = 10) em comparação com o respectivo controle  $2,15 \pm 0,3505$  mg/g (N = 08). Houve também diminuição dos níveis de HA no coração de animais treinados em repouso,  $1,42 \pm 0,6130$  mg/g (N = 07), em comparação com o grupo controle  $2,15 \pm 0,3505$  mg/g (N = 08). O critério de significância estatística foi  $p < 0,05$ . Estes resultados sugerem que a HA pode participar da homeostasia microcirculatória de corações de ratos sedentários durante o exercício agudo de natação e de ratos treinados em repouso.

**Abstract**

This research compared the HA levels in cardiac muscle of rest rats (controls) with the same muscles on physical exercise: short term (ST) and long-term swimming (T). The efficacy of T was confirmed by histologic method (H/E). The determination of the HA levels was done by fluorimetric assay. Regarding ST exercise, the decrease of the HA level  $1,43 \pm 0,3164$  mg/g (N = 10) in comparison with control  $2,15 \pm 0,3505$  mg/g (N = 08) was significant. There was also significant decrease of the HA levels in T group of cardiac muscle in rest  $1,42 \pm 0,6130$  mg/g (N = 07) in comparison with control group  $2,15 \pm 0,3505$  mg/g (N = 08). The statistical significance was  $p < 0,05$ . These results suggest that there was moderate hypertrophy in gastrocnemius muscles samples by T. The HA can mediate the microcirculatory homeostasis of cardiac muscle in ST exercise of controls rest rats and hearts of T rest rats.

**Palavras-chave:**  
coração,  
natação,  
histamina

**Key-words:**  
heart,  
swimming,  
histamine

**Endereço para correspondência:**

Marília Mantovani Sampaio Barros, Rua Dr. Quirino, n. 1001/apto. 24, 13015-081  
Campinas - São Paulo, Tel: (19) 3231-3970, E-mail: psbarros@bestway.com.br

## Introdução

No coração foram realizados os primeiros estudos sobre a natureza da mediação histamínica. No sistema cardiovascular do homem, a histamina (HA) tem efeitos circulatórios diretos, como na vasodilatação (rubor) e na queda da resistência periférica, com conseqüente diminuição da pressão arterial. Dentre os efeitos cardíacos relacionados a esta amina, estão presentes o inotropismo e o cronotropismo positivos e, em altas concentrações, arritmias [1].

O fato da HA ser considerada um *autacóide* representa uma classificação funcional pouco precisa. Enquanto os *autacóides* possuem uma larga amplitude de atividades farmacológicas e duração breve em pequenas quantidades, o papel fisiológico da HA e sua auto-regulação coronária, ainda não estão completamente elucidados [2].

Considerando a possível função histamínica na homeostasia microcirculatória, o presente trabalho determinou o conteúdo de HA no coração de ratos controles e comparou 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.

## Material e métodos

Foram utilizados 35 ratos (*Rattus norvegicus*, Hannover, var. albina) Wistar, machos, com cerca de 90 dias de idade (adulto) e peso entre 200 e 250 gramas. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (no máximo de 05 ratos por gaiola), em sala climatizada com controle de temperatura (entre 24 °C - 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.

### Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos em 04 grupos experimentais para determinação do conteúdo de HA no tecido cardíaco. **Grupo 1:** Sedentário-Repouso (**SED-R**): animais mantidos em condições sedentárias (repouso) no cativeiro até o sacrifício - controles; **Grupo 2:** Seden-

tário-Agudo (**SED-A**): animais mantidos em condições sedentárias no cativeiro, que realizaram exercício agudo de natação durante 60 minutos, com resistência de 8 a 10% 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 a 10% do peso corporal, 60 minutos/dia, 05 dias/semana, durante 45 dias, e que foram mantidos em repouso (24:00 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 a 10% do peso corporal, imediatamente antes do sacrifício.

### Características do treinamento físico

Antecedendo o período de treinamento físico propriamente dito, os ratos foram submetidos a uma fase de adaptação à natação. Nessa fase os três primeiros dias de natação tinham a duração de 60 minutos de nado livre. O período de resistência corporal era aumentado de dez minutos a cada três dias, após o quarto dia de adaptação, até completar 21 dias do marco inicial da adaptação.

A fase de treinamento consistia de 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.

Esse 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°C ± 1) e, devido a sua profundidade, impossibilitavam que o animal apoiasse sua cauda no fundo dos mesmos. As sessões foram realizadas sempre no mesmo horário, com 10 animais nadando simultaneamente.

### Procedimento e técnica histológica

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

A seguir, foram fixados, para dissecação e pesagem do coração e dos músculos gastrocnêmios. O coração, sem discriminação

dos átrios e ventrículos, foi destinado à determinação do conteúdo histamínico.

As amostras ventro-mediais do músculo gastrocnêmio, 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 corte transversais de fibras musculares de 07 mm, no criostato. Esses cortes foram colhidos em lamínulas e corados pela técnica H/E [3].

Com auxílio de câmara clara e planímetro, foram medidas as áreas dos perfis de 80 fibras musculares dos músculos dos grupos dos ratos sedentários e treinados, a fim de se verificar o grau de hipertrofia muscular produzido pelo exercício [4].

#### *Determinação do conteúdo histamínico*

A determinação do teor de HA em cada amostra de tecido cardíaco foi realizada por meio de análise fluorimétrica [5], com pequenas modificações, visando obter maior sensibilidade e especificidade.

#### *Análise estatística*

Os resultados provenientes desse estudo foram analisados empregando-se o teste *t* de Student para amostras não-pareadas (quando os grupos experimentais foram comparados com seus respectivos controles) e o teste de Mann-Whitney (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.

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

Em todos os testes foram considerados como indicativos de significância estatística valores de *p* menores ou iguais a 0,05 ( $p < 0,05$ ) [6].

## **Resultados**

### *Varição semanal da massa corporal*

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

A variação semanal da massa corporal nestes grupos demonstrou que, embora ambos os grupos ganhassem massa corporal durante o período estudado, houve uma tendência a maiores valores no grupo sedentário (Fig. 1).

### *Relação entre a massa das amostras e a massa corporal*

A análise entre a massa úmida das amostras de corações 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.

A análise estatística destas relações não revelou significância entre esses resultados.

### *Análise histológica dos músculos gastrocnêmios*

A Tabela 1 indica as médias das áreas das secções transversais das fibras musculares (músculo gastrocnêmio), revelando um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nas áreas das fibras referentes aos grupos dos animais treinados, quando comparados aos animais sedentários.

### *Conteúdo de HA no músculo cardíaco*

A análise estatística das médias das concentrações de HA, obtidas das amostras de músculo cardíaco, está representada na Tabela 2. Observa-se em animais sedentários-reposo (SED-R), que a média de concentração de HA encontrada ( $2,15 \pm 0,3505$ ) foi maior que a desse grupo de animais, quando exercitados agudamente ( $1,43 \pm 0,3164$ ) ( $p < 0,05$ ).

Nos grupos treinados, seguindo a mesma relação anterior, nota-se que a média de concentração de HA encontrada no grupo treinado-reposo (TRE-R) ( $1,42 \pm 0,6130$ ) foi menor quando comparada à dos animais sedentários-reposo (controles) SED-R ( $2,15 \pm 0,3505$ ) ( $p < 0,05$ ).

## **Discussão**

### *Método*

A opção pela técnica do ensaio fluorimétrico [5], visando estimar o teor de HA dos tecidos cardíacos pesquisados, baseou-se no fato de ser uma técnica simples e precisa, continuamente

Fig. 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.

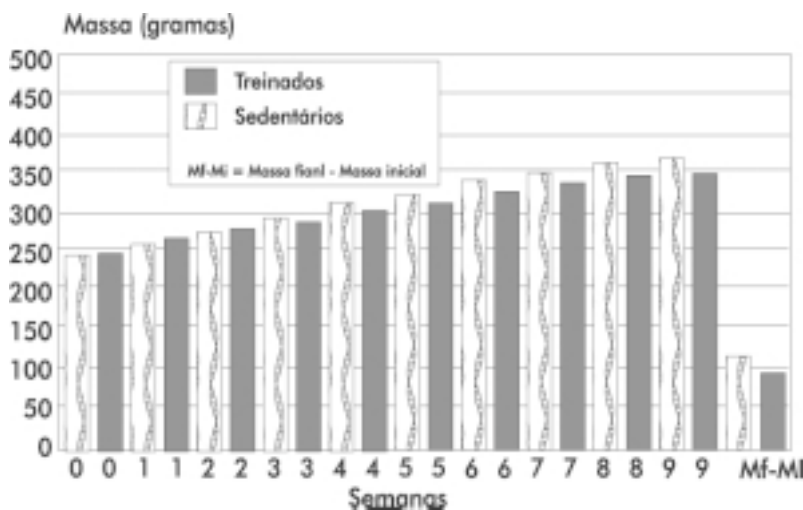


Tabela 1 - Médias das áreas das secções transversais das fibras musculares do ventre medial, do músculo gastrocnêmio. Valores expressos como média e desvio padrão. \*Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparados com o grupo dos sedentários. N = número de ratos.

Ratos	N	Área (mm <sup>2</sup> )
Sedentários	80	4393,30 ± 522,0
Treinados *	80	5200,00 ± 608,6

Tabela 2 - Concentração de HA do músculo cardíaco. Resultados expressos em média e desvio padrão. \*Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo sedentário-reposo.

GRUPOS	N	HISTAMINA (mg/g)
SED-R	08	2,15 ± 0,3505
SED-A*	10	1,43 ± 0,3164
TRE-R*	07	1,42 ± 0,6130
TRE-A	10	1,78 ± 0,8108

aperfeiçoada, no sentido de se tornar mais sensível, reprodutível e específica. O método fluorimétrico nos proporcionou excelentes condições para a quantificação da HA cardíaca.

#### Grupos experimentais

Foram utilizados ratos em idade adulta, porque essa é uma espécie que apresenta capacidade de formação de histamina (HFC) nos tecidos investigados, resultante da contração muscular [7].

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 e menor índice de *stress* emocional no animal [8]. Esse 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 a 8 - 10% do peso corporal, e período de tempo de 60 minutos de duração.

A temperatura da água era mantida em torno de  $31^{\circ}\text{C} \pm 1$ , a fim de não comprometer a força muscular do animal [9], não havendo reaquecimento da água do tanque durante a sessão de natação.

Baseado nos efeitos fisiológicos primitivos da HA, nos efeitos comumente relevantes à regulação local da reação inflamatória e fisiopatológicos [10, 11], foi investigada a associação dessa amina biogênica às trocas microcirculatórias no tecido cardíaco durante o repouso e no exercício de curta e de longa duração, condições não patológicas, motivo de esquematização dos grupos experimentais propostos.

#### Variação semanal da massa corporal

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.

### Exame microscópico

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 desse músculo, frente ao exercício prolongado aplicado aos animais [4].

### Concentração de HA no coração

Obtivemos médias de concentrações de HA para o coração em animais controles, entre os valores 1,7-2,5 mg/g conforme os achados de [12].

Em músculo gastrocnêmio, foi estatisticamente significativa uma redução do nível basal de HA nos grupos SED-A e TRE-R em relação ao grupo controle SED-R ( $p < 0,05$ ). Acredita-se que uma provável hipertrofia cardíaca, provocada pelo treinamento físico, possa ter induzida proliferação microcirculatória tecidual [13], e esta, por sua vez, metabolize a HA mais rapidamente. A HA liberada na circulação pode ser removida pelo próprio músculo liso do tecido vascular [14, 15].

Estes resultados concordam com os achados de 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, por exemplo [16-18].

### Conclusão

A HA pode participar da homeostasia microcirculatória de corações de ratos sedentários durante o exercício agudo de natação e de ratos treinados em repouso.

### Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Aquiles E. Piedrabuena, pelos conhecimentos estatísticos; ao Prof. Dr. Sérgio de Moraes, pelo espectrofotofluorímetro; à Prof<sup>a</sup> Eleonora E. Abra Blanco, pelos ensinamentos técnicos; ao Dr. Percival D. Sampaio Barros, pela revisão ortográfica; aos

técnicos Clarice Y. Sibuya, Eduardo Custódio, José Roberto R. da Silva e Manuel J. de Oliveira; ao CNPq e ao FAEP, pelo suporte financeiro.

### Referências

1. Henrichsen H, Halabi A, Kirch W. Clinical aspects of cardiovascular effects of H<sub>2</sub>-receptor antagonists. *J Clin Pharmacol* 1995;35:107-116.
2. Kostic MM, Jakovljevic VLJ. Role of histamine in the regulation of coronary circulation. *Physiol Res* 1996;45:297-303.
3. Dubowitz V, Brooke MH. Muscle biopsy: a modern approach. London: Saunders, 1973. p. 475.
4. Sampaio-Barros MM, Azevedo JRMA, Kokubun E *et al*. Dosagem histamínica muscular de ratos exercitados. *Rev Paul Educ Fís* 1995;9(1):3-9.
5. Shore PA, Burkhalter A, Cohn VH. A method for the fluorimetric assay of histamine in tissues. *J Pharmacol Exp Ther* 1959;127:182-186.
6. Roscoe JT. Fundamental research statistics for the behavioral sciences. 2 ed, Holt: Rinehart and Winston, 1975. p. 217-223; 230-237.
7. Graham P, Kahlson G, Rosengren E. Histamine formation in physical exercise, anoxia and under the influence of adrenaline and related substances. *J Physiol* 1964;172:174-188.
8. Harpur RP. The rat as a model for physical fitness studies. *Comp Biochem Physiol* 1980;66A:553-574.
9. Noble MIM. Enhancement of mechanical performance of striated muscle by stretch during contraction. *Exp Physiol* 1992;77:539-552.
10. Babe Jr KS, Serafin WE. Histamine, bradykinin, and their antagonists. In: Hardman JG, Goodman GA, Limbird LE. The pharmacological bases of therapeutics. 9<sup>th</sup> ed, New York: Mc Graw-Hill, 1996. p. 581-600.
11. Hatta E, Yasuda K, Levi R. Activation of histamine H<sub>3</sub> receptors inhibits carrier-mediated norepinephrine release in a human model of protracted myocardial ischemia. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;283(2):494-500.
12. Feldberg W, Talesnik J. Reduction of tissue histamine by compound 48/80. *J Physiol* 1953;120:550-568.
13. Bigard AX, Brunet, A., Guezennec, C. Y. *et al*. Effects of chronic hypoxia and endurance training on muscle capillarity. *Pflügers Arch* 1991; 419:225-232.
14. Langeler EG, Snelting-Havinga I, Van Hinsbergh VW. Passage of low density lipoproteins through monolayers of human arterial endothelial cells. Effects of vasoactive substances in an *in vitro* model. *Arteriosclerosis* 1989;9:550-559.
15. Liao W, Rudling M, Angelin B. Novel effects of histamine on lipoprotein metabolism: suppression of hepatic low density lipoprotein receptor expression and reduction of plasma high density lipoprotein cholesterol in the rat. *Endocrinology* 1997;138(5):1863-1870.

16. Parikh V, Singh M. Resident cardiac mast cells and the cardioprotective effect of ischemic preconditioning in isolated rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997;30(2):149-156.
17. Malinowska B, Godlewski G, Schlicker E. Histamine H-3 receptors - general characterization and their function in the cardiovascular system. *J Physiol Pharmacol* 1998;49(2):191-211.
18. Pang XZ, Alexacos N, Letourneau R *et al.* A neurotensin receptor antagonist inhibits acute immobilization stress-induced cardiac mast cell degranulation, a corticotropin-releasing hormone-dependent process. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;287(1):307-314.

---

**Indique a um colega  
a revista**

**Fisioterapia Brasil**

Tel.: (21) 244-6471

---