

ALEXANDRE SÉRGIO SILVA

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO ASSOCIADO À SUPLEMENTAÇÃO DE
L-ARGININA NA RESPOSTA RELAXANTE DE ARTÉRIA FEMORAL DE
RATOS**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Motricidade, área de Biodinâmica da Motricidade Humana.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Angelina ZanESCO

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Fernanda Bruschi Marinho Priviero

Rio Claro – SP

2009

ALEXANDRE SÉRGIO SILVA

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO ASSOCIADO À SUPLEMENTAÇÃO DE
L-ARGININA NA RESPOSTA RELAXANTE DE ARTÉRIA FEMORAL DE
RATOS**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Motricidade, área de Biodinâmica da Motricidade Humana.

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Angelina ZanESCO
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Prof. Dr. Edson Antunes
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Prof. Dr. Adelino Sanchez Ramos da Silva
Escola de Educação Física e Esportes de Ribeirão Preto-USP

Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Profs. Dra. Camila de Moraes
Universidade Cruzeiro do Sul

Rio Claro, _____ de _____ de 2009.

DEDICATÓRIA

À minha esposa, Renata, pela paciência e compreensão. E pelo quanto se dedicou junto comigo a este projeto, suportando amavelmente as dores da solidão em prol desta causa. E aos meus pais, Euclides e Guia, e todos os meus irmãos, pelas constantes e intensas orações.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao meu Bom e justo DEUS, que tem me conduzido pelos melhores caminhos ao longo de todas as empreendidas de minha vida. Neste doutoramento, manteve sua demonstração de amor, colocando as melhores pessoas e oportunidades em meu caminho.

À minha orientadora Profa. Dra. Angelina Zanesco. A expressão material das pessoas que Deus colocou em meu caminho. Pela sabedoria ao lidar comigo de forma a me fazer produzir da melhor forma possível, pelas preciosas orientações técnicas, pelo terno acolhimento. Mais que tudo, pela admirável dedicação prestada. Estendo o agradecimento ao Prof. Dr. Edson Antunes, por seu acolhimento e valiosas instruções que asseguraram o bom encaminhamento deste trabalho.

À Dra Fernanda Priviero, pelo grande apoio que garantiram minha capacitação técnica para o desenvolvimento deste trabalho.

À UEPB, que gentilmente ofereceu-me esta oportunidade ímpar em minha vida.

Aos colegas Júlio, Fabíola, Haroldo, Mário, Bau, Andréa, Rodrigo, Celso, Luiz, Fábio e Fernanda Del. Receberam-me com grande empatia e sanaram minhas dúvidas em inúmeros momentos, sem jamais demonstrar qualquer hesitação.

RESUMO

O treinamento físico é considerado uma importante ferramenta no tratamento não farmacológico da hipertensão arterial por promover relaxamento vascular através de vários mecanismos. A L-arginina também tem sido relacionada a melhoria da função endotelial e vasorrelaxamento. No entanto, a influência do exercício físico e da L-arginina na resposta vasodilatadora mediada pelos adrenocetores β adrenérgicos vasculares ainda não está esclarecida. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos de um programa de treinamento físico e da suplementação de L-arginina na reatividade vascular da artéria femoral de ratos Wistar. Animais com idade de 12 semanas foram randomicamente divididos em quatro grupos: sedentários (SD), treinados (TR), sedentários que suplementaram L-arginina (SD-ARG), e treinados que suplementaram L-arginina (TR-ARG). Os grupos treinados realizaram exercício de corrida em esteira durante um mês, cinco dias por semana, em sessões com duração de 60 minutos, e velocidade de 1,2 Km/h. Os grupos suplementados tiveram 1,25 g de L-arginina adicionado a cada litro da água de beber, pelo mesmo período do protocolo de treinamento físico. Quarenta e oito horas após o protocolo experimental, os animais foram sacrificados, e suas porções proximais da artéria femoral direita foram dissecadas e colocados em solução de Krebs-Ringer. Curvas concentração-efeito foram feitas para o isoproterenol (1nM – 10uM), após pré contração com fenilefrina (1 uM) em anéis íntegros ou desnudados de endotélio. Observou-se que a combinação de Treinamento físico e suplementação de L-arginina, promoveu redução significativa do peso corporal dos animais, sem que treinamento ou suplementação isoladamente promovessem o mesmo efeito. A sensibilidade β -adrenérgica se mostrou significativamente reduzida com o treinamento físico, isoladamente ou associado à suplementação com L-arginina, em nível de pEC_{50} (SD= 7,13 \pm 0,05; TR= 6,93 \pm 0,03; SD-ARG= 7,22 \pm 0,02; TR-ARG= 6,90 \pm 0,01), sem alteração na resposta máxima (SD = 96 \pm 0,9; TR= 97 \pm 1,1; SD-ARG= 95 \pm 1,3; TR-ARG= 97 \pm 1,3, com $p > 0,05$). No entanto, o desvio á direita das curvas destes das artérias destes animais foi de apenas 1,6 e 1,7 para TR e TR-AR em relação à SD. Além disso, curvas feitas em anéis desprovidos de endotélio restauraram a resposta relaxante destes animais treinados a valores similares ao que foi obtido pra o grupo SD. Curvas ao isoproterenol feitas na presença do antagonista β_1 CGP 20712A promoveram um deslocamento à direita na curva de 9 vezes para os animais do grupo SD e cerca de 3 a 5 vezes para os demais grupos. A remoção do endotélio aumentou o desvio em todos os grupos de animais, para uma faixa entre 6,2 e 13,2. Quando as curvas foram realizadas na presença do antagonista β_2 ICI 118551, o deslocamento à direita foi bem menor, variando em cerca de 1,0 a 2,0 entre os grupos. Concluimos que a artéria femoral de ratos medeia as respostas relaxantes ao isoproterenol por meio dos receptores adrenérgicos β_1 e que o treinamento físico promove redução da sensibilidade destes receptores adrenérgicos ao agonista isoproterenol

Palavras-chave: β adrenocetores, exercício físico, suplementação, L-arginina

ABSTRACT

Physical training is an important tool as a non pharmacological treatment of the arterial hypertension because of its several mechanisms which promote vasorelaxation. L-arginine is reported to improve either endothelial function or vascular relaxation. However, the influence of the physical exercise associated with L-arginine supplementation in the vascular relaxation mediated by vascular β adrenoceptores is not elucidated. The aim of this study was to investigate the effects of the physical training and L-arginine supplementation in the reactivity of femoral artery. Male Wistar rats (12 weeks old), were randomly separated in four groups: sedentary (SD), trained (TR), sedentary plus L-arginine supplementation (SD-ARG) and Trained plus L-arginine supplementation (TR-ARG). Physical exercise consisted in a running program in a motor-driven treadmill during 4 weeks, 5 days per week, 60 minutes per session, in a speed of 1.2 Km/h. L-arginine was administered during 4 weeks in the drinking water (1.25 g/L), starting concomitantly with the exercise program. Animals were sacrificed 48 hours after the last session of exercise and the proximal segments of the femoral artery were removed and placed in Krebs-Ringer solution. Concentration–response curves were obtained to isoproterenol (1nM – 10uM), in rings with intact or denuded endothelium, precontracted with phenylephrine (1uM). The association of physical training and L-arginine supplementation resulted in a significant decrease in the body weight. However, physical training or L-arginine alone did not promote the same effect. The β -adrenergic receptors sensitivity was significantly decreased after physical training or L-arginine supplementation at the pEC_{50} level (SD: 7.13 ± 0.05 ; TR: 6.93 ± 0.03 ; SD-ARG: 7.22 ± 0.02 ; TR-ARG: 6.90 ± 0.01), with no changes in the maximal responses (SD: 96 ± 0.9 ; TR: 97 ± 1.1 ; SD-ARG: 95 ± 1.3 ; TR-ARG: 97 ± 1.3 , $p > 0.05$). However, the rightward shifts were only 1.6 and 1.7 to TR and TR-ARG in comparison to SD. Moreover, in endothelium denuded rings, the relaxant response was restored to similar values as compared with SD group. In the presence of the β_1 -adrenergic receptor antagonist CGP 20712A, it was observed a 9-fold rightward shift in SD group whereas a 3 to 5-fold rightward shift was seen in the other groups. In endothelium denuded rings, the rightward shift was increased in all groups (6.2 to 13.2). The β_2 -adrenergic receptor antagonist ICI 118551 promoted a slight rightward shift (1.0 to 2.0). We concluded that the relaxant response to isoproterenol in the femoral artery occurred through β_1 -adrenergic receptors and physical training promoted a decrease in the β -adrenergic receptor sensitivity.

Key words: B adrenoceptores, physical exercise, supplementation, L-arginine.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	iii
Agradecimentos.....	iv
Resumo	v
1-INTRODUÇÃO	9
2-REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1- Músculo liso vascular e endotélio	11
2.2- Exercício físico.....	15
2.3- As catecolaminas e os adrenoceptores	17
2.3.1- Sensibilidade às catecolaminas.....	20
2.3.2- Sistema de recaptção e metabolização das catecolaminas	20
2.3.3- Afinidade de agonistas	21
2.3.4- Dessensibilização do receptor	22
2.3.5- Desacoplamento.....	22
2.3.6- Sequestro	23
2.3.7- Regulação negativa	23
2.3.8- Regulação positiva	24
2.4- Receptores β -adrenérgicos vasculares e exercício físico.....	24
2.5- Mecanismos de ação dos receptores β adrenérgicos	26
2.5.1- Via de sinalização AMPc – proteína kinase A.....	26
2.5.2- Via de sinalização por ativação de canais de potássio dependente de cálcio.....	27
2.5.3- Via de sinalização do óxido nítrico GMPc.....	28
2.5.4- Exercício físico e resposta vasodilatadora: participação dos β -adrenoceptores.....	29
2.6- Suplementação de L-Arginina (L-Arg)	31
2.7- Estudos com artérias periféricas.....	33
3- JUSTIFICATIVA	35
4- HIPÓTESE	37
5- OBJETIVOS	38
4- METODOLOGIA.....	39
4.1- Animais.....	39

4.2- Programa de treinamento físico: corrida em esteira	40
4.3- Suplementação com L-arginina	41
4.4- Anéis isolados de artéria femoral.....	41
4.5- Curvas concentração-efeito ao isoproterenol na presença e na ausência de endotélio	42
4.6- Curvas concentração-efeito ao isoproterenol na ausência e na presença de antagonistas seletivos para os receptores β -adrenérgicos de anéis de artéria femoral com endotélio intacto ou removido	43
Análise estatística.....	43
5- RESULTADOS	45
5.1- Propriedades farmacológicas de anéis de artéria femoral nas porções proximal e distal.....	45
5.2- Peso corporal, ingestão alimentar e hídrica dos animais.....	47
5.3- Respostas à fenilefrina e acetilcolina.....	50
5.4- Curvas concentração-efeito ao isoproterenol em artéria femoral com ou sem endotélio	50
5.5- Curvas concentração-efeito ao isoproterenol em anéis de artéria femoral na presença do antagonista seletivo β_1 CGP 20712A com ou sem endotélio	53
5.6- Curvas concentração-efeito ao isoproterenol em anéis de artéria femoral na presença do antagonista seletivo β_2 ICI 118551 na presença e na ausência de endotélio	58
6- DISCUSSÃO	63
SUMÁRIO DOS RESULTADOS	69
CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS	71

1- INTRODUÇÃO

Os benefícios conferidos pelo treinamento físico sobre o sistema cardiovascular são notórios e bem documentados. Um dos efeitos mais estudados é a redução da pressão arterial. O treinamento aeróbio promove redução de 2 a 17 mmHg na pressão arterial sistólica e 2 a 7 mmHg na diastólica (FORJAZ et al., 2005). Mesmo uma única sessão de exercício já é capaz de reduzir a pressão arterial, de forma aguda, em valores similares aos que são encontrados como efeito crônico, sendo que este feito agudo se sustenta por períodos próximos a 24 horas, o que confere significância clínica para este fenômeno (BASTER e BASTER-BROOKS, 2005).

Os mecanismos envolvidos redução da pressão arterial induzida pelo exercício ainda não estão totalmente elucidados. Até o momento, sabe-se que mecanismos neurais e humorais estão envolvidos nesta resposta hipotensora. Vários estudos apontam para uma redução da atividade nervosa simpática, acompanhada de aumento parassimpático após o treinamento físico (KULICS et al., 1999), ou melhoria da sensibilidade dos barorreceptores (O'SULLIVAN e BELL, 2000; IELLAMO, 2001; GADEMAN et al., 2007). A concentração de catecolaminas plasmáticas também se mostra diminuída como resultado da prática de exercícios (GADEMAN et al., 2007). Estudos com modelos animais e humanos têm mostrado importante melhoria na atividade endotelial, com aumento da concentração plasmática ou urinária de nitrito/nitrato, redução da aterogênese e diminuição do estresse oxidativo (RUSH et al., 2003; FRANZONI et al., 2005; ROBERTS et al., 2006). Todos estes mecanismos em conjunto resultam em uma resposta relaxante, com consequente redução da resistência periférica e da pressão arterial.

Os adrenoceptores vasculares desempenham importante papel na resposta relaxante induzida pelo exercício, na medida em que alterações em sua

sensibilidade, na densidade ou nos mecanismos de transdução são encontradas tanto em receptores cardíacos quanto vasculares em resposta a vários protocolos de treinamento aeróbio (ZANESCO e ANTUNES, 2007). Por este motivo, os receptores podem ser considerados como candidatos a integrar os mecanismos envolvidos na hipotensão induzida pelo exercício. As respostas relaxantes mediadas pelos receptores muscarínicos e de bradicinina em artérias de animais treinados tem sido extensivamente estudadas. No entanto, o papel dos receptores β -adrenérgicos na resposta relaxante em resposta ao exercício físico é pouco explorado. Além disso, não existem trabalhos avaliando a sensibilidade da resposta vasodilatadora mediada pelos receptores β -adrenérgicos em artéria femoral de ratos treinados.

Além do exercício físico, aspectos nutricionais também interferem na condição cardiovascular. A suplementação com L-arginina tem sido demonstrada por diferentes autores como agente benéfico na melhoria da função endotelial e redução da pressão arterial em animais de laboratório e em humanos. Aumento da concentração plasmática de nitrito/nitrato, melhoria do fluxo sanguíneo em resposta a infusão de acetilcolina, redução da aterogênese e redução do peso corporal são efeitos reportados para suplementação com este aminoácido (COOKE e DZAU, 1997; BLUM et al., 1999; PALLOSHI et al., 2004; MARTINA et al., 2008). Estes dados mostram que a suplementação com L-arginina melhora a vasodilatação por várias vias, especialmente as dependentes do endotélio. No entanto, não se sabe os efeitos do L-arginina sobre a resposta relaxante mediada pelos receptores β adrenérgicos.

Considerando que a hipertensão arterial é uma enfermidade poligênica, várias modalidades de tratamento são propostas (tratamento medicamento, exercício físico, adequação nutricional). Isoladamente, exercício físico e suplementação de L-arginina promovem benefícios na prevenção e tratamento da hipertensão arterial. No entanto, os efeitos da associação destes dois procedimentos são menos conhecidos, e a participação de cada um deles ou de sua associação sobre a função dos receptores β -adrenérgicos tem sido ainda menos explorada.

Portanto, este trabalho avaliou a influência do exercício físico e da suplementação de L-arginina, isoladamente ou associados, na reatividade dos receptores β -adrenérgicos em anéis de artéria femoral de ratos.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Músculo liso vascular e endotélio

A célula muscular lisa é comumente encontrada na forma de fuso, com maior diâmetro na região do núcleo. O retículo sarcoplasmático, menos desenvolvido quando comparado aos retículos de outros tipos de células musculares, está em íntima associação com a membrana plasmática, o que explica seu envolvimento nos mecanismos de sinalização de Ca^{2+} e na contração. A célula muscular lisa não apresenta o sistema de túbulos T responsável pela propagação do potencial de membrana, mas observa-se a presença de invaginações denominadas de cavéolas que aumentam em até 75% a área de superfície celular, e estariam envolvidas na transdução de sinais por formarem sítios nos quais diferentes elementos de sinalização poderiam se agregar. Diferente do músculo esquelético, a troponina não está presente na musculatura lisa (GUYTON e HALL, 1996).

O processo de contração muscular ocorre quando um estímulo, mecânico ou químico, ativa as proteínas contráteis miosina e actina. O início do processo de contração da musculatura lisa ocorre quando a concentração de Ca^{2+} aumenta, seja pela liberação deste íon proveniente do retículo sarcoplasmático ou pelo influxo do meio extra para o meio intracelular. O Ca^{2+} presente no citosol liga-se à proteína calmodulina. Este complexo irá ativar a miosina quinase, enzima que fosforila o sítio ativo da cadeia leve de miosina, fazendo com que esta proteína ligue-se aos filamentos de actina promovendo a contração muscular (WEBB, 2003).

Os agonistas contráteis ligam-se aos receptores acoplados a proteína G, estimulando a fosfolipase C que cataliza a formação de segundos mensageiros como o inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) e o diacilglicerol. O IP3 se liga aos seus

receptores localizados no retículo sarcoplasmático liberando para o citosol o Ca^{2+} contido nesta organela. A molécula de diacilglicerol ativa a PKC que por sua vez fosforila proteínas ligadas ao canal para cálcio do tipo L, favorecendo o influxo de Ca^{2+} para o citosol. A contração é mantida até que a enzima miosina fosfatase quebre a ligação do fósforo com a miosina kinase inativando-a. Então, a ligação entre a miosina e a actina é desfeita e a célula muscular lisa volta ao seu tônus basal (WEBB, 2003). Este mecanismo pode ser visualizado na figura 1.

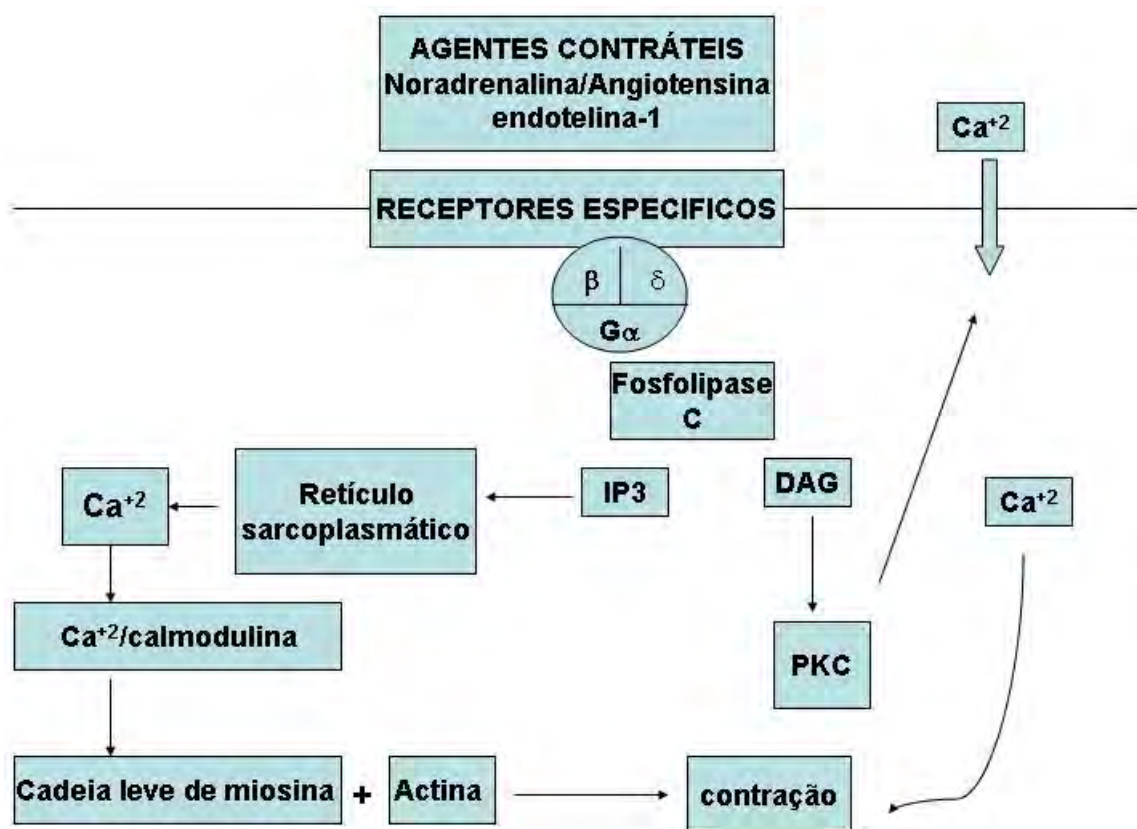


Figura 1. Contração da musculatura lisa vascular. Veja texto para maiores detalhes. IP3: inositol-1,4,5-trifosfato; DAG: diacilglicerol; PKC: proteína kinase C. Fonte: Modificado de Webb (2003)

Os vasos são divididos em três camadas principais: a camada íntima (lúmen) constituída de células endoteliais, a camada média, composta de células musculares lisas, e a camada adventícia, constituída de tecido elástico.

Até a metade do século XX, o endotélio era considerado apenas um conjunto de células homogêneas, razoavelmente estruturadas, com a função única

de revestir internamente os vasos sanguíneos, separando o espaço intravascular do extravascular, garantindo uma superfície lisa para a corrente sanguínea. Somente a partir da década de 60, através de estudos de microscopia eletrônica, é que foi revelada a grande complexidade ultraestrutural das células endoteliais. Posteriormente, o isolamento e o cultivo *in vitro* destas células permitiram estudos detalhados de suas propriedades metabólicas e funcionais. Atualmente, sabe-se que as células endoteliais são responsáveis pela síntese, metabolismo e liberação de grande variedade de mediadores que regulam a vasomotricidade, a permeabilidade vascular, o metabolismo de substâncias endógenas e exógenas, e a atividade plaquetária e leucocitária (IGNARRO, 1999).

(FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980) demonstraram pela primeira vez, que a vasodilatação induzida pela acetilcolina em aorta isolada de coelhos requeria a presença de um endotélio íntegro. Assim, demonstraram que a ativação dos receptores colinérgicos (muscarínicos) nas células endoteliais pela acetilcolina induzia a liberação de uma substância lábil capaz de se difundir para o músculo liso vascular adjacente, causando relaxamento deste tecido por um mecanismo relacionado à elevação dos níveis intracelulares de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). Este mecanismo de relaxamento era semelhante ao dos nitrovasodilatadores, que também exerciam seu efeito através da formação de GMPc, mas de maneira independente do endotélio. Esta substância endotelial recebeu o nome de *Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio* (EDRF; *endothelium-derived relaxing factor*), e em 1987, foi demonstrado que o EDRF era o óxido nítrico (NO) (IGNARRO et al., 1987). Além da acetilcolina, outros mediadores endógenos como a histamina, bradicinina, ATP, trombina, noradrenalina, angiotensina e serotonina são capazes de liberar o EDRF/NO de artérias e veias de várias espécies animais, incluindo a humana. A biossíntese do NO compreende uma das funções mais importantes do metabolismo da L-arginina no organismo (FLEMING e BUSSE, 1999).

Enzimas conhecidas como sintases do NO (NOS) são capazes de catalisar a oxidação do nitrogênio terminal do grupamento guanidino da L-arginina formando quantidades equimolares de NO e L-citrulina. As sintases do NO dividem-se basicamente em dois grandes grupos: as isoformas constitutivas (cNOS) e a isoforma induzível (iNOS). Ambas requerem um doador de elétron, a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH), e co-fatores como a flavina

adenina dinucleotídeo (FAD), a flavina mononucleotídeo (FMN) e tetrahydrobiopterina (BH₄). As cNOS foram originalmente encontradas no endotélio e neurônios, sendo então denominadas eNOS (NOS endotelial) e nNOS (NOS neuronal), respectivamente. Ambas, eNOS e nNOS, são estimuladas por uma cascata bioquímica que envolve a participação dos íons Ca²⁺ e a calmodulina, e liberam o NO por curtos períodos de tempo. O NO produzido pela eNOS está envolvido no controle da pressão arterial, distribuição do fluxo sanguíneo aos órgãos e inibição da adesão e agregação de plaquetas e granulócitos polimorfonucleares. A nNOS (160 kDa), também referida muitas vezes como bNOS (*brain NOS*), é identificada em neurônios do sistema nervoso central e periférico e outras estruturas como glândulas adrenais, células epiteliais de pulmões, útero e estômago, células da mácula densa do rim, células da ilhota pancreática e músculo esquelético. No sistema nervoso central, o NO parece participar das funções de memória, aprendizado e visão. A iNOS (130 kDa) é fisiologicamente ativa em várias células do organismo e tem sua função exacerbada por determinados estímulos patológicos, tais como lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) e citocinas, incluindo a interleucina-1 e fator de necrose tumoral. Esta isoforma pode ser expressa em uma grande variedade de tipos celulares incluindo macrófagos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, células de Kupffer, células endoteliais, hepatócitos e células epiteliais. É ativada independentemente do complexo Ca²⁺-calmodulina, e libera grandes quantidades de NO por períodos de tempo relativamente longos (MONCADA *et al.*, 1988)

Uma vez liberado, o NO difunde-se rapidamente da célula geradora para a célula alvo, onde interage com o grupamento heme da guanilato ciclase solúvel estimulando a sua atividade catalítica, levando à formação de GMPc que, por sua vez, diminui os níveis intracelulares de Ca²⁺. Os mecanismos pelos quais a via NO/GMPc induz vasodilatação incluem inibição da geração de IP₃, aumento do seqüestro de Ca²⁺ citosólico, desfosforilação da cadeia leve de miosina, inibição do influxo de Ca²⁺, ativação de proteínas quinases, estimulação da Ca²⁺-ATPase de membrana e abertura de canais de K⁺. Veja figura 2, para maiores detalhes (PALMER *et al.*, 1988; MONCADA e HIGGS, 2006).

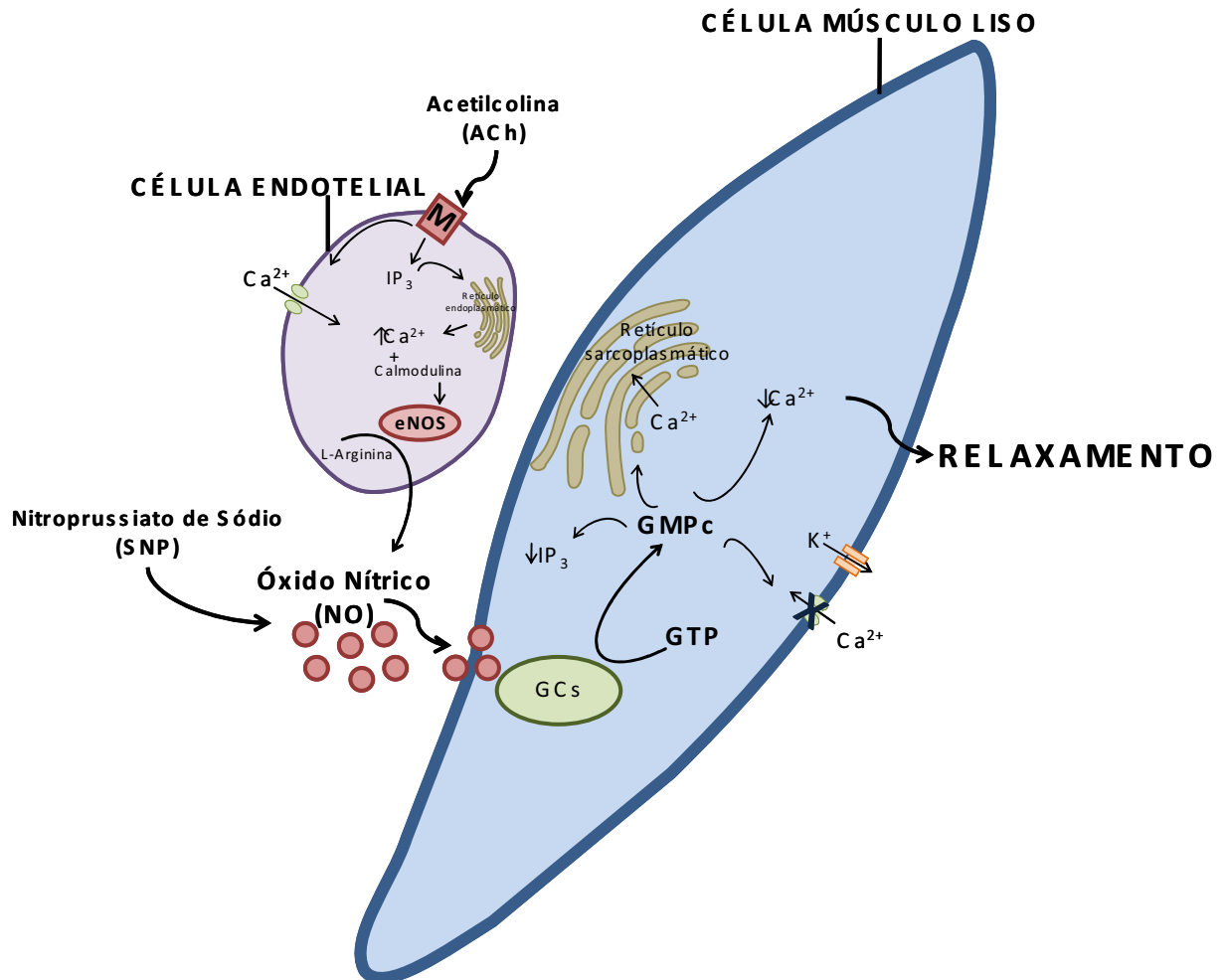


Figura 2. Síntese e liberação de óxido nítrico em músculo liso vascular.

2.2- Exercício Físico

O exercício físico é caracterizado pela contração muscular esquelética, e durante sua execução ocorrem algumas alterações cardiovasculares como: aumento do fluxo sanguíneo para a musculatura em atividade, redução da resistência vascular periférica proporcional ao aumento do débito cardíaco e conseqüentemente elevação da pressão arterial sistólica. Para o ajuste de todas estas alterações cardiovasculares que o exercício dinâmico provoca, alterações neurais e humorais

ocorrem. Os fatores humorais que irão provocar o relaxamento da musculatura vascular, com redução da resistência vascular periférica e conseqüentemente da pressão arterial, são dependentes do endotélio (MAEDA *et al.*, 2001).

Diferentes protocolos de treinamento físico são descritos na literatura de acordo com o objetivo pretendido, que pode ser o ganho de massa muscular (hipertrofia), a perda de peso corporal, redução das frações lipídicas, da glicemia e da insulinemia, diminuição da pressão arterial, entre outros. Cada protocolo de treinamento possui diferentes intensidades, que são realizados com determinada frequência (dias por semana) e duração da sessão. O protocolo de exercício físico preconizado para melhora da capacidade cardiorrespiratória é aquele onde o indivíduo faz exercício aeróbio (corrida, natação, andar de bicicleta são os mais comuns) com intensidade entre 50 a 85% do VO_{2max} , com 3 a 5 sessões semanais e duração entre 20 e 60 minutos de atividade contínua. A interação entre intensidade, frequência e duração determina o dispêndio calórico, cujos limites necessários para haver melhora significativa no VO_{2max} , perda de peso, ou redução do risco de doenças podem ser diferentes (ACMS, 2000). É importante salientar que toda a prescrição do exercício depende da condição inicial e da progressão do indivíduo dentro do protocolo escolhido. Estudos mostram que os exercícios de intensidade moderada (50 a 70% VO_{2max}) são suficientes em produzir benefícios na melhora do perfil lipídico e da pressão arterial (WETZSTEIN *et al.*, 1998; COUILLARD *et al.*, 2001).

Sabe-se que o exercício físico aumenta o fluxo sangüíneo pulsátil e que a pressão que o sangue exerce sobre a parede vascular e a tensão de cisalhamento (shear stress) sob as células endoteliais são estímulos poderosos para a geração de NO, no sistema vascular (veja figura 2). Os mecanismos moleculares pelos quais o shear stress provoca maior atividade da enzima eNOS e, conseqüentemente, aumento na produção de NO são complexos e envolvem diversas vias de sinalização dentro da célula endotelial. A primeira etapa é a ativação de mecanorreceptores presentes na membrana das células endoteliais. Estes mecanorreceptores podem ser as proteínas Gs, os canais iônicos, a caveolina e as integrinas que captam as alterações de tensão sobre a parede celular e convertem os estímulos mecânicos em estímulos químicos para a ativação da eNOS (KOJDA e HAMBRECHT, 2005). As vias envolvidas neste processo estão relacionadas à ativação da PKC, da c-Src e da Akt/PI3K que fosforilam a eNOS, ativando-a

(HIGASHI e YOSHIKUMI, 2004). A produção de NO induzida pelo shear stress ocorre independentemente do aumento da concentração de Ca^{2+} , pois a Akt reduz a sensibilidade da eNOS a este íon (KOJDA e HAMBRECHT, 2005). Isto explica a significativa melhora da responsividade vascular em animais treinados. A capacidade das células endoteliais de perceber e responder às mudanças no fluxo sanguíneo é um fator essencial na regulação do tônus vascular e envolve a ativação de fatores de crescimento celular, promovendo o remodelamento da parede arterial e manutenção da integridade do endotélio. Assim, um dos efeitos benéficos do exercício físico regular está estreitamente relacionado à sua capacidade de estimular a síntese de NO pelas células endoteliais (DELP *et al.*, 1993; WANG *et al.*, 1993; KINGWELL, 2000). A maior produção de NO pelas células endoteliais resulta em vasodilatação.

2.3- As catecolaminas e os adrenoceptores

Os mediadores endógenos do sistema nervoso simpático são a noradrenalina, liberada dos terminais nervosos pós-ganglionares, e a noradrenalina e adrenalina, liberadas da medula adrenal.

As catecolaminas endógenas, adrenalina e noradrenalina, modulam a pressão arterial através de, no mínimo, quatro mecanismos: 1- ações no sistema nervoso central, 2- controle direto no tônus vascular, 3- modulação do fluxo de sódio no túbulo proximal renal, e, 4- alteração da liberação de renina e do sistema renina-angiotensina-aldosterona (LEVY *et al.*, 2006).

As catecolaminas iniciam suas ações por interação com receptores de membrana, denominados adrenoceptores. A sua ligação com os adrenoceptores é rápida, reversível, saturável e estereosseletiva. A ocupação dos adrenoceptores pelas catecolaminas leva à formação de segundos mensageiros intracelulares que desencadeiam a resposta fisiológica.

Os adrenoceptores foram inicialmente divididos em duas grandes categorias, α e β (AHLQUIST, 1948), os quais foram posteriormente classificados em subtipos com base em suas propriedades farmacológicas de serem estimulados ou bloqueados por drogas seletivas e também por sequenciamento dos aminoácidos

que participam em sua estrutura protéica. Os subtipos de adrenoceptores atualmente conhecidos são α_1 , α_2 , β_1 , β_2 e β_3 . Estes subtipos podem ser subdivididos ainda mais em: α_{2a} , α_{2b} e α_{1a} e α_{1b} , e talvez outros (LANDS *et al.*, 1967; LANGER, 1974; STARKE, 1981; MINNEMAN *et al.*, 1992; FORD *et al.*, 1994).

Os adrenoceptores α_1 , ao estimularem a fosfolipase C, levam a um aumento na degradação bifosfato, formando o fosfatidil inositol (IP3), e o diacilglicerol (DAG). Há também evidências de que os adrenoceptores α_1 podem se acoplar ao metabolismo do ácido aracdônico, possivelmente via uma fosfolipase A, e a canais de cálcio (MINNEMAN, 1988). Os adrenoceptores α_2 parecem mediar a resposta fisiológica através da inibição da adenil ciclase e os adrenoceptores β_1 , β_2 e β_3 medeiam a resposta através da estimulação da adenil ciclase (EMORINE *et al.*, 1989; EMORINE *et al.*, 1994).

Os adrenoceptores pertencem a uma super família de receptores de membrana estreitamente relacionados e que são acoplados às proteínas G. Fazem parte dessa família, além dos adrenoceptores, os receptores muscarínicos, os receptores de histamina H2, os receptores de serotonina, 5-HT1c, e o fotorreceptor rodopsina (LEFKOWITZ e CARON, 1988).

A estimulação dos adrenoceptores β ativa uma proteína G, denominada Gs. As proteínas G são heterotrímeros consistindo de uma subunidade hidrofílica α e duas subunidades hidrofóbicas β e γ . Existem, no mínimo, vinte distintas proteínas G, baseadas na presença de isoformas de subunidade α : quatro isoformas de Gs; três de proteínas Gi; duas isoformas de Go; uma Gz; duas Gq e duas transducinas. Destas, somente oito foram purificadas livres e não associadas a outros elementos da membrana. Na ausência de agonista, quando a proteína G está na forma inativa, uma molécula de guanosina difosfato (GDP), encontra-se ligada à subunidade α e formam um complexo associado às subunidades β e γ . Na presença do agonista, o receptor ativado interage com a proteína G e induz a troca de GDP por GTP na subunidade α . Após ligar-se ao GTP, a subunidade α dissocia-se das subunidades $\beta\gamma$ e torna-se ativada. A subunidade α permanece livre até que ocorra a hidrólise de GTP e a formação novamente de GDP, levando a sua reassociação com as subunidades $\beta\gamma$ (BIRNBAUMER, 1992). A subunidade α da proteína G, quando ativada, leva à estimulação da adenil ciclase (RODBELL, 1980) (GILMAN, 1987). Recentes experimentos feitos em coração isolado sugerem que Gs pode ter uma segunda função através da ativação direta de canais de cálcio do tipo L (YATANI *et*

al., 1987). Gs é irreversivelmente ativada pela toxina da cólera, mas não toxina da pertussis (BIRNBAUMER, 1992). Veja figura 3, para maiores detalhes.

Diferente dos receptores acoplados às proteínas G ou da própria proteína G, os seus efetores não constituem uma super família e são menos compreendidos dentro da cadeia de eventos celulares que caracterizam a transdução do sinal celular evocado pelo agonista. Os sistemas efetores incluem a adenil ciclase, as fosfolipases C e A2 e possivelmente, a fosfolipase D. Várias classes de canais iônicos são também consideradas pertencentes ao sistema de efetores, incluindo K_{ATP} e K_{ACh} , canais de cálcio voltagem dependentes, canais catiônicos monovalentes não seletivos, como os canais do marca passa cardíaco que conduzem correntes denominadas I_f . A ativação de receptores acoplados à proteína G por agonistas pode desencadear não somente mudanças nas concentrações intracelulares de AMP (monofosfato de adenosina) e GMP (monofosfato de guanosina) cíclicos, IP3, DAG, AA e Ca^{2+} , mas também no potencial de membrana, que por si só é um potente regulador da função celular (YATANI *et al.*, 1990).

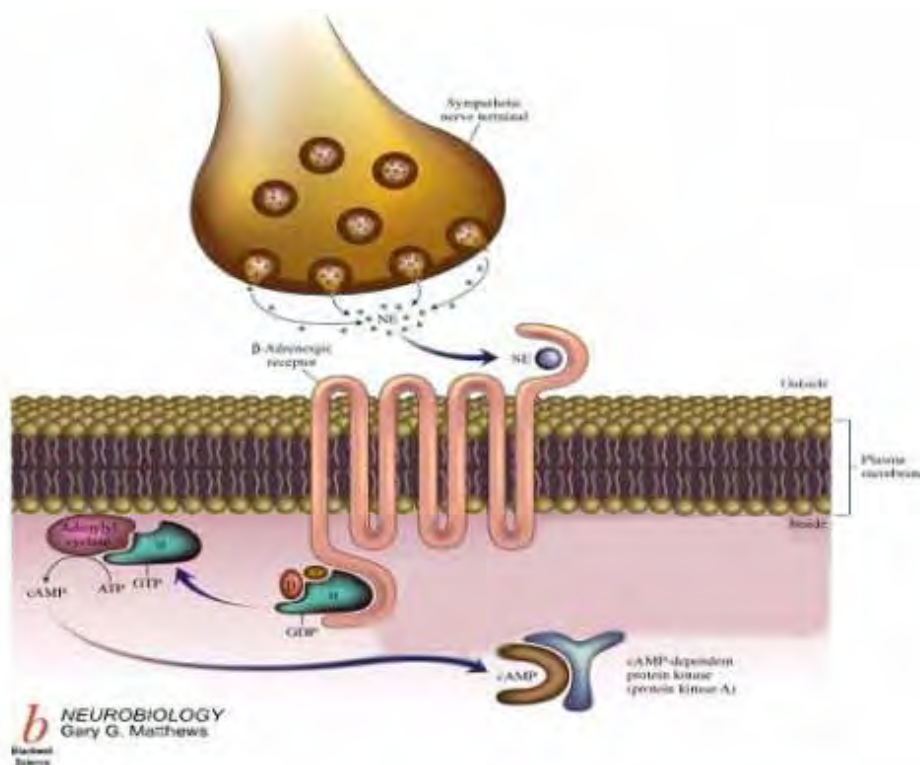


Figura 3. Ativação dos receptores β adrenérgicos pela noradrenalina (NE) e a cascata bioquímica na formação de AMPc.

Fonte: Matthews, 2001. Neurobiology: Molecules, Cells and systems

2.3.1- Sensibilidade às catecolaminas

A sensibilidade às catecolaminas é afetada por diferentes mecanismos. Estes incluem mudanças na atividade dos processos de transporte e metabolização das catecolaminas levando ao término de suas ações na junção efetora, alterações na afinidade e/ou no número dos adrenoceptores β , mudanças no sistema de acoplamento entre o receptor e a proteína G, e mudanças em outras enzimas que medeiam etapas celulares após o receptor (CALLIA e DE MORAES, 1984; JUBERG *et al.*, 1985; BASSANI e DE MORAES, 1987; SPADARI e DE MORAES, 1988; ZANESCO *et al.*, 1997).

2.3.2- Sistema de recaptção e metabolização das catecolaminas

As ações biológicas da noradrenalina e da adrenalina são limitadas pela sua remoção do fluido extracelular, o que impede a interação com os adrenoceptores. O transporte ativo por carreadores e subsequente acúmulo das catecolaminas pelos neurônios simpáticos é a primeira etapa da finalização de suas ações, especialmente em tecidos densamente inervados (TRENDELENBURG, 1978; 1980; 1990; 1991). Duas enzimas desempenham importante papel na captação e metabolização dessas aminas, após serem recapturadas por transporte ativo do meio extracelular: monoamino oxidase (MAO) e catechol-O-metiltransferase (COMT) (AXELROD, 1966).

Estes sistemas de recaptção e metabolização de catecolaminas foram divididos fundamentalmente em dois distintos sistemas: sistema de recaptção neuronal, denominado uptake₁, e sistema de metabolização extraneuronal, uptake₂. Ambos foram identificados e bem descritos em termos de suas localizações e propriedades bioquímicas (BURGEN e IVERSEN, 1965; IVERSEN, 1965a; CALLINGHAM e BURGEN, 1966).

O sistema de recaptção uptake₁ representa a primeira e mais importante etapa no controle das ações do neurotransmissor noradrenalina, quando

liberado. Este sistema remove a noradrenalina da biofase sináptica e transporta a amina para dentro do axoplasma onde esta é então, desaminada pela MAO mitocondrial ou tomada novamente pelas vesículas de estocagem para ser reutilizada (IVERSEN, 1965b; TRENDELENBURG, 1990; 1991). O sistema de transporte através da membrana axoplasmática é um processo dependente de sódio e pode ser bloqueado seletivamente por cocaína e antidepressivos tricíclicos, como a imipramina (LESTER *et al.*, 1994). Este sistema de transporte tem maior afinidade pela noradrenalina do que pela adrenalina. O agonista β -adrenérgico sintético isoproterenol não é substrato para este sistema.

O sistema de recaptação extraneuronal, também chamado de sistema não neuronal de transporte de catecolaminas, está associado ao metabolismo dessas aminas pela ação da enzima COMT. Apresenta baixa afinidade pela noradrenalina, maior afinidade pela adrenalina, e grande afinidade pelo isoproterenol (SALT, 1972). A recaptação extraneuronal é seletivamente bloqueada pela corticosterona e 17-B-hidroxi-estradiol e metabólitos das catecolaminas como a metanefrina e normetanefrina.

2.3.3- Alteração da afinidade de agonistas

Alterações na afinidade de um agonista pelo seu receptor podem ser observadas quando: 1- um tecido cuja população de receptores que era homogênea passa a apresentar, após um tratamento experimental, uma população heterogênea de receptores; 2- mudanças na informação pós transcricional para a síntese do receptor, que resultam em alterações em sua configuração química; 3- ocorrem alterações na proteína transdutora; 4- a composição lipídica da membrana, onde o receptor está inserido, é alterada de modo a produzir alterações da afinidade tanto para agonistas quanto para antagonistas, uma vez que a sua posição espacial na membrana influencia sua propriedade ligante (KENAKIN e FERRIS, 1983).

2.3.4- Dessensibilização do receptor

O termo dessensibilização é definido como um estado de responsividade reduzida de uma célula ao agonista, e geralmente ocorre após exposição da célula ao próprio agonista, ou a outros hormônios. A dessensibilização pode ser causada por processos distintos, mas inter-relacionados: desacoplamento entre a proteína G e o receptor, seqüestro, ou down-regulation (ZANESCO et al., 1997; PRIVIERO et al., 2004).

2.3.5- Desacoplamento

O desacoplamento entre a proteína G e o receptor ocorre dentro de segundos a minutos após a exposição da célula a agonistas e resulta do processo de fosforilação do receptor em sua porção intracelular. Este processo tem sido bem caracterizado no fotorreceptor rodopsina, onde a luz estimula a rodopsina quinase, que catalisa a fosforilação dos resíduos de serina e treonina na porção C terminal da rodopsina, o que aumenta sua afinidade por uma proteína denominada arrestina. Esta proteína, por sua vez, impede a ligação da rodopsina com a transducina.

Diferentes proteínas quinases, como a proteína quinase A (PKA), proteína quinase C (PKC) e proteína quinase do adrenoceptor β (BARK), parecem desempenhar importante papel na regulação e na dessensibilização dos adrenoceptores β (BENOVIC *et al.*, 1988). Assim, quando a adenil ciclase é estimulada pelos hormônios agonistas, os níveis celulares de AMP cíclico aumentam, proteínas quinases dependentes de AMPc são ativadas e o receptor pode ser fosforilado e dessensibilizado.

Diversas abordagens metodológicas foram usadas para detectar os sítios de atuação da BARK. Estes estudos sugerem que os resíduos de serina e treonina localizados na cadeia C-terminal ou na terceira alça citoplasmática do receptor seriam os possíveis sítios de fosforilação pela BARK. A terceira alça intracelular do receptor β parece ser requerida para o acoplamento do receptor com sua proteína Gs (PITCHER *et al.*, 1998)

Existem muitas analogias entre o complexo rodopsina-transducina e os adrenoceptores β – proteína Gs. Primeiro, no processo de adaptação à luz, a rodopsina quinase fosforila a rodopsina de maneira análoga à fosforilação catalisada pela BARK do adrenoceptor ocupado pelo agonista. Segundo, proteínas análogas à arrestina, denominadas β -arrestinas participam do processo de dessensibilização feito pela BARK. β -arrestina foi clonada e está presente em muitos tecidos, mais proeminentemente no cérebro, coração e pulmões (LOHSE *et al.*, 1990). Em coração humano com insuficiência cardíaca encontra-se uma boa correlação entre a diminuição da responsividade a β agonista e concentração elevada de BARK-1, sem qualquer mudança nos níveis de BARK-2, β -arrestina, ou β -arrestina-2 (UNGERER *et al.*, 1994)

2.3.6- Sequestro

Seqüestro é um processo que envolve a mobilização do receptor da superfície celular para um compartimento intracelular, e inacessível aos agonistas extracelulares hidrófilos. Como a dessensibilização por desacoplamento, o seqüestro também ocorre dentro de minutos após a exposição a um agonista. Embora pareça ocorrer num período mais tardio do que o desacoplamento, os mecanismos envolvidos no seqüestro não são conhecidos. Alguns estudos sugerem que a fosforilação e o seqüestro são processos inteiramente distintos e independentes (SIBLEY *et al.*, 1986).

2.3.7- Regulação negativa

A diminuição do número ou densidade de receptores parece ocorrer numa escala de tempo muito maior, em horas, do que o desacoplamento e seqüestro. Pode ser causada ou por aumento na degradação ou por diminuição na taxa de síntese dos receptores (BOHM *et al.*, 1997)

Em algumas situações os receptores β -adrenérgicos são proteoliticamente degradados de modo que a sua regeneração depende de nova síntese, enquanto que em outras, eles permanecem indetectáveis por um período de tempo e então retornam aos níveis normais, sugerindo que receptores down-regulados podem readquirir sua capacidade de ligação após algum tempo. Os mecanismos envolvidos no processo de down-regulation dos receptores β_2 -adrenérgicos foram elucidados e parece que uma via desse mecanismo seria a diminuição do nível de RNAm desses adrenoceptores e outra seria a sua fosforilação pela PKA (BOUVIER *et al.*, 1989).

2.3.8- Regulação positiva

Up-regulation, definida como aumento no número dos receptores ativos, pode ocorrer como resultado de um bloqueio crônico por antagonistas, ou como consequência da atuação hormonal no sistema efetor do receptor. A influência de hormônios permissivos, tais como glicocorticóides, sobre os receptores β -adrenérgicos está bem estabelecida. Os glicocorticóides atuam a nível de expressão gênica modulando a síntese do receptor. Eles parecem aumentar o número dos receptores por um aumento no nível do seu RNAm. O tratamento prolongado de humanos e de animais, com antagonistas de receptores β -adrenérgicos funcionais, detectável após a interrupção abrupta do tratamento (BRODDE *et al.*, 1989).

Tanto up quanto down-regulation dos receptores β -adrenérgicos cardíacos podem ocorrer em diferentes estados fisiológicos ou patológicos. Exemplos incluem, mudanças associadas à ontogênese, isquemia, doenças, agentes estressores e manipulações farmacológicas (PELA *et al.*, 1990).

2.4- Receptores β -adrenérgicos vasculares e exercício físico

As catecolaminas promovem efeitos vasculares por interação com dois tipos receptores adrenérgicos: α e β , que estão presentes no endotélio e na

musculatura lisa vascular. A estimulação dos adrenoceptores α vasculares pelas catecolaminas promove contração da musculatura lisa levando a vasoconstrição, enquanto que a estimulação dos adrenoceptores β produz vasodilatação. Os componentes α e β da ação vascular das catecolaminas podem ser separados por bloqueadores seletivos dos respectivos receptores. A administração de adrenalina promove resposta bifásica na pressão arterial, promovendo elevação transitória dos níveis pressóricos, seguida de queda. No entanto, essa resposta bifásica parece depender do leito vascular estudado e do seu tônus basal.

Os primeiros trabalhos estudando leitos vasculares mostraram a existência de dois subtipos de receptores β adrenérgicos, β_1 e β_2 , em diferentes artérias e veias. Observou-se que a resposta vasodilatadora era mediada predominantemente pelos receptores β_2 adrenérgicos em comparação aos receptores do subtipo β_1 , sendo a ordem de potência da adrenalina > noradrenalina > fenilefrina (GOLDIE *et al.*, 1986; CHIBA e TSUKADA, 2001; POURAGEAUD *et al.*, 2005). No entanto, trabalhos recentes mostram que essa classificação de potência não se aplica em todos os leitos vasculares. Alguns estudos mostram que os receptores β_1 adrenérgicos também promovem vasodilatação (CHRUSCINSKI *et al.*, 2001; BRIONES *et al.*, 2005), enquanto outros trabalhos mostram que os receptores do subtipo β_3 participam da resposta vasodilatadora em artérias de diversas espécies como coronárias de humanos (DESSY *et al.*, 2004; DESSY *et al.*, 2005), aorta de ratos, (MATSUSHITA *et al.*, 2006) e artérias pulmonares de cães (TAGAYA *et al.*, 1998; TAMAOKI *et al.*, 1998; TAGAYA *et al.*, 1999). Em aorta de ratos, foi demonstrado que algumas respostas relaxantes parecem ser mediadas por uma população de receptores atípicos, através da utilização de agonistas/antagonistas convencionais que estimulam os subtipos de receptores β_1 , β_2 e β_3 (SHAFIEI e MAHMOUDIAN, 1999; BRAWLEY *et al.*, 2000a; b). Por outro lado, outros trabalhos não confirmaram a participação, nem dos receptores β_3 adrenérgicos nem do receptor atípico (β_4) nesta preparação (BRAHMADEVARA *et al.*, 2003; 2004). Em artérias mesentéricas de rato, o receptor β_4 adrenérgico também parece estar presente (KOZLOWSKA *et al.*, 2003), mas estes dados não foram confirmados em estudo posterior com estas mesmas artérias (BRIONES *et al.*, 2005).

Estudos envolvendo artérias femorais e braquiais são mais escassos, em comparação com as artérias mais centrais e calibrosas, como aorta e mesentérica.

Os dados existentes apontam para a presença de receptores adrenérgicos β_1 e β_2 através do emprego de agonistas/antagonistas seletivos (XU e HUANG, 2000). Por outro lado, em artérias femorais de coelhos foi demonstrado que somente os subtipos de receptores adrenérgicos β_2 medeiam a resposta vasodilatadora (XU *et al.*, 2000).

2.5- Mecanismo de ação dos receptores β adrenérgicos

As vias de sinalização intracelular em resposta a ativação dos receptores β adrenérgicos em vasos são múltiplas e modificam-se de acordo com a população do receptor que está mediando as respostas relaxantes, e também com o leito vascular estudado (XU e HUANG, 2000). Embora a ativação do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) seja a via clássica para a resposta vasodilatadora à estimulação β adrenérgica, mecanismos dependentes e independentes da formação deste segundo mensageiro, contribuem para a resposta relaxante induzida pela ativação destes receptores (PHILLIPS *et al.*, 2000; QUEEN e FERRO, 2006)

2.5.1- Via de sinalização AMPc-proteína kinase A

Os adrenoceptores pertencem à uma super família de receptores de membrana estritamente relacionados e acoplados às proteínas G. Todas essas proteínas compartilham uma estrutura peptídica comum na qual a porção amino terminal (N), no lado extracelular da membrana, é conectada à cadeia carboxílica terminal (C), no lado intracelular da membrana, por sete domínios transmembrana. O tamanho relativo das cadeias terminais N e C e da terceira alça intracelular varia consideravelmente de receptor para receptor (RAYMOND *et al.*, 1990; BIRNBAUMER, 1992). A terceira alça intracelular dos adrenoceptores β é o próprio sítio de acoplamento desses receptores com a proteína G. As proteínas G são heterotrímeros consistindo de uma subunidade hidrofílica α , e duas subunidades

hidrofóbicas, β e γ . Na ausência de agonista, quando a proteína G está na forma inativa, uma molécula de difosfato de guanosina (GDP) encontra-se ligada à subunidade α formando um complexo associado às subunidades β e γ . Na presença do agonista, o receptor ativado interage com a proteína G e induz a troca de GDP por GTP na subunidade α . Após ligar-se ao GTP, a subunidade α dissocia-se das subunidades $\beta\gamma$ e torna-se ativada. A subunidade α permanece livre até que ocorra a hidrólise de GTP e a formação novamente de GDP, levando à sua reassociação com as subunidades $\beta\gamma$. A subunidade α da proteína Gs, quando ativada, leva à estimulação da adenilil ciclase, a qual leva a formação do segundo mensageiro AMP cíclico (AMPc), a partir da quebra de ATP. O AMPc ativa a proteína kinase A, que irá promover redução da concentração de Ca^{2+} intracelular na musculatura lisa vascular, com conseqüente vasodilatação (RODBELL, 1980; BIRNBAUMER, 1992)

2.5.2- Via de sinalização por ativação de canais de potássio dependente de cálcio

A manutenção da atividade relaxante da aorta em resposta à isoprenalina, mesmo na presença do SQ 22536 (um inibidor da adenilil ciclase), suporta a hipótese da existência de um mecanismo independente da via do AMPc em determinados vasos (MATSUSHITA et al., 2006). Além disso, a resposta relaxante é abolida na presença de iberiotoxina, bloqueador de canais de K^+ , o que sugere a participação dos canais de K^+ de alta condutância ativados por Ca^{2+} (MaxiK). Estes dados estão de acordo com trabalho prévio que demonstrou a importância dos canais de K^+ na resposta relaxante de artérias de porcos (SONG e SIMARD, 1995). Adicionalmente, foi demonstrado que o relaxamento foi dependente dos canais MaxiK apenas para as respostas mediadas pelos receptores β_1 e β_2 adrenérgicos, enquanto que para os receptores β_3 , os canais de K_v parecem estar envolvidos (MATSUSHITA et al., 2006).

O mecanismo pelo qual a ativação dos receptores β adrenérgicos promove relaxamento através da ativação e abertura de canais de K^+ é por meio do efluxo deste íon para o meio extracelular, que por sua vez, provoca redução no

potencial de membrana, gerando a hiperpolarização da célula. Isto resulta em fechamento dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. O fechamento dos canais de Ca^{2+} pela hiperpolarização da membrana provoca redução do complexo Ca^{2+} -calmodulina e a fosforilação da cadeia leve de miosina acarretando resposta relaxante (WEBB, 2003).

2.5.3- Via de sinalização do óxido nítrico-GMPc

Outra via de sinalização da resposta relaxante pela ativação dos receptores β adrenérgicos independente do AMPc é pela via endotelial. A resposta vasodilatadora por estimulação dos receptores β adrenérgicos tem se mostrado parcialmente (TANG *et al.*, 1995; AKIMOTO *et al.*, 2002) ou totalmente (DESSY *et al.*, 2004) inibida por retirada do endotélio ou na presença de inibidores da síntese de NO, como o L-NAME. Além disso, a inibição da enzima guanilato ciclase solúvel em vasos sem endotélio elimina a resposta vasodilatadora, enquanto que a adição de nitropussiato de sódio restaura o relaxamento vascular. Assim, estes trabalhos mostram que o NO produzido pelas células endoteliais está envolvido no relaxamento induzido por estimulação de receptores β adrenérgicos.

Os mecanismos pelos quais os receptores β adrenérgicos promovem liberação de NO parecem envolver várias vias sinalizadoras, como a proteína kinase ativada por mitogênio (MEK), as p42/p44 proteínas kinase ativadas por mitogênio (MAPK) ou (ERK1/2) e fosfatidilinositol 3 kinase (PI3K), tanto em humanos como em animais de laboratório (MARSEN *et al.*, 1999; SCHMITT e STORK, 2000; ISENOVIC *et al.*, 2002). A ativação dessas enzimas pelos receptores β adrenérgicos leva a ativação da sintase do NO endotelial (eNOS) presente na célula endotelial, que por sua vez vai promover a oxidação do nitrogênio terminal do grupamento guanidino do aminoácido L-arginina formando quantidades equimolares de NO e L-citrulina. Uma

vez formado, o NO difunde-se rapidamente da célula endotelial para a célula muscular lisa, onde interage com o grupamento heme da guanilato ciclase solúvel estimulando a sua atividade catalítica, levando à formação de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). Os mecanismos pelos quais a via NO/GMPc induz vasodilatação incluem inibição da geração de IP₃, aumento do seqüestro de Ca²⁺ citosólico, desfosforilação da cadeia leve de miosina, inibição do influxo de Ca²⁺, ativação de proteínas kinases, estimulação da Ca²⁺-ATPase de membrana e abertura de canais de K⁺ (MURAD *et al.*, 1993).

2.5.4- Exercício físico e resposta vasodilatadora: participação dos receptores β adrenérgicos

Os efeitos do exercício na vasomotricidade têm sido bastante estudados através da utilização tanto de substâncias vasoconstritoras, como a noradrenalina e fenilefrina (MCALLISTER *et al.*, 1996; PARKER *et al.*, 1997), como de agentes vasodilatadores, como acetilcolina e bradicinina (JOHNSON *et al.*, 2001; DE MORAES *et al.*, 2004; GRAHAM e RUSH, 2004). A noradrenalina induz vasoconstrição através da ativação dos receptores α adrenérgicos presentes na musculatura lisa vascular, enquanto que a acetilcolina promove vasodilatação por ativação de receptores muscarínicos presentes nas células endoteliais. Por outro lado, informações sobre os efeitos do exercício sobre as respostas vasodilatadoras mediadas pelos receptores β adrenérgicos são bem mais escassas, e estes poucos dados mostram-se conflitantes. A maioria dos trabalhos existentes relaciona as respostas relaxantes dos receptores β adrenérgicos com o processo de envelhecimento (ARRIBAS *et al.*, 1997; GABALLA *et al.*, 2000; VAN DER ZYPP *et al.*, 2000; KANG *et al.*, 2007) ou com as doenças cardiovasculares (LU *et al.*, 1995; BLANKESTEIJN *et al.*, 1996; WERSTIUK e LEE, 2000; GABALLA *et al.*, 2001; MALLEM *et al.*, 2005).

Os primeiros estudos que analisaram a participação dos receptores β adrenérgicos vasculares em resposta ao exercício datam do final dos anos 70. Em um destes estudos foi investigada a reatividade vascular em resposta ao uso crônico de β bloqueador em ratos treinados e sedentários. Observou-se que animais treinados, sem o uso de β -bloqueador, apresentaram maior temperatura da pele quando expostos a uma temperatura ambiente de 5° C, além de maior resposta vasodilatadora para a isoprenalina. O autor sugeriu um aumento na sensibilidade dos receptores β_2 ou diminuição da sensibilidade dos receptores α adrenérgicos como explicação para estes fenômenos (HARRI, 1979). Posteriormente, outros estudos usaram o fluxo sangüíneo e a resistência vascular coronariana para acessar os efeitos do bloqueio dos receptores β adrenérgicos. Foi demonstrado que o antagonista seletivo β_2 adrenérgico, ICI-118551, promoveu significativa redução na velocidade do fluxo sanguíneo coronário e aumento da resistência destes vasos em cães submetidos a exercício de corrida (DICARLO *et al.*, 1988). Estes dados mostraram a importante participação da resposta β adrenérgica na resposta relaxante de artérias coronarianas durante o exercício. Estudo posterior confirmou estes resultados, e mostrou ainda que a resistência e o diâmetro coronários pareciam sofrer influência também da atividade dos receptores α adrenérgicos, uma vez que a aplicação de fentolamina (antagonista α -adrenérgico não-seletivo) junto com propranolol (antagonista β não seletivo) reduziu o efeito vasoconstritor do bloqueio dos receptores β durante o exercício (TRAVERSE *et al.*, 1995).

Mais recentemente foram feitos estudo com animais idosos, cujos resultados mostraram que o exercício melhora a sensibilidade dos receptores β adrenérgicos, quando a resposta vasodilatadora mediada por estes receptores apresentava-se previamente reduzida pelo processo de envelhecimento. Assim, os resultados mostraram que seis semanas de exercício físico de natação, 5 vezes por semana, promoveu melhora da resposta vasodilatadora ao agonista β não seletivo isoproterenol, nas artérias coronárias em comparação ao grupo sedentário (LEOSCO *et al.*, 2003). Em estudo publicado posteriormente, conduzido com ratos idosos e jovens mostrou-se que treinamento de corrida em esteira por 10 – 12 semanas, 5 dias por semana, com sessões de 60 minutos melhorava a resposta vasodilatadora ao isoproterenol nos vasos do músculo gastrocnêmio de ratos idosos, mas não em animais jovens (DONATO *et al.*, 2007). Coletivamente, estes estudos

mostram os efeitos benéficos do exercício físico na sensibilidade vascular no processo de envelhecimento. No entanto, a responsividade β adrenérgica ao exercício não é homogênea, senão depende de vários fatores como a região do leito vascular a ser estudada. Também, calibres diferentes de uma mesma artéria podem responder diferentemente ao exercício físico (DRIEU LA ROCHELLE *et al.*, 1991). Outra variável importante é o tipo de artéria estudada; vasos de resistência (no antebraço) ou de condução (artéria braquial) apresentaram respostas diferentes em relação ao fluxo sanguíneo tanto para agonista endotélio dependente (acetilcolina), quanto para o nitropussiato de sódio que atua independente do endotélio (LIND *et al.*, 2002). Estas diferenças ainda precisam ser estudadas do ponto de vista das respostas β adrenérgica vascular ao exercício.

Assim, o papel dos adrenoceptores e seus mecanismos de transdução celular nos vasos ainda não são claros. Além disso, não existem trabalhos avaliando o efeito do treinamento físico na sensibilidade da resposta mediada pelos adrenoceptores β_2 e β_3 em artérias femorais de ratos.

2.6- Suplementação de L-Arginina (L-Arg)

Sintetizada pelo organismo a partir do L-glutamato e L-glutamina, a L-Arg é um aminoácido não essencial que participa de diversas funções críticas no organismo, como regulação do pH, despolarização da membrana da célula endotelial, metabolismo dos macronutrientes e no ciclo da uréia (COMAN *et al.*, 2008). Além disso, a L-Arg apresenta atividade antiinflamatória, reduzindo os níveis de citocinas pró inflamatórias (BLUM *et al.*, 1999). Na última década, a L-Arg tornou-se largamente reconhecida no âmbito da pesquisa cardiovascular por ser o precursor para a síntese do óxido nítrico, potente vasodilatador endógeno, e outros efeitos cardiovasculares como inibição da agregação plaquetária, da proliferação do músculo liso e da atividade de enzimas oxidativas (COOKE e DZAU, 1997; COOKE, 2003).

Existem possibilidades de que a suplementação com L-Arg melhore a vasodilatação induzida pelo exercício. Isto porque estudos clínicos demonstraram

que a suplementação oral com L-Arg é capaz de melhorar vários parâmetros cardiovasculares. Um estudo recente mostrou que a suplementação oral com L-Arg promoveu benefícios cardiovasculares em 12 de 16 sujeitos avaliados (PRELI *et al.*, 2002). Estudos envolvendo sujeitos hipercolesterolêmicos mostraram que a suplementação oral com L-Arg promoveu inibição da agregação plaquetária (WOLF *et al.*, 1997). Outros benefícios incluem a redução da adesão de monócitos na célula endotelial com conseqüente redução da aterogênese (CHAN *et al.*, 2000), redução dos níveis plasmáticos de endotelina (LERMAN *et al.*, 1998), melhora no fluxo sanguíneo do antebraço, distância percorrida em pacientes com insuficiência venosa e sintomas subjetivos em pacientes com insuficiência cardíaca (RECTOR *et al.*, 1996). Em sujeitos idosos saudáveis, a administração de L-Arg levou à diminuição do LDL colesterol e redução da razão LDL/HDL colesterol (MARCHESI *et al.*, 2001). Em pacientes hipertensos, a administração de L-Arg resultou em redução da pressão arterial (LIM *et al.*, 2004; PALLOSHI *et al.*, 2004; MARTINA *et al.*, 2008). Mesmo quando a pressão arterial não foi afetada, ocorreu melhora da dilatação mediada pelo fluxo em artéria braquial (LEKAKIS *et al.*, 2002).

Dados recentes relacionam o óxido nítrico com emagrecimento ou redução do ganho ponderal. A suplementação de L-Arg diminuiu a massa gordurosa de ratos ZDF, um modelo genético de ratos obesos com diabetes tipo II (FU *et al.*, 2005). Também reduziu ganho ponderal do tecido adiposo branco em ratos Sprague-Dawley com obesidade induzida por dieta rica em gorduras (JOBGEN *et al.*, 2009). Dentre os supostos mecanismos envolvidos neste processo estariam a participação da L-Arg na estimulação da lipólise dos adipócitos brancos, na captação periférica de glicose e na biogênese mitocondrial. Este e outros supostos mecanismos estão apresentados na figura 4 (JOBGEN *et al.*, 2006)



Figura 4. Mecanismos pelos quais o óxido nítrico participa do balanço energético e emagrecimento. Fonte: Modificado de Jobgem et al, 2006.

2.7- Estudos com artérias periféricas

O menor calibre das artérias periféricas impõe sérias limitações ao seu estudo. Assim, a maior parte das pesquisas analisando a reatividade vascular existente na literatura foi feita com artérias de grande calibre como aorta, coronárias e mesentéricas. Entretanto, as artérias de menor calibre desempenham importante papel no fluxo sanguíneo e no controle da pressão arterial. Isso se deve ao fato de que a soma da área destas artérias periféricas ultrapassa a área de artérias centrais, de modo que a resistência periférica e o controle da pressão arterial dependem em muito destes vasos (MULVANY e AALKJAER, 1990). Além disso, alterações em seu diâmetro e em sua estrutura morfofuncional estão positivamente associadas à

etiologia de diversas doenças cardiovasculares como hipertensão arterial e doença arterial obstrutiva vascular (DONATO et al., 2007)

A artéria femoral ramifica-se da artéria aorta para os lados direito e esquerdo para direcionar o fluxo sanguíneo para os membros inferiores. Em ratos, percorre um pequeno trecho como uma porção proximal, após o qual sofre uma diminuição em seu calibre para se converter na porção distal. Esta porção, por sua vez, é quem efetivamente se insere na musculatura esquelética dos membros inferiores, onde sofrerá várias ramificações até se converter em arteríolas e realizar a nutrição e oxigenação dos tecidos.

3- JUSTIFICATIVA

Embora seja bem estabelecido que o treinamento físico é uma eficaz ferramenta no controle da hipertensão arterial, os mecanismos vasodilatadores induzidos pelo exercício físico ainda não estão totalmente elucidados. Já está claro que protocolos de treinamento são capazes de melhorar o relaxamento mediado pelo endotélio, mas a influência do exercício sobre a resposta vasodilatadora pela via da estimulação β adrenérgica ainda precisa ser estudada.

Estudos com reatividade vascular em artérias femoral de ratos ainda são escassos até o momento. O motivo para isto é que este vaso apresenta um calibre muito pequeno, de modo que, para estudá-lo é necessário um instrumento especializado em relação os que são usados com artérias de maior calibre, como aorta, carótida e mesentérica de primeira ordem. No entanto, o estudo das respostas do exercício na reatividade da artéria femoral é particularmente interessante na medida em que estes vasos são os que suprem os músculos exercitados em ratos em exercícios de corrida ou natação, assegurando o aporte sanguíneo para estes músculos ativos durante o exercício.

Assim, o estudo da influência do exercício sobre a sensibilidade β adrenérgica de artéria femoral de ratos representa uma iniciativa relevante na direção de suprir esta lacuna na literatura atual.

Como já devidamente pontuado, a L-arginina tem sido apontada como um aminoácido de potencial terapêutico em várias enfermidades como a obesidade, resistência á insulina de hipertensão, através de sua capacidade de aumentar a síntese de NO por meio da ativação da enzima eNOS e do GMPc. Embora recentemente tem sido proposto que a ativação dos receptores β adrenérgicos possa ativar a eNOS, nenhum estudo até o momento investigou a associação entre suplementação de L-arginina com alteração na sensibilidade β adrenérgica.

Este trabalho apresenta-se potencialmente relevante na prática clínica, uma vez que tanto o exercício físico quanto aspectos nutricionais têm sido apontados meios pelos quais se pode obter redução dos valores pressóricos em sujeitos hipertensos. Considerando ainda que a hipertensão arterial é uma enfermidade poligênica, e que por este motivo, deve ser tratada numa abordagem multifatorial, o estudo da associação de dois agentes que individualmente são potencialmente

vasodilatadores e capazes de reduzir a pressão arterial ratifica a relevância clínica deste trabalho.

4- HIPÓTESE

Considerando que diversas evidências mostram que o treinamento físico promove maior produção de NO e que a ativação dos receptores β adrenérgicos ativa a via NO-GMPc, neste estudo foi testada a hipótese de que a associação de treinamento físico com suplementação de L-arginina melhora a resposta relaxante mediada pelos receptores β adrenérgicos em artéria femoral de ratos.

5- OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi:

Avaliar a influência do exercício físico e da suplementação da L-arginina sobre a sensibilidade da resposta relaxante mediada pelos receptores β adrenérgicos em anéis de artéria femoral de ratos.

Os objetivos específicos foram:

1. Avaliar a potência e resposta máxima ao agonista isoproterenol na presença e na ausência de endotélio.
2. Avaliar a participação dos receptores β_1 adrenérgicos na resposta relaxante através da utilização do antagonista seletivo CGP 20712^a na presença e na ausência de endotélio.
3. Avaliar a participação dos receptores β_2 adrenérgicos na resposta relaxante, através da utilização do antagonista seletivo ICI 118,551 na presença e na ausência de endotélio.

6- METODOLOGIA

6.1- Animais

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética para uso de animais da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP (Protocolo número:1307-1). Os animais dos grupos experimentais foram ratos Wistar machos (303 - 400 g), com idade de 12 semanas, todos previamente sedentários, provenientes da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Eles foram mantidos no Biotério de Manutenção do Departamento Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas, alojados em caixas coletivas com cinco animais, em ciclos de claro/escuro (12/12 h), recebendo ração padrão (Labina, Purina) e água *ad libitum*. O consumo diário de ração e líquido foi medido em todos os grupos.

Previamente ao estudo do efeito do treinamento físico e da suplementação com L-arginina, avaliamos as propriedades farmacológicas (respostas contráteis e relaxantes) das porções proximal e distal da artéria femoral. Para isso, foram comparadas as respostas aos agonistas contráteis fenilefrina (1 μ M, 3 μ M e 10 μ M) e serotonina, nas mesmas concentrações. Adicionalmente, foram feitas curvas à forskolina, um ativador direto de AMPc (1nM – 10 μ M) para se detectar possíveis diferenças relaxantes entre as duas porções desta artéria. Após esta análise, a porção proximal foi escolhida para o estudo dos diferentes protocolos experimentais.

Os animais foram divididos em quatro grupos, denominados: sedentários (SD), treinados (TR), sedentários com suplementação de L-arginina (SD-ARG) e treinados com suplementação de L-arginina TR-ARG.

6.2- Programa de Treinamento Físico: corrida em esteira

As sessões de exercício físico foram realizadas 5 dias por semana, 60 minutos em cada sessão, durante um período de 4 semanas. Os animais foram treinados em uma esteira ergométrica elétrica sem inclinação, em baias individuais, com as seguintes dimensões: 0,70 m de largura, 0,45 m de altura e 1,35 m de comprimento. Na semana que antecedeu o período de treinamento, todos os animais foram submetidos a uma semana de adaptação ao exercício que consistiu de corrida na esteira em velocidades variando entre de 0,3 no primeiro dia até 0,6 km/h no quinto dia da semana. Progressões de tempo na duração das sessões foram realizadas até que os animais completassem 60 minutos. Ao final deste período, os animais considerados corredores foram selecionados para compor os grupos TR e TR-ARG. O treinamento físico foi iniciado com uma velocidade de 0,6 Km/h na primeira sessão, aumentando progressivamente conforme a evolução dos animais, até atingir velocidade final entre 1,0 de 1,2 Km/h a partir da segunda semana de treinamento. A figura 5 ilustra os procedimentos de adaptação e treinamento, com as velocidades utilizadas em cada semana. Esta intensidade de exercício escolhida corresponde a 70% a 80% do VO_{2max} . (PRIVIERO et al., 2004) e coincide com o limiar anaeróbio, conforme o protocolo MFEL (máxima fase estável de lactato) (MANCHADO et al., 2005).. Após o término do período total de treinamento, os animais foram mantidos em repouso por um período de 48 horas, antes de serem sacrificados.

Adaptação	1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
0,3 – 0,6 Km/h	0,6 – 1,2 Km/h	1,0 – 1,2 Km/h	1,0 – 1,2 Km/h	1,0 – 1,2 Km/h

Figura 5: Protocolo de treinamento dos animais mostrando as velocidades utilizadas em cada semana.

6.3- Suplementação com L-arginina

O suplemento nutricional L-arginina (Sigma Co. St. Louis, USA) foi adicionado na água de beber dos grupos SD-ARG e TR-ARG numa proporção de 1,25g para cada litro de água, o equivalente a uma concentração de 143,5 mM. A suplementação de L-arginina foi feita simultaneamente ao treinamento físico no grupo TR-ARG. Este tratamento durou quatro semanas.

6.4- Anéis isolados de artéria femoral

Quarenta e oito horas após encerrado os protocolos de exercício físico e suplementação com L-arginina, os animais foram sacrificados com dióxido de carbono. Em seguida, a artéria femoral direita foi isolada e imediatamente colocada em solução de Krebs-Ringer. Após remoção dos tecidos gorduroso e conjuntivo, cortes transversais foram feitos para a obtenção dos anéis. De cada artéria foram retirados dois anéis de aproximadamente 1mm cada, que foram montados em cubas para órgão isolado de 5 ml contendo solução de Krebs-Ringer (composição em mM: NaCl: 118; NaHCO₃: 25; glicose 5,6; KCl: 4,7; KH₂PO₄: 1,2; MgSO₄.7H₂O: 1,17 e CaCl₂.2H₂O: 2,5), aquecida a 37°C e borbulhada com 95% de O₂ e 5% de CO₂. No procedimento de montagem, dois fios de tungstênio de 40 µm de diâmetro foram passados pelo lúmen dos anéis sem danificar o endotélio em alguns dos anéis. As extremidades de cada um dos fios foram fixadas nos dois suportes do sistema de registro de dados. Uma tensão inicial de 1 mN foi aplicada aos tecidos (ANGUS e WRIGHT, 2000; DRESCHER *et al.*, 2006). Após um período de estabilização de 60 minutos, a solução de Krebs-Ringer foi substituída por uma solução de KCl (80mM de KCl e 42,7mM de NaCl), para testar a viabilidade dos tecidos. Posteriormente, os tecidos foram lavados com solução de Krebs-Ringer e receberam 1 µM de fenilefrina. Após apresentarem estabilização da contração em resposta à fenilefrina, foi adicionado à solução 1µM de acetilcolina (ACh) para testar a integridade do endotélio. Os tecidos que não contraíram com KCl foram descartados. Do mesmo modo, os tecidos que foram preparados com endotélio não relaxaram com ACh

foram descartados, enquanto os tecidos que foram preparados com remoção física do endotélio, mas que apresentaram relaxamento com ACh também foram desconsiderados. As alterações de tensão foram medidas por meio de um miógrafo para micro-vasos DMT (AD Instruments, Austrália) e registradas em sistema de captura de dados PowerLab 830 (AD Instruments, Austrália), juntamente com o software LabChart 6 Pro (AD Instruments, Austrália).

6.5- Curvas concentração-efeito ao isoproterenol na presença e na ausência de endotélio

Para avaliar se os tratamentos utilizados afetaram a sensibilidade dos tecidos a agonista β -adrenérgico não seletivo, foram obtidas curvas concentração-efeito cumulativas ao isoproterenol (1nM – 10 μ M), na presença e na ausência de endotélio, pré-contraídos com fenilefrina (1 μ M). As curvas concentrações-efeito foram realizadas com aumentos em meia unidade logarítmica entre cada concentração (VAN ROSSUM, 1963). Os dados obtidos nas curvas concentração-efeito em anéis de artéria femoral foram avaliados segundo a equação descrita abaixo:

$$E = E_{\max} / ((1 + (10^c / 10^x)^n) + \Phi)$$

A letra E representa o efeito do agonista na resposta tecidual; E_{\max} representa a resposta máxima que o agonista pode produzir; c representa o logaritmo da EC_{50} , definida como a concentração do agonista que produz metade da resposta máxima; x representa o logaritmo das concentrações do agonista; o exponencial n é o coeficiente angular ou inclinação, o qual define o tipo de curva concentração-efeito obtida e, finalmente, o símbolo Φ representa a resposta observada na ausência do agonista.

6.6- Curvas concentração-efeito ao isoproterenol na ausência e na presença de antagonistas seletivos para os receptores β adrenérgicos de anéis de artéria femoral com endotélio intacto ou removido

Para avaliar a participação dos receptores β_1 -adrenérgicos, curvas concentração-efeito ao isoproterenol foram obtidas na presença e na ausência do antagonista seletivo β_1 , CGP 20712A (30 nM). Os anéis de artéria femoral foram incubados previamente com CGP 20712A (30 nM) por 30 minutos; em seguida, as artérias foram pré-contraídas com 1 μ M de fenilefrina e curvas concentração-efeito para o isoproterenol foram obtidas. Da mesma maneira, participação dos receptores β_2 adrenérgico nesta preparação foi avaliada pelo uso do antagonista seletivo para este subtipo de receptor. Assim, curvas concentração-efeito ao isoproterenol foram obtidas na presença e na ausência do antagonista seletivo β_2 , ICI 118551 (30nM).

Todas as curvas ao isoproterenol, na ausência ou na presença dos antagonistas β -adrenérgicos foram precedidas por uma incubação de 30 minutos com 17- β estradiol (1 μ M), a fim de evitar recaptção de catecolaminas e conseqüente alteração da concentração dos agonistas no meio de incubação. Além disso, foi avaliado a participação do endotélio nas respostas relaxantes em artérias com endotélio intacto ou removido.

6.7- Análise Estatística

Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média para n experimentos. Previamente aos testes estatísticos os dados foram testados quanto á normalidade por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. As comparações entre os grupos para as curvas concentração-efeito ao isoproterenol foram feitas através do teste t de Student para amostras independentes ou por ANOVA de uma via ou duas vias. Em alguns casos, estes testes foram substituídos respectivamente pelos não-paramétricos de Mann Whitney, Kruskal-Wallis ou Friedman. Para comparar diferenças das respostas na ausência e na presença de antagonistas em um mesmo

grupo de animais, foi utilizado o teste t de Student para amostras pareadas. Para todos os testes, foi adotado nível de significância de 5%. Os testes foram realizados por meio do software GraphPad InStat, versão 3.06. Gráficos das curvas obtidas foram confeccionados utilizando-se o software GraphPad Prism, versão 3.0.

7- RESULTADOS

7.1 Propriedades farmacológicas de anéis de artéria femoral nas porções distal e proximal

Primeiramente, em nosso estudo, avaliamos as duas porções da artéria femoral para caracterizar as respostas contráteis e relaxantes dessas preparações. Observamos que as respostas contráteis das porções proximal e distal dos anéis da artéria femoral mediadas pelos receptores α adrenérgicos em resposta a 1 μ M de fenilefrina diferiram estatisticamente entre si (prox: $3,28 \pm 0,41$ mN, n=6 e distal: $1,47 \pm 0,20$ mN, n=3, $p < 0,05$). Somente em uma concentração de 10 μ M de fenilefrina, ou seja, dez vezes maior, é que os anéis de artéria femoral da porção distal passaram a exibir uma contração de $4,8 \pm 0,7$ mN, n=3, semelhante ao obtido com a concentração de 1 μ M na porção proximal. Por outro lado, o agonista serotoninérgico, 5HT (1 μ M), mostrou-se mais eficiente em produzir resposta contrátil tanto na porção distal ($5,5 \pm 0,6$ mN, n=5) quanto na proximal ($20 \pm 5,8$ mN, n=4), mantendo-se uma significativa melhor resposta contrátil no segmento distal.

Com relação às propriedades relaxantes, as porções proximal e distal da artéria femoral apresentaram valores de pEC_{50} estatisticamente similares para o agonista isoproterenol. No entanto, a resposta máxima (E_{max}), foi significativamente maior para a porção proximal quando os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina (em cerca de 70%) em relação o observado na porção distal, previamente pré-contraído com serotonina. Curvas feitas à forskolina, um ativador do segundo mensageiro AMPc no banho de incubação de tecidos contendo a porção distal de artéria femoral promoveu melhora significativa da resposta máxima, que foi similar ao obtido na porção proximal (Tabela 1). Posteriormente, os anéis da porção proximal foram pré-contraídos com serotonina, de modo que observou-se que a

resposta relaxante ao isoproterenol foi diminuída ao nível do que ocorrera com os anéis da porção distal, pré-contraídos com este mesmo agente contrátil (figura 6).

Tabela 1: Valores de pEC₅₀ e resposta máxima (%) ao isoproterenol nas porções proximal (n= 9), distal (n= 6) e na mesma preparação da artéria distal previamente incubada com forskolina (distal – forskolina), de artéria femoral de ratos.

PORÇÃO DE ARTÉRIA	pEC₅₀	Emax
Proximal	6,95 ± 0,09	95,8 ± 1,4
Distal	6,64 ± 0,21	29,3 ± 6,5 #
Distal - forskolina	6,55 ± 0,14	97,3 ± 3,3

Os dados representam as médias ± erro padrão da média para 6 – 9 animais.

indica diferença estatística entre as porções proximal e distal da artéria femoral (Teste T para amostras independentes)

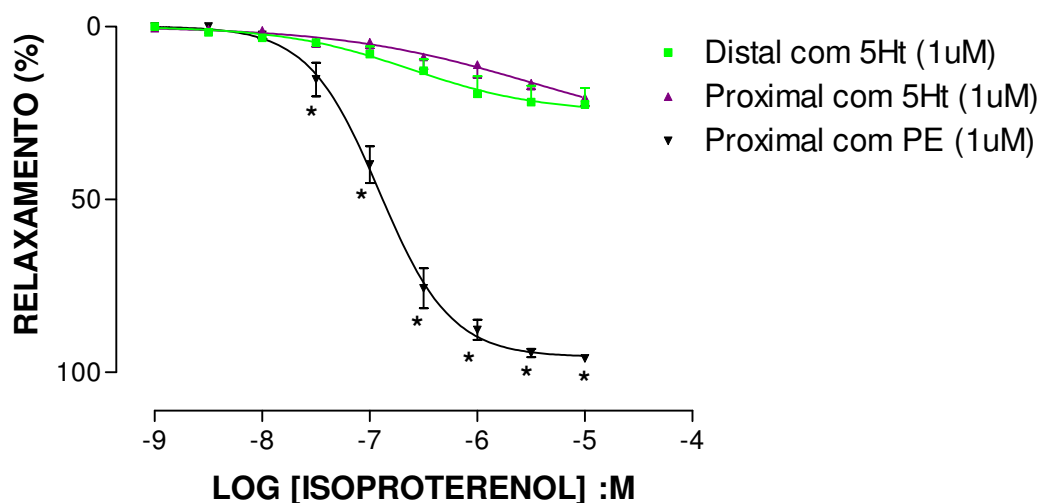


Figura 6: Curvas concentração-efeito ao isoproterenol em anéis de artéria femoral proximal (\blacktriangle) e distal (\blacksquare) de ratos pré contraídos com fenilefrina (PE, 1 μ m) ou serotonina (5HT, 1 μ M). Os dados representam a média e erro-padrão da média para 4 – 6 animais. * indica diferença estatística entre a porção proximal pré contraída com PE e as porções distal e proximal pré contraídas com 5HT (Teste de ANOVA de uma via).

A partir destas análises, a porção proximal foi escolhida para avaliar os efeitos do treinamento físico e da suplementação de L-arginina sobre a resposta relaxante mediada pelos receptores β -adrenérgicos em anéis de artéria femoral de ratos.

7.2- Peso corporal, ingestão alimentar e hídrica dos animais

O peso corporal inicial dos animais foi similar entre os grupos. Os animais treinados (TR) apresentaram menor ganho de peso corporal quando comparados ao grupo SD. A suplementação com L-arginina não promoveu qualquer alteração do ganho de peso corporal. Por outro lado, a associação do treinamento físico com a suplementação com L-arginina provocou significativa perda de peso corporal quando comparado aos demais grupos. Os dados estão sumarizados na tabela 2 e na figura 7.

A média de ingestão diária de água não diferiu entre os grupos durante todo o experimento. No entanto, os dois grupos de animais treinados tiveram uma ingestão alimentar (ração) em torno de 20% menor em relação aos grupos que

permaneceram sedentários. Esta diferença foi estatisticamente significativa (tabela 2).

Tabela 2: Peso corporal, ingestão alimentar e hídrica dos animais sedentários (SD, n= 9), treinados (TR, n= 8), sedentários que suplementaram L-arginina (SD-ARG, n= 4) e treinados que suplementaram L-arginina (TR-ARG, n= 4).

PARAMETROS	SD	TR	SD-ARG	TR-ARG
Peso inicial (g)	352 ± 7	351 ± 7	366 ± 2	343 ± 11
Peso final (g)	434 ± 10 ^a	392 ± 6 ^{ab}	431 ± 9 ^a	315 ± 9 ^{abc}
% de variação do peso	23	12	18	-8,2
Ingestão hídrica diária (ml)	230 ± 20	237 ± 23	243 ± 27	221 ± 26
Ingestão alimentar diária (mg)	147 ± 4	122 ± 5 ^d	146 ± 5	121 ± 5 ^d

Valores representam as médias ± erro padrão da média.

^a indica diferença estatística entre os valores inicial e final para cada grupo (teste T para amostras pareadas);

^b indica diferença estatística em relação ao grupo SD (Teste de Kruskal Wallis)

^c indica diferença estatística entre TR e TR-ARG (Teste de Kruskal Wallis)

^d indica diferença estatística em relação aos grupos SD e SD-ARG (Teste de Kruskal Wallis).

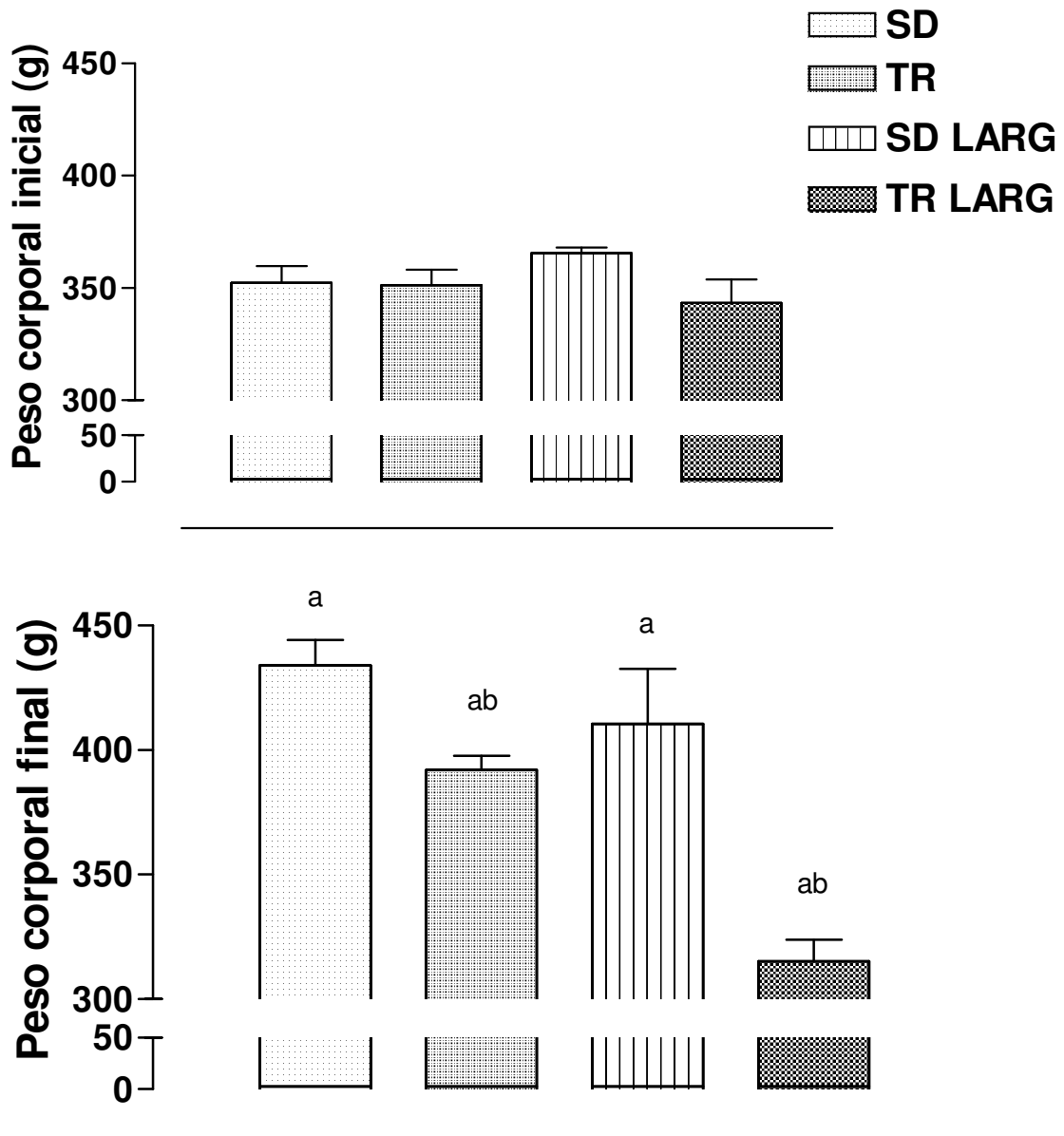


Figura 8: Valores de peso corporal no início e ao final do estudo de animais sedentários (SD), treinados (TR), sedentários que suplementaram L-arginina (SD-ARG) e treinados que suplementaram L-arginina (TR-ARG). Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 4 – 9 animais. ^a indica diferença estatística entre os valores inicial e final em cada grupo. ^b indica diferença estatística em relação à SD (Teste T pareado e Teste de Kruskal Wallis).

7.3- Respostas à fenilefrina e acetilcolina

A resposta contrátil à fenilefrina na concentração de 1 μM foi similar em anéis de artéria femoral entre os grupos. De maneira semelhante, a resposta relaxante a acetilcolina na concentração de 1 μM não foi diferente entre os grupos estudados. Estes dados são mostrados na tabela 3.

Tabela 3: Respostas contrátil e relaxante a fenilefrina (PE, 1 μM) e acetilcolina (ACh, 1 μM), em anéis de artéria femoral de ratos sedentários (SD, n=9), treinados (TR, n=8), sedentários suplementados com L-arginina (SD-ARG, n=4) e treinados suplementados com L-arginina (TR-ARG, n=4)

GRUPOS	Contração à PE (mN/mm)	% de relaxamento à ACh
SD	3,3 \pm 0,4	85,9 \pm 1,6
TR	3,3 \pm 0,6	83,3 \pm 4,7
SD-ARG	4,3 \pm 0,9	85,6 \pm 1,9
TR-ARG (n=4)	4,9 \pm 0,7	82,3 \pm 5,1

Os dados representam as médias \pm erro padrão da média para 4 – 9 animais. Realizado o teste de Kruskal Wallis).

7.4- Curvas concentração-efeito ao isoproterenol em artéria femoral com ou sem endotélio

Com endotélio:

A suplementação com L-arginina melhorou a resposta relaxante ao isoproterenol em anéis de artéria femoral quando comparado aos anéis de animais treinados e suplementados, em cerca de duas vezes. Por outro lado, a treinamento físico per se reduziu a resposta relaxante ao isoproterenol em nível da $p\text{EC}_{50}$. Estes dados estão sumarizados na tabela 4 e na figura 8, painel A e B.

Sem endotélio

A remoção do endotélio promoveu melhora da resposta relaxante mediada pelos receptores β adrenérgicos em anéis de artéria femoral de animais treinados, em nível de pEC_{50} , que não foram diferentes do grupo sedentário. A remoção do endotélio manteve a melhora da resposta relaxante ao isoproterenol no grupo sedentário e suplementado com L-Arg em nível da pEC_{50} . Estes dados estão sumarizados na tabela 4 e na figura 8, painel C e D.

As respostas máximas ao isoproterenol não foram alteradas em todos os grupos estudados (tabela 4).

Tabela 4: Valores de pEC_{50} e resposta máxima ao isoproterenol em anéis com (E^+) e sem (E^-) endotélio de artéria femoral de ratos sedentários (SD), treinados (TR), sedentários suplementados com L-arginina (SD-ARG) e treinados suplementados com L-arginina (TR-ARG).

	SD	TR	SED-ARG	TR-ARG
E⁺				
pEC₅₀	7,13 ± 0,05	6,93 ± 0,03 ^a	7,22 ± 0,02 ^b	6,90 ± 0,01 ^a
E_{max}	96 ± 0,9	97 ± 1,1	95 ± 1,3	97 ± 1,3
E⁻				
pEC₅₀	7,15 ± 0,02	7,18 ± 0,02	7,38 ± 0,02 ^c	7,21 ± 0,02
E_{max}	99 ± 0,5	99 ± 0,2	99 ± 1,2	99 ± 1,3

Os dados representam as médias ± erro padrão da média para 4 – 8 animais.

^a indica diferença estatística entre os grupos SD e TR.

^b indica diferença estatística entre os grupos SD-ARG e TR-ARG.

^c indica diferença estatística entre os grupos SD-ARG e os demais grupos.

(Teste de ANOVA de uma via)

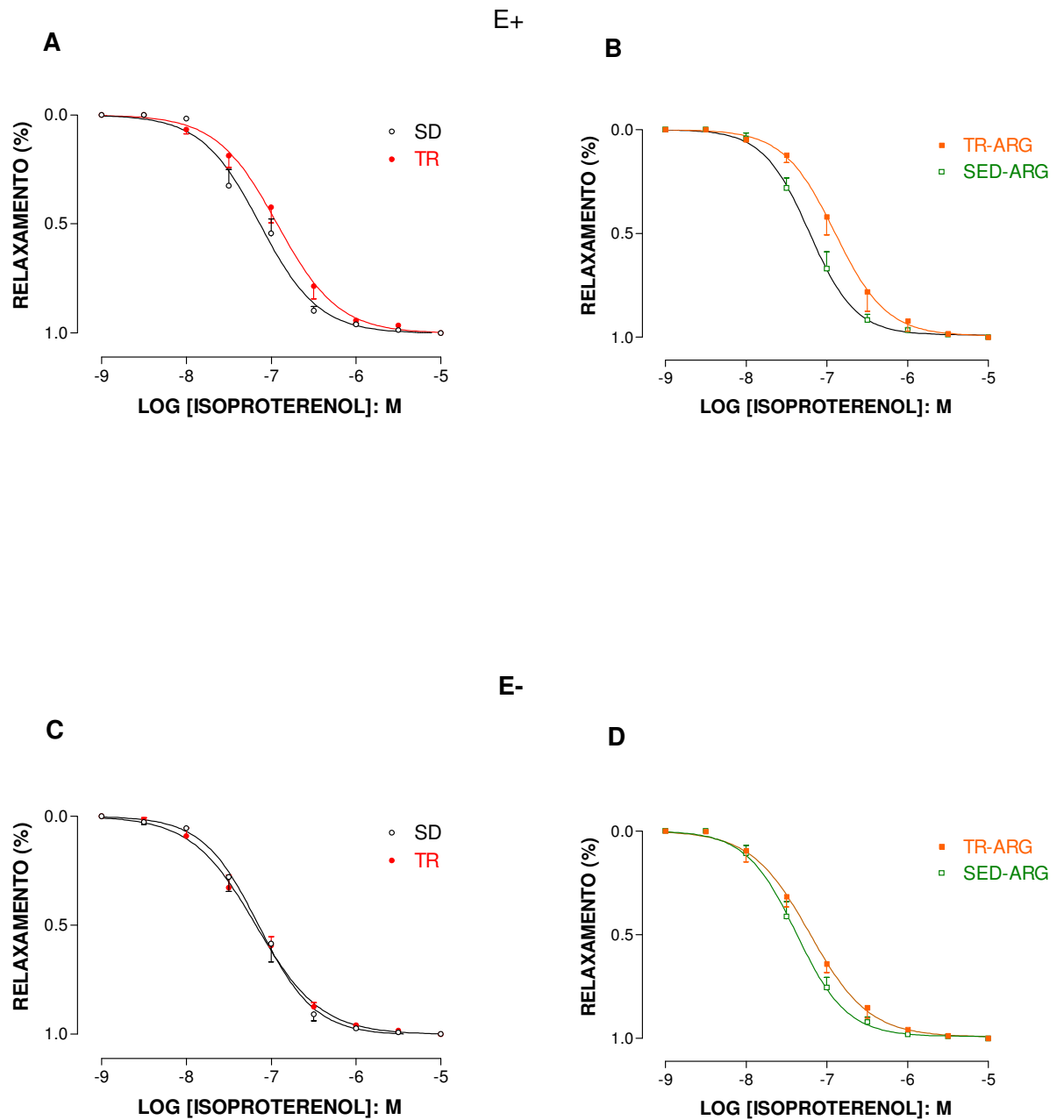


Figura 8: Curvas concentração - efeito ao isoproterenol em anéis com endotélio (painéis A e B) e sem endotélio (painéis C e D). Os dados representam as médias \pm erro padrão para 4 – 9 animais.

7.5- Curvas concentração-efeito ao isoproterenol em anéis de artéria femoral na presença do antagonista seletivo β_1 CGP 20712A com ou sem endotélio

Com endotélio

Para caracterizar a população de receptores β adrenérgicos que estaria mediando a resposta relaxante, curvas concentração-efeito ao isoproterenol na ausência e na presença do antagonista seletivo β_1 CGP 20712A foram construídas. Observamos que a concentração de 30 nM de CGP 20712A promoveu deslocamento à direita da curva concentração-efeito em anéis com endotélio de todos os grupos de animais, sem alteração da resposta máxima. A magnitude do deslocamento à direita das curvas concentração-efeito ao isoproterenol foi maior no grupo SD em relação aos demais grupos. Os dados estão sumarizados na tabela 5 e figura 9.

Sem endotélio

Nos anéis desprovidos de endotélio, ocorreu um comportamento similar em relação à pEC_{50} , desvio e E_{max} . No entanto, a magnitude dos desvios à direita nas curvas concentração-efeito ao isoproterenol em presença deste antagonista β foi muito maior nos vasos desprovidos de endotélio em relação aos anéis com endotélio íntegro. Avaliando a porcentagem dos deslocamentos à direita das curvas concentração-efeito ao isoproterenol entre os anéis de artéria femoral com e sem endotélio na presença do antagonista seletivo β_1 , verificamos que a remoção do endotélio promoveu cerca de 48, 157, 77 e 109% maior de deslocamento para os grupos SD, TR, SD-ARG e TR-ARG, respectivamente. Os dados estão mostrados na tabela 6 e figura 10.

Tabela 5: Valores de pEC_{50} , resposta máxima (E_{max}) ao isoproterenol na ausência (ISO) ou na presença (ISO+CGP) do antagonista β_1 CGP 20712 A em anéis com endotélio (E^+) de artéria femoral de ratos sedentários (SD), treinados (TR), sedentários suplementados com L-arginina (SD-ARG) e treinados suplementados com L-arginina (TR-ARG).

E⁺	SD	TR	SED-ARG	TR-ARG
pEC₅₀	7,13 ± 0,05 *	6,93 ± 0,03 *	7,22 ± 0,02 *	6,90 ± 0,01 *
ISO				
E_{max}	96 ± 0,9	97 ± 1,1	95 ± 1,3	97 ± 1,3
pEC₅₀	6,17 ± 0,02	6,36 ± 0,03	6,68 ± 0,03	6,18 ± 0,02
ISO-CGP				
E_{max}	89 ± 4,8	92 ± 4,2	87 ± 3,9	93 ± 2,1
DESVIO	8,9	3,7	3,5	5,2

Os dados representam as médias ± erro padrão da média para 4 – 7 animais

* indica diferença estatística entre os valores de pEC_{50} ao isoproterenol na ausência e na presença do antagonista CGP 20712 (Teste T pareado)

Tabela 6: Valores de pEC_{50} , resposta máxima (E_{max}) ao isoproterenol na ausência (ISO) ou na presença (ISO+CGP) do antagonista β_1 CGP 20712 A em anéis desprovidos de endotélio (E^-) de artéria femoral de ratos sedentários (SD), treinados (TR), sedentários suplementados com L-arginina (SD-ARG) e treinados suplementados com L-arginina (TR-ARG).

E^-	SD	TR	SED-ARG	TR-ARG
pEC₅₀	7,15 ± 0,02 *	7,18 ± 0,02 *	7,38 ± 0,02 *	7,21 ± 0,02 *
ISO				
E_{max}	99 ± 0,5	99 ± 0,16	98 ± 1,2	99 ± 1,3
pEC₅₀	6,03 ± 0,07	6,21 ± 0,02	6,59 ± 0,03	6,17 ± 0,03
ISO-CGP				
E_{max}	92 ± 2,7	95 ± 5,8	94 ± 1,3	93 ± 2,5
DESVIO	13,2	9,3	6,2	10,9

Os dados representam as médias ± erro padrão da média para 3 – 5 animais

* indica diferença estatística entre os valores de pEC_{50} ao isoproterenol na ausência e na presença do antagonista CGP 20712 (teste T pareado)

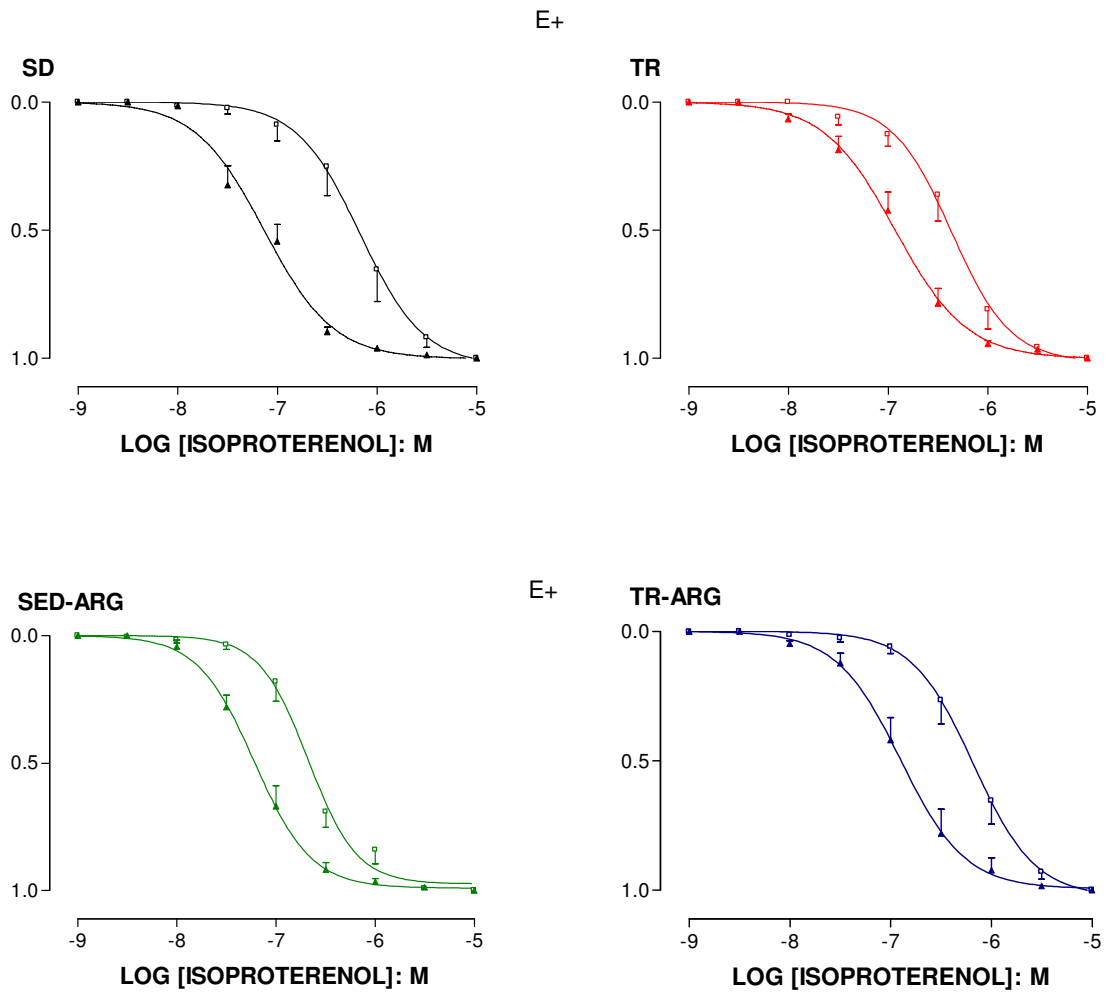


Figura 9: Curvas concentração-efeito ao isoproterenol em anéis de artéria femoral com endotélio (E^+) de ratos na ausência (▲) e na presença (□) do antagonista seletivo β_1 CGP 20712A de animais sedentários (SD), treinados (TR), sedentários que suplementaram L-arginina (SD-ARG) e treinados que suplementaram L-arginina (TR-ARG). Os dados representam as médias \pm erro padrão da média para 4 – 7 animais.

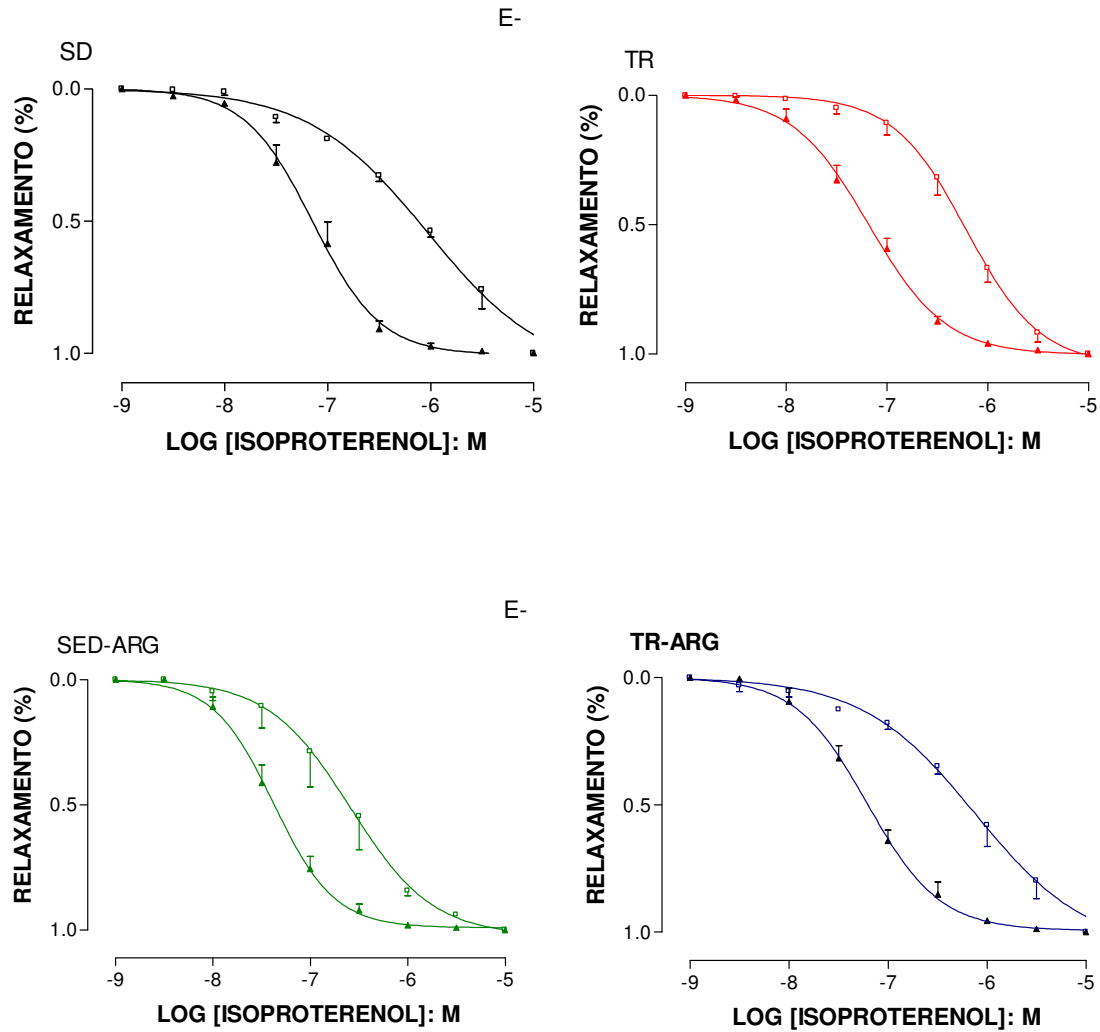


Figura 10: Curvas concentração-efeito ao isoproterenol em anéis de artéria femoral de ratos, desnudados de endotélio (E⁻), na ausência (▲) e na presença (□) do antagonista seletivo β_1 CGP 20712A. 20712A de animais sedentários (SD), treinados (TR), sedentários que suplementaram L-arginina (SD-ARG) e treinados que suplementaram L-arginina (TR-ARG). Os dados representam as médias \pm erro padrão da média para 3 – 5 animais.

7.6- Curvas concentração-efeito ao isoproterenol em anéis de artéria femoral na presença do antagonista seletivo β_2 ICI 118551 na presença e na ausência de endotélio

A caracterização dos receptores β adrenérgicos do subtipo β_2 foi feita na presença do antagonista seletivo ICI 118551. Nossos resultados mostram que a presença deste antagonista na preparação não provocou deslocamento importante das curvas concentração-efeito ao isoproterenol em anéis de artéria femoral, quer sejam providos ou desprovidos de endotélio. Os valores de E_{max} para o isoproterenol não diferiram estatisticamente entre os grupos, na ausência ou na presença do antagonista seletivo β_2 , ICI 118551, tanto nos anéis com endotélio íntegro, quanto na ausência de endotélio. Estes dados estão sumarizados nas tabelas 7 e 8 e ilustrados nas figura 11 e 12.

Tabela 7: Valores de pEC_{50} , resposta máxima (E_{max}) e desvio à direita das curvas ao isoproterenol na ausência (ISO) ou na presença (ISO+ICI) do antagonista β_2 118551 A em anéis com endotélio (E^+) de artéria femoral de ratos sedentários (SD), treinados (TR), sedentários suplementados com L-arginina (SD-ARG) e treinados suplementados com L-arginina (TR-ARG).

E⁺		SD	TR	SED-ARG	TR-ARG
	pEC₅₀	7,13 ± 0,05	6,93 ± 0,03	7,22 ± 0,02	6,90 ± 0,01
ISO	E_{max}	96 ± 0,9	97 ± 1,1	95 ± 1,3	97 ± 1,3
	pEC₅₀				
ISO-ICI		6,79 ± 0,01	6,92 ± 0,04	7,27 ± 0,03	6,99 ± 0,02
	E_{max}				
DESVIO		2,1	1,0	0,9	0,8

Os dados representam as médias ± erro padrão da média para 3 – 5 animais (realizado o teste T pareado)

Tabela 8: Valores de pEC_{50} , resposta máxima (E_{max}) e desvio à direita das curvas ao isoproterenol na ausência (ISO) ou na presença (ISO+ICI) do antagonista β_2 118551 A em anéis sem endotélio (E^-) de artéria femoral de ratos sedentários (SD), treinados (TR), sedentários suplementados com L-arginina (SD-ARG) e treinados suplementados com L-arginina (TR-ARG).

E⁻		SD	TR	SED-ARG	TR-ARG
ISO	pEC₅₀	7,15 ± 0,02	7,18 ± 0,02	7,38 ± 0,02	7,21 ± 0,02
	E_{max}	99 ± 0,5	99 ± 0,16	98 ± 1,2	99 ± 1,3
ISO-ICI	pEC₅₀	7,05 ± 0,01	6,93 ± 0,01	7,40 ± 0,05	7,14 ± 0,01
	E_{max}	96 ± 0,3	98 ± 0,7	95 ± 0,9	95 ± 4,3
DESVIO		1,3	1,8	0,95	1,2

Os dados representam as médias ± erro padrão da média para 3 – 5 animais (realizado o teste T pareado)

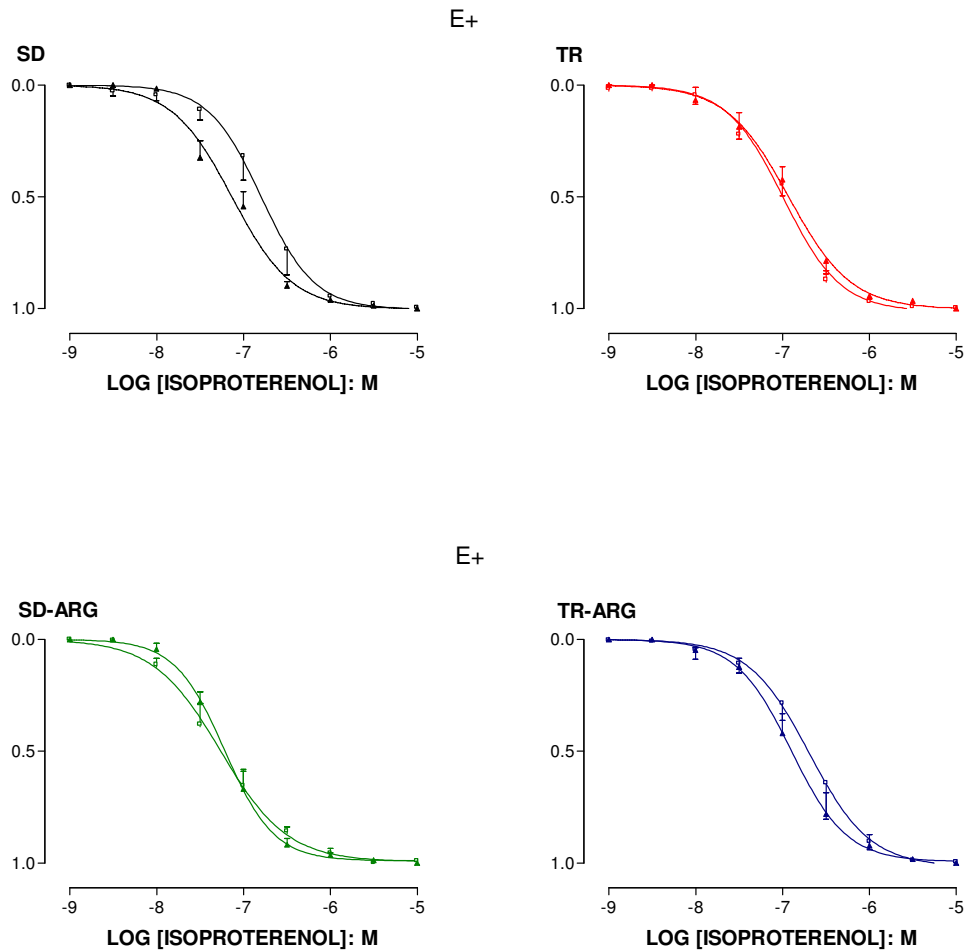


Figura 11: Curvas concentração-efeito ao isoproterenol em anéis de artéria femoral de ratos, com endotélio (E^+), na ausência (\blacktriangle , ISO) e na presença (\square , ISO+ICI) do antagonista β_2 ICI 118,551, de animais sedentários (SD), treinados (TR), sedentários que suplementaram L-arginina (SD-ARG) e treinados que suplementaram L-arginina (TR-ARG). Os dados representam as médias \pm erro padrão da média para 3 – 7 animais.

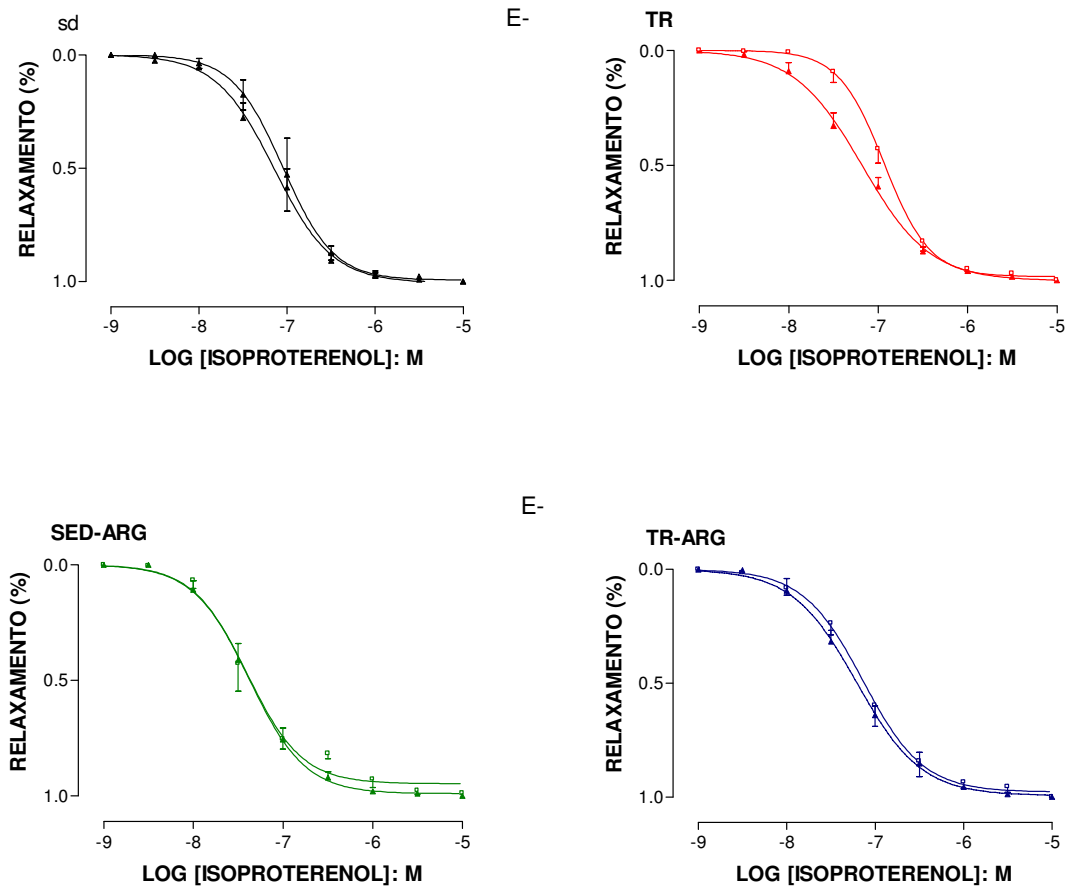


Figura 12: Curvas concentração-efeito ao isoproterenol em anéis de artéria femoral de ratos, sem endotélio (E⁻), na ausência (\blacktriangle , ISO) e na presença (\square , ISO+ICI) do antagonista β_2 ICI 118,551. de animais sedentários (SD), treinados (TR), sedentários que suplementaram L-arginina (SD-ARG) e treinados que suplementaram L-arginina (TR-ARG). Os dados representam as médias \pm erro padrão da média para 3 – 7 animais.

8- DISCUSSÃO

8.1- Caracterização das propriedades farmacológicas de anéis de artéria femoral distal e proximal

8.1.1- Resposta contrátil

Avaliando a eficácia intrínseca de anéis de artéria femoral de ratos observamos que a ordem de potência em promover a resposta contrátil na porção distal foi da seguinte maneira: serotonina > fenilefrina. Estes resultados mostram que a população de receptores serotoninérgicos e/ou seus mecanismos de transdução celular são mais efetivos em comparação com a população de receptores α -adrenérgicos na porção distal da artéria femoral de ratos.

Com relação à porção proximal, nossos dados mostram que a eficácia intrínseca da resposta contrátil para o agonista α -adrenérgico fenilefrina foi muito maior em comparação à porção distal de anéis de artéria femoral. Estes dados estão em consonância com estudos prévios que mostram similar resposta contrátil em diferentes cepas de ratos para a porção proximal em Wistar-Kyoto (PUZSEROVA *et al.*, 2006) e Sprague-Dawley (KLUSS *et al.*, 2005).

8.1.2- Resposta relaxante

De maneira semelhante à resposta contrátil, a eficácia intrínseca do isoproterenol foi marcadamente maior na porção proximal da artéria femoral quando

comparada à porção distal (cerca de 70%). Estes dados indicam que a população de receptores β -adrenérgicos que medeiam a resposta relaxante é maior na porção proximal da artéria femoral de ratos, ou então, o mecanismo de transdução celular é mais eficientemente acoplado ao sistema de relaxamento da musculatura lisa vascular desta porção proximal. Esta hipótese pode ser confirmada pela adição de forskolina ao banho dos anéis da porção distal da artéria femoral, que restaurou a resposta relaxante aos níveis similares àqueles encontrados para a porção proximal ao agonista β adrenérgico. Quando os anéis da porção proximal foram pré-contraindidos com fenilefrina (1 μ M), a resposta relaxante ao mesmo isoproterenol foi largamente aumentada. A magnitude desta resposta relaxante coincide com resultados de estudos prévios que mostram similares valores de potência e resposta máxima ao isoproterenol na porção proximal de artéria femoral de ratos Wistar também pré-contraindidos com fenilefrina (FUJIMOTO *et al.*, 1988) e Wistar Kyoto (ASANO *et al.*, 1982).

Em nossa busca nas diferentes bases de dados não encontramos nenhum estudo comparando essas duas porções. Assim, nosso trabalho é o primeiro a investigar as propriedades farmacológicas entre as porções distal e proximal de artéria femoral de ratos. Além disso, um estudo de revisão recente mostra que tanto os α quanto os β -adrenoceptores tem sido melhor investigados em tecido cardíaco do que em leitos vasculares, uma vez que mecanismos de transdução destes últimos são mais complexos e a população de receptores presentes nos vasos são múltiplos e apresentam maior dificuldade em sua classificação (ZANESCO e ANTUNES, 2007). Assim, as dificuldades encontradas para confrontar as diferenças encontradas entre as porções proximal e distal da artéria femoral de ratos do presente estudo com dados da literatura ratificam as informações destes autores. Ao mesmo tempo, mostram que as particularidades desta artéria ainda representam um campo aberto para investigações dentro da farmacologia cardiovascular.

Com base nesta melhor resposta da porção proximal da artéria femoral ao isoproterenol, este seguimento de artéria foi o escolhido por nós para o estudo dos efeitos dos protocolos experimentais na resposta relaxante mediada pelos adrenoceptores β .

8.2- Efeitos do treinamento físico e da suplementação de L-arginina no peso corporal e ingestão alimentar dos animais

Nossos resultados mostram que um protocolo de treinamento físico de quatro semanas foi efetivo em promover menor ganho de peso corporal. A suplementação com L-arginina sozinha não provocou qualquer alteração no peso corporal dos animais, ao passo que a associação do treinamento físico com a suplementação de L-arginina produziu uma perda significativa de peso corporal. O menor ganho de peso no grupo TR e o efetivo emagrecimento do grupo TR-ARG devem ser ponderados pelo fato de que estes dois grupos tiveram ingestão alimentar em torno de 20% menor em relação aos grupos que permaneceram sedentários. Diversos estudos relacionam a suplementação de L-arginina com melhoria da função cardiovascular (RECTOR et al., 1996; COOKE e DZAU, 1997; LEKAKIS et al., 2002; COOKE, 2003). Além disso, evidências recentes apontam que a L-arginina está implicada em várias vias metabólicas que conduzem ao emagrecimento em modelos animais. A explicação para isto é que o óxido nítrico, produzido a partir da L-arginina, participa da captação tecidual de glicose e da oxidação de glicose e ácidos graxos no músculo esquelético, e ainda melhora a lipólise nos adipócitos. O óxido nítrico estimularia a atividade da proteína quinase adenosina 3'5' monofosfato ativada com resultante diminuição dos níveis de malonil CoA; diminuiria a expressão de genes relacionados com a lipogênese e gliconeogênese; aumentaria a atividade do hormônio lipase sensível e das perilipinas; aumentaria a biogênese mitocondrial; aumenta o fluxo sanguíneo para os tecidos sensíveis à insulina (JOBGEN et al., 2006). Em estudos com animais, ratos ZDF e Sprague-Dawley apresentaram redução de gordura corporal com suplementação de L-arginina (FU et al., 2005; JOBGEN et al., 2009). No entanto, em nosso estudo, ratos Wistar não apresentaram alterações ponderais em resposta à suplementação de L-arginina. Uma possível explicação para estes resultados diferentes é que em nosso estudo, o protocolo de suplementação foi de apenas quatro semanas. No estudo de FU et al, 2005, os animais apresentaram uma significativa redução de 16% do peso corporal na décima semana de tratamento. Porém, na quarta semana de suplementação esta redução ainda era pequena (apenas 6%). Curiosamente, somente a associação de L-arginina com exercício

físico resultou em redução do peso corporal em quatro semanas de tratamento. Este dado nos indicou que a associação de treinamento físico à suplementação de L-arginina tem efeito potencializador do processo de emagrecimento promovido por cada um destes protocolos separadamente. Além disso, podemos especular que esta associação poderia elevar a síntese e liberação de óxido nítrico, que por sua vez promoveria a perda de peso neste grupo experimental.

8.3- Efeitos do treinamento físico e da suplementação de L-arginina nas respostas relaxantes e contráteis de anéis de arterial femoral: porção proximal

Com relação às respostas contráteis e relaxantes, a adição de 1 μ M de fenilefrina e acetilcolina respectivamente, mostrou que os receptores α -adrenérgicos e muscarínicos não foram afetados pelos protocolos de treinamento físico ou suplementação com L-arginina. Zanesco e Antunes (2007) relatam que os achados sobre os efeitos do treinamento físico sobre os α -adrenoceptores são controversos. Eles atribuem as diferenças nos resultados a limitações nas metodologias farmacológicas empregadas nos estudos. Em contrapartida, são vários os estudos que demonstraram um feito benéfico do treinamento físico na resposta relaxante à acetilcolina em ratos SHR, Fischer 344 e Wistar (JEN *et al.*, 2002; GRAHAM e RUSH, 2004; SPIER *et al.*, 2004), mas nenhum destes estudos foi realizado com a artéria femoral de ratos Wistar. De acordo com Jasperse e Laughlin (2006), a duração do treinamento, o tamanho da artéria e sua localização anatômica são fatores que modificam as respostas do treinamento físico sobre a função endotelial. Em outro estudo, estes mesmo autores também não encontraram melhoria na resposta relaxante à acetilcolina com um protocolo de treinamento para uma artéria do músculo sóleo de ratos Sprague Dawley, que é um vaso de pequeno calibre (JASPERSE e LAUGHLIN, 1999). Devido à vasta documentação demonstrando os efeitos benéficos da suplementação com L-arginina sobre a função endotelial, nós esperávamos que os animais com suplementação em nosso estudo apresentassem uma melhora da vasodilatação à acetilcolina. Uma possível explicação para a diferença entre nossos dados e os reportados na literatura é que nós trabalhamos com modelos de animais saudáveis e jovens, enquanto que estudos prévios foram

feitos com animais de laboratório e humanos que já apresentam disfunção endotelial (WOLF *et al.*, 1997; SHERIDAN *et al.*, 1998).

Não existem estudos que avaliaram a resposta β -adrenérgica precisamente em artérias femorais de ratos treinados e/ou com suplementação de L-Arg. Mesmo em outros leitos vasculares e com diferentes espécies animais, os dados são escassos e conflitantes. Alguns estudos não encontraram alterações na sensibilidade dos adrenocetores β em coronárias de porcos (OLTMAN *et al.*, 1992; OLTMAN *et al.*, 1995), arteríolas dos músculos sóleo e gastrocnêmio de ratos Fischer 344 idosos (DONATO *et al.*, 2007). Por outro lado, melhora da resposta relaxante ao isoproterenol em artéria carótida foi observada em ratos Wistar Kyoto idosos após treinamento físico (LEOSCO *et al.*, 2003). Nosso estudo mostrou que as respostas relaxantes mediadas pelos receptores β -adrenérgicos foram melhores em anéis de artéria femoral de animais sedentários e suplementados com L-Arg e o treinamento físico sozinho ou associado à suplementação com L-Arg promoveu pequena redução desta resposta (cerca de duas vezes). Assim como em nosso estudo, trabalho prévio mostrou redução da vasodilatação induzida pelo isoproterenol em coronárias de animais que realizaram protocolos de treinamento físico (ROGERS *et al.*, 1991). A razão para esta subsensibilidade promovida pelo exercício sobre os receptores β adrenérgicos não é clara para nós neste momento. Considerando que a magnitude de redução foi muito pequena e que o tempo de treinamento foi de apenas quatro semanas, seria interessante num estudo futuro avaliar um tempo maior de treinamento físico para melhor delineamento desta resposta.

De maneira inesperada, a remoção do endotélio melhorou a resposta relaxante de anéis de artéria femoral de animais treinados, trazendo os valores de potência similares aos do grupo sedentário. Esses dados sugerem que a resposta relaxante mediada pelos receptores β adrenérgicos em artéria femoral parece ser regulada por fatores derivados do endotélio e que o treinamento físico poderia estar aumentando a liberação de fatores contráteis derivados do endotélio nesta preparação em particular. Consistentemente, a potência ao isoproterenol em anéis de animais sedentários e suplementados com L-Arg manteve-se maior após a remoção do endotélio, mostrando que esses efeitos ocorrem na musculatura lisa vascular.

8.4- Caracterização da população de receptores β -adrenérgicos: antagonistas seletivos β_1 e β_2 na presença e na ausência de endotélio

Classicamente, a vasodilatação em animais de laboratório e humanos é atribuída aos adrenoceptores do subtipo β_2 (LANDS et al., 1967). No entanto, estudos mais recentes utilizando agonistas e antagonistas mais seletivos demonstraram também a participação dos adrenoceptores do subtipo β_1 na vasodilatação (GUIMARAES e MOURA, 2001). Além disso, um terceiro β -adrenoceptor (β_3), tem sido postulado estar presente em artérias de modelos animais. Isto porque o antagonista não seletivo, propranolol não foi capaz de bloquear a ação do BRL 37344, um agonista seletivo β_3 em artéria carótida de ratos (ORIOWO, 1994). A participação predominante dos β_1 já foi previamente demonstrada em alguns leitos vasculares como em artéria femoral de camundongos (CHRUSCINSKI et al., 2001), coronárias de cães (NAKANE *et al.*, 1988), e coronárias de humanos (MONOPOLI *et al.*, 1993). Até onde sabemos, este nosso estudo é o primeiro a demonstrar a predominância dos β_1 -adrenoceptores em artéria femoral de ratos Wistar. Assim, nossos dados mostram claramente que os adrenoceptores β_1 medeiam a resposta relaxante ao isoproterenol em artéria femoral de ratos.

De maneira interessante, a magnitude de deslocamento das curvas concentração-efeito ao isoproterenol na presença de antagonista β_1 - seletivo mostra que os animais treinados e/ou suplementados com L-Arg apresentam menor sensibilidade ao efeito antagonista do CGP 20712A sugerindo uma mudança conformacional do receptor em resposta aos diferentes protocolos experimentais. Além disso, a remoção do endotélio potencializa essas diferenças, sugerindo que o endotélio promove uma barreira funcional na atuação do antagonista β adrenérgico nesta preparação em particular.

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Os dados obtidos neste trabalho mostram que:

As porções proximal e distal da artéria femoral de ratos Wistar exibem diferenças marcantes tanto nas respostas contráteis quanto relaxantes, conforme descrito abaixo:

A porção proximal da artéria femoral de ratos Wistar apresenta uma resposta contrátil mais efetiva ao agonista α adrenérgico fenilefrina em comparação com a porção distal.

A resposta máxima dos receptores β adrenérgicos para o agonista isoproterenol é 70% maior na porção proximal em relação à distal em artéria femoral de ratos Wistar.

Com base nestes dados, as respostas ao exercício e à suplementação de L-arginina foram estudadas na porção proximal, obtendo-se os seguintes resultados:

A combinação de treinamento físico e suplementação de L-arginina é efetiva em promover perda de peso em ratos Wistar, enquanto que o treinamento físico ou a suplementação isoladamente não resultam em perdas de peso em um protocolo experimental de apenas quatro semanas.

O treinamento físico reduz os valores de pEC_{50} ao isoproterenol com endotélio e a sua remoção reestabelece esses valores aos do grupo controle;

A suplementação de L-arginina aumenta a sensibilidade β adrenérgica ao isoproterenol em anéis de artéria femoral de ratos Wistar com ou sem endotélio.

A vasodilatação da porção proximal da artéria femoral de ratos Wistar é mediada principalmente pelos adrenoceptores do subtipo β_1 .

A remoção do endotélio na presença de antagonista β_1 seletivo potencializa os deslocamentos das curvas concentração-efeito ao isoproterenol em todos os grupos estudados

CONCLUSÕES

A associação de treinamento físico e suplementação de L-arginina promove redução do peso corporal de ratos Wistar. Com relação à reatividade vascular, o treinamento físico, isoladamente, induz uma diminuição na sensibilidade de receptores β adrenérgicos do subtipo β_1 em anéis de artéria femoral destes animais. Nossos dados demonstraram que o endotélio participa na redução desta sensibilidade em resposta ao treinamento físico nesta preparação em particular.

REFERENCIAS

(ACMS)., A. C. S. M. Manual do ACSM para teste de esforço e prescrição de exercício. REVINTER. Rio de Janeiro, p.66. 2000

AHLQUIST, R. P. A study of the adrenotropic receptors. Am J Physiol, v.153, n.3, Jun, p.586-600. 1948.

AKIMOTO, Y.; HORINOUCI, T.; SHIBANO, M.; MATSUSHITA, M.; YAMASHITA, Y.; OKAMOTO, T., et al. Nitric oxide (NO) primarily accounts for endothelium-dependent component of beta-adrenoceptor-activated smooth muscle relaxation of mouse aorta in response to isoprenaline. J Smooth Muscle Res, v.38, n.4-5, Oct, p.87-99. 2002.

ANGUS, J. A.; WRIGHT, C. E. Techniques to study the pharmacodynamics of isolated large and small blood vessels. J Pharmacol Toxicol Methods, v.44, n.2, Sep-Oct, p.395-407. 2000.

ARRIBAS, S. M.; VILA, E.; MCGRATH, J. C. Impairment of vasodilator function in basilar arteries from aged rats. Stroke, v.28, n.9, Sep, p.1812-20. 1997.

ASANO, M.; AOKI, K.; MATSUDA, T. Reduced beta adrenoceptor interactions of norepinephrine enhance contraction in the femoral artery from spontaneously hypertensive rats. J Pharmacol Exp Ther, v.223, n.1, Oct, p.207-14. 1982.

AXELROD, J. Methylation reactions in the formation and metabolism of catecholamines and other biogenic amines. Pharmacol Rev, v.18, n.1, Mar, p.95-113. 1966.

BASSANI, R. A.; DE MORAES, S. Subsensitivity to beta-adrenoceptor agonists in right atria isolated from footshock-stressed rats. Gen Pharmacol, v.18, n.5, p.473-7. 1987.

BASTER, T.; BASTER-BROOKS, C. Exercise and hypertension. Aust Fam Physician, v.34, n.6, Jun, p.419-24. 2005.

BENOVIC, J. L.; BOUVIER, M.; CARON, M. G.; LEFKOWITZ, R. J. Regulation of adenylyl cyclase-coupled beta-adrenergic receptors. Annu Rev Cell Biol, v.4, p.405-28. 1988.

BIRNBAUMER, L. Receptor-to-effector signaling through G proteins: roles for beta gamma dimers as well as alpha subunits. Cell, v.71, n.7, Dec 24, p.1069-72. 1992.

BLANKESTEIJN, W. M.; RAAT, N. J.; WILLEMS, P. H.; THIEN, T. beta-Adrenergic relaxation in mesenteric resistance arteries of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats: the role of precontraction and intracellular Ca²⁺. J Cardiovasc Pharmacol, v.27, n.1, Jan, p.27-32. 1996.

BLUM, A.; PORAT, R.; ROSENSCHEIN, U.; KEREN, G.; ROTH, A.; LANIADO, S., et al. Clinical and inflammatory effects of dietary L-arginine in patients with intractable angina pectoris. Am J Cardiol, v.83, n.10, May 15, p.1488-90, A8. 1999.

BOHM, S. K.; GRADY, E. F.; BUNNETT, N. W. Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. Biochem J, v.322 (Pt 1), Feb 15, p.1-18. 1997.

BOUVIER, M.; COLLINS, S.; O'DOWD, B. F.; CAMPBELL, P. T.; DE BLASI, A.; KOBILKA, B. K., et al. Two distinct pathways for cAMP-mediated down-regulation of the beta 2-adrenergic receptor. Phosphorylation of the receptor and regulation of its mRNA level. J Biol Chem, v.264, n.28, Oct 5, p.16786-92. 1989.

BRAHMADEVARA, N.; SHAW, A. M.; MACDONALD, A. Evidence against beta 3-adrenoceptors or low affinity state of beta 1-adrenoceptors mediating relaxation in rat isolated aorta. Br J Pharmacol, v.138, n.1, Jan, p.99-106. 2003.

_____. ALpha1-adrenoceptor antagonist properties of CGP 12177A and other beta-adrenoceptor ligands: evidence against beta(3)- or atypical beta-adrenoceptors in rat aorta. Br J Pharmacol, v.142, n.4, Jun, p.781-7. 2004.

BRAWLEY, L.; SHAW, A. M.; MACDONALD, A. Beta 1-, beta 2- and atypical beta-adrenoceptor-mediated relaxation in rat isolated aorta. Br J Pharmacol, v.129, n.4, Feb, p.637-44. 2000a.

_____. Role of endothelium/nitric oxide in atypical beta-adrenoceptor-mediated relaxation in rat isolated aorta. Eur J Pharmacol, v.398, n.2, Jun 16, p.285-96. 2000b.

BRIONES, A. M.; DALY, C. J.; JIMENEZ-ALTAYO, F.; MARTINEZ-REVELLES, S.; GONZALEZ, J. M.; MCGRATH, J. C., et al. Direct demonstration of beta1- and evidence against beta2- and beta3-adrenoceptors, in smooth muscle cells of rat small mesenteric arteries. Br J Pharmacol, v.146, n.5, Nov, p.679-91. 2005.

BRODDE, O. E.; ZERKOWSKI, H. R.; BORST, H. G.; MAIER, W.; MICHEL, M. C. Drug- and disease-induced changes of human cardiac beta 1- and beta 2-adrenoceptors. Eur Heart J, v.10 Suppl B, Jun, p.38-44. 1989.

BURGEN, A. S.; IVERSEN, L. L. The inhibition of noradrenaline uptake by sympathomimetic amines in the rat isolated heart. Br J Pharmacol Chemother, v.25, n.1, Aug, p.34-49. 1965.

CALLIA, M. L.; DE MORAES, S. Heterogeneity of beta adrenoceptors in right atria isolated from cold-exposed rats. J Pharmacol Exp Ther, v.230, n.2, Aug, p.450-4. 1984.

CALLINGHAM, B. A.; BURGEN, A. S. The uptake of isoprenaline and noradrenaline by the perfused rat heart. Mol Pharmacol, v.2, n.1, Jan, p.37-42. 1966.

COMAN, D.; YAPLITO-LEE, J.; BONEH, A. New indications and controversies in arginine therapy. Clin Nutr, v.27, n.4, Aug, p.489-96. 2008.

COOKE, J. P. NO and angiogenesis. Atheroscler Suppl, v.4, n.4, Dec, p.53-60. 2003.

COOKE, J. P.; DZAU, V. J. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. Annu Rev Med, v.48, p.489-509. 1997.

COUILLARD, C.; DESPRES, J. P.; LAMARCHE, B.; BERGERON, J.; GAGNON, J.; LEON, A. S., et al. Effects of endurance exercise training on plasma HDL cholesterol levels depend on levels of triglycerides: evidence from men of the Health, Risk Factors, Exercise Training and Genetics (HERITAGE) Family Study. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.21, n.7, Jul, p.1226-32. 2001.

CHAN, J. R.; BOGER, R. H.; BODE-BOGER, S. M.; TANGPHAO, O.; TSAO, P. S.; BLASCHKE, T. F., et al. Asymmetric dimethylarginine increases mononuclear cell adhesiveness in hypercholesterolemic humans. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.20, n.4, Apr, p.1040-6. 2000.

CHIBA, S.; TSUKADA, M. Vascular responses to beta-adrenoceptor subtype-selective agonists with and without endothelium in rat common carotid arteries. J Auton Pharmacol, v.21, n.1, Feb, p.7-13. 2001.

CHRUSCINSKI, A.; BREDE, M. E.; MEINEL, L.; LOHSE, M. J.; KOBILKA, B. K.; HEIN, L. Differential distribution of beta-adrenergic receptor subtypes in blood vessels of knockout mice lacking beta(1)- or beta(2)-adrenergic receptors. Mol Pharmacol, v.60, n.5, Nov, p.955-62. 2001.

DE MORAES, R.; GIOSEFFI, G.; NOBREGA, A. C.; TIBIRICA, E. Effects of exercise training on the vascular reactivity of the whole kidney circulation in rabbits. J Appl Physiol, v.97, n.2, Aug, p.683-8. 2004.

DELP, M. D.; MCALLISTER, R. M.; LAUGHLIN, M. H. Exercise training alters endothelium-dependent vasoreactivity of rat abdominal aorta. J Appl Physiol, v.75, n.3, Sep, p.1354-63. 1993.

DESSY, C.; MONIOTTE, S.; GHISDAL, P.; HAVAUX, X.; NOIRHOMME, P.; BALLIGAND, J. L. Endothelial beta3-adrenoceptors mediate vasorelaxation of human coronary microarteries through nitric oxide and endothelium-dependent hyperpolarization. Circulation, v.110, n.8, Aug 24, p.948-54. 2004.

DESSY, C.; SALIEZ, J.; GHISDAL, P.; DANEAU, G.; LOBYSHEVA, II; FRERART, F., et al. Endothelial beta3-adrenoreceptors mediate nitric oxide-dependent vasorelaxation of coronary microvessels in response to the third-generation beta-blocker nebivolol. Circulation, v.112, n.8, Aug 23, p.1198-205. 2005.

DICARLO, S. E.; BLAIR, R. W.; BISHOP, V. S.; STONE, H. L. Role of beta 2-adrenergic receptors on coronary resistance during exercise. J Appl Physiol, v.64, n.6, Jun, p.2287-93. 1988.

DONATO, A. J.; LESNIEWSKI, L. A.; DELP, M. D. Ageing and exercise training alter adrenergic vasomotor responses of rat skeletal muscle arterioles. J Physiol, v.579, n.Pt 1, Feb 15, p.115-25. 2007.

DRESCHER, W.; VAROGA, D.; LIEBS, T. R.; LOHSE, J.; HERDEGEN, T.; HASSENPFUG, J., et al. Femoral artery constriction by norepinephrine is enhanced by methylprednisolone in a rat model. J Bone Joint Surg Am, v.88 Suppl 3, Nov, p.162-6. 2006.

DRIEU LA ROCHELLE, C.; BERDEAUX, A.; RICHARD, V.; GIUDICELLI, J. F. Coronary effects of a combined beta adrenoceptor blocking and calcium antagonist therapy in running dogs. J Cardiovasc Pharmacol, v.18, n.6, Dec, p.904-10. 1991.

EMORINE, L.; BLIN, N.; STROSBERG, A. D. The human beta 3-adrenoceptor: the search for a physiological function. Trends Pharmacol Sci, v.15, n.1, Jan, p.3-7. 1994.

EMORINE, L. J.; MARULLO, S.; BRIEND-SUTREN, M. M.; PATEY, G.; TATE, K.; DELAVIER-KLUTCHKO, C., et al. Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. Science, v.245, n.4922, Sep 8, p.1118-21. 1989.

FLEMING, I.; BUSSE, R. NO: the primary EDRF. J Mol Cell Cardiol, v.31, n.1, Jan, p.5-14. 1999.

FORD, A. P.; WILLIAMS, T. J.; BLUE, D. R.; CLARKE, D. E. Alpha 1-adrenoceptor classification: sharpening Occam's razor. Trends Pharmacol Sci, v.15, n.6, Jun, p.167-70. 1994.

FORJAZ, C. L. M.; BRANDÃO-RONDON, U. M.; NEGRÃO, C. Efeitos hipotensores e simpatolíticos do exercício aeróbio na hipertensão arterial. Rev Bras Hipertens, v.12, n.04, p.245-250. 2005.

FRANZONI, F.; GHIADONI, L.; GALETTA, F.; PLANTINGA, Y.; LUBRANO, V.; HUANG, Y., et al. Physical activity, plasma antioxidant capacity, and endothelium-dependent vasodilation in young and older men. Am J Hypertens, v.18, n.4 Pt 1, Apr, p.510-6. 2005.

FU, W. J.; HAYNES, T. E.; KOHLI, R.; HU, J.; SHI, W.; SPENCER, T. E., et al. Dietary L-arginine supplementation reduces fat mass in Zucker diabetic fatty rats. J Nutr, v.135, n.4, Apr, p.714-21. 2005.

FUJIMOTO, S.; DOHI, Y.; AOKI, K.; MATSUDA, T. Altered vascular beta adrenoceptor-mediated relaxation in deoxycorticosterone-salt hypertensive rats. J Pharmacol Exp Ther, v.244, n.2, Feb, p.716-23. 1988.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature, v.288, n.5789, Nov 27, p.373-6. 1980.

GABALLA, M. A.; ECKHART, A.; KOCH, W. J.; GOLDMAN, S. Vascular beta-adrenergic receptor system is dysfunctional after myocardial infarction. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.280, n.3, Mar, p.H1129-35. 2001.

GABALLA, M. A.; ECKHART, A. D.; KOCH, W. J.; GOLDMAN, S. Vascular beta-adrenergic receptor adenylyl cyclase system in maturation and aging. J Mol Cell Cardiol, v.32, n.9, Sep, p.1745-55. 2000.

GADEMAN, M. G.; SWENNE, C. A.; VERWEY, H. F.; VAN DER LAARSE, A.; MAAN, A. C.; VAN DE VOOREN, H., et al. Effect of exercise training on autonomic derangement and neurohumoral activation in chronic heart failure. J Card Fail, v.13, n.4, May, p.294-303. 2007.

GILMAN, A. G. G proteins: transducers of receptor-generated signals. Annu Rev Biochem, v.56, p.615-49. 1987.

GOLDIE, R. G.; PAPADIMITRIOU, J. M.; PATERSON, J. W.; RIGBY, P. J.; SPINA, D. Autoradiographic localization of beta-adrenoceptors in pig lung using [125I]-iodocyanopindolol. Br J Pharmacol, v.88, n.3, Jul, p.621-8. 1986.

GRAHAM, D. A.; RUSH, J. W. Exercise training improves aortic endothelium-dependent vasorelaxation and determinants of nitric oxide bioavailability in spontaneously hypertensive rats. J Appl Physiol, v.96, n.6, Jun, p.2088-96. 2004.

GUIMARAES, S.; MOURA, D. Vascular adrenoceptors: an update. Pharmacol Rev, v.53, n.2, Jun, p.319-56. 2001.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de fisiologia médica. Rio de Janeiro-RJ: Guanabara Koogan. 1996. 632 p.

HARRI, M. N. Physical training under the influence of beta-blockade in rats. II. Effects on vascular reactivity. Eur J Appl Physiol Occup Physiol, v.42, n.3, Nov, p.151-7. 1979.

HIGASHI, Y.; YOSHIZUMI, M. Exercise and endothelial function: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. Pharmacol Ther, v.102, n.1, Apr, p.87-96. 2004.

IELLAMO, F. Neural mechanisms of cardiovascular regulation during exercise. Auton Neurosci, v.90, n.1-2, Jul 20, p.66-75. 2001.

IGNARRO, L. J. Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. Biosci Rep, v.19, n.2, Apr, p.51-71. 1999.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. Proc Natl Acad Sci U S A, v.84, n.24, Dec, p.9265-9. 1987.

ISENOVIC, E.; WALSH, M. F.; MUNIYAPPA, R.; BARD, M.; DIGLIO, C. A.; SOWERS, J. R. Phosphatidylinositol 3-kinase may mediate isoproterenol-induced vascular relaxation in part through nitric oxide production. Metabolism, v.51, n.3, Mar, p.380-6. 2002.

IVERSEN, L. L. Inhibition of Noradrenaline Uptake by Drugs. J Pharm Pharmacol, v.17, Jan, p.62-4. 1965a.

_____. The uptake of noradrenaline by the isolated perfused rat heart. J. Pharmacol. Chemother, v.21, p.523-537. 1965b.

JASPERSE, J. L.; LAUGHLIN, M. H. Vasomotor responses of soleus feed arteries from sedentary and exercise-trained rats. J Appl Physiol, v.86, n.2, Feb, p.441-9. 1999.

JEN, C. J.; CHAN, H. P.; CHEN, H. I. Acute exercise enhances vasorelaxation by modulating endothelial calcium signaling in rat aortas. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.282, n.3, Mar, p.H977-82. 2002.

JOBGEN, W.; MEININGER, C. J.; JOBGEN, S. C.; LI, P.; LEE, M. J.; SMITH, S. B., et al. Dietary L-arginine supplementation reduces white fat gain and enhances skeletal muscle and brown fat masses in diet-induced obese rats. J Nutr, v.139, n.2, Feb, p.230-7. 2009.

JOBGEN, W. S.; FRIED, S. K.; FU, W. J.; MEININGER, C. J.; WU, G. Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. J Nutr Biochem, v.17, n.9, Sep, p.571-88. 2006.

JOHNSON, L. R.; RUSH, J. W.; TURK, J. R.; PRICE, E. M.; LAUGHLIN, M. H. Short-term exercise training increases ACh-induced relaxation and eNOS protein in porcine pulmonary arteries. J Appl Physiol, v.90, n.3, Mar, p.1102-10. 2001.

JUBERG, E. N.; MINNEMAN, K. P.; ABEL, P. W. Beta 1- and beta 2-adrenoceptor binding and functional response in right and left atria of rat heart. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, v.330, n.3, Sep, p.193-202. 1985.

KANG, K. B.; RAJANAYAGAM, M. A.; VAN DER ZYPP, A.; MAJEWSKI, H. A role for cyclooxygenase in aging-related changes of beta-adrenoceptor-mediated relaxation in rat aortas. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, v.375, n.4, Jun, p.273-81. 2007.

KENAKIN, T. P.; FERRIS, R. M. Effects of in vivo beta-adrenoceptor down-regulation on cardiac responses to prealterol and pirbuterol. J Cardiovasc Pharmacol, v.5, n.1, Jan-Feb, p.90-7. 1983.

KINGWELL, B. A. Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease. Faseb J, v.14, n.12, Sep, p.1685-96. 2000.

KLUSS, H. A.; BUCKWALTER, J. B.; HAMANN, J. J.; CLIFFORD, P. S. Acidosis attenuates P2X purinergic vasoconstriction in skeletal muscle arteries. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.288, n.1, Jan, p.H129-32. 2005.

KOJDA, G.; HAMBRECHT, R. Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? Cardiovasc Res, v.67, n.2, Aug 1, p.187-97. 2005.

KOZLOWSKA, H.; SZYMSKA, U.; SCHLICKER, E.; MALINOWSKA, B. Atypical beta-adrenoceptors, different from beta 3-adrenoceptors and probably from the low-affinity state of beta 1-adrenoceptors, relax the rat isolated mesenteric artery. Br J Pharmacol, v.140, n.1, Sep, p.3-12. 2003.

KULICS, J. M.; COLLINS, H. L.; DICARLO, S. E. Postexercise hypotension is mediated by reductions in sympathetic nerve activity. Am J Physiol, v.276, n.1 Pt 2, Jan, p.H27-32. 1999.

LANDS, A. M.; ARNOLD, A.; MCAULIFF, J. P.; LUDUENA, F. P.; BROWN, T. G., JR. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. Nature, v.214, n.5088, May 6, p.597-8. 1967.

LANGER, S. Z. Presynaptic regulation of catecholamine release. Biochem Pharmacol, v.23, n.13, Jul 1, p.1793-800. 1974.

LEFKOWITZ, R. J.; CARON, M. G. Adrenergic receptors. Models for the study of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. J Biol Chem, v.263, n.11, Apr 15, p.4993-6. 1988.

LEKAKIS, J. P.; PAPATHANASSIOU, S.; PAPAIOANNOU, T. G.; PAPAMICHAEL, C. M.; ZAKOPOULOS, N.; KOTSIS, V., et al. Oral L-arginine improves endothelial dysfunction in patients with essential hypertension. Int J Cardiol, v.86, n.2-3, Dec, p.317-23. 2002.

LEOSCO, D.; IACCARINO, G.; CIPOLLETTA, E.; DE SANTIS, D.; PISANI, E.; TRIMARCO, V., et al. Exercise restores beta-adrenergic vasorelaxation in aged rat carotid arteries. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.285, n.1, Jul, p.H369-74. 2003.

LERMAN, A.; BURNETT, J. C., JR.; HIGANO, S. T.; MCKINLEY, L. J.; HOLMES, D. R., JR. Long-term L-arginine supplementation improves small-vessel coronary endothelial function in humans. Circulation, v.97, n.21, Jun 2, p.2123-8. 1998.

LESTER, H. A.; MAGER, S.; QUICK, M. W.; COREY, J. L. Permeation properties of neurotransmitter transporters. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v.34, p.219-49. 1994.

LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. Fundamentos de fisiologia. Rio de Janeiro-RJ: Elsevier. 2006. 929 p.

LIM, D. S.; MOORADIAN, S. J.; GOLDBERG, C. S.; GOMEZ, C.; CROWLEY, D. C.; ROCCHINI, A. P., et al. Effect of oral L-arginine on oxidant stress, endothelial dysfunction, and systemic arterial pressure in young cardiac transplant recipients. Am J Cardiol, v.94, n.6, Sep 15, p.828-31. 2004.

LIND, L.; HALL, J.; JOHANSSON, K. Evaluation of four different methods to measure endothelium-dependent vasodilation in the human peripheral circulation. Clin Sci (Lond), v.102, n.5, May, p.561-7. 2002.

LOHSE, M. J.; BENOVIC, J. L.; CODINA, J.; CARON, M. G.; LEFKOWITZ, R. J. beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. Science, v.248, n.4962, Jun 22, p.1547-50. 1990.

LU, Z.; QU, P.; XU, K.; HAN, C. beta-Adrenoceptors in endothelium of rabbit coronary artery and alteration in atherosclerosis. Biol Signals, v.4, n.3, May-Jun, p.150-9. 1995.

MAEDA, S.; MIYAUCHI, T.; KAKIYAMA, T.; SUGAWARA, J.; IEMITSU, M.; IRUKAYAMA-TOMOBE, Y., et al. Effects of exercise training of 8 weeks and detraining on plasma levels of endothelium-derived factors, endothelin-1 and nitric oxide, in healthy young humans. Life Sci, v.69, n.9, Jul 20, p.1005-16. 2001.

MALLEM, Y.; HOLOPHERNE, D.; RECULEAU, O.; LE COZ, O.; DESFONTIS, J. C.; GOGNY, M. Beta-adrenoceptor-mediated vascular relaxation in spontaneously hypertensive rats. Auton Neurosci, v.118, n.1-2, Mar 31, p.61-7. 2005.

MANCHADO, F. B.; GOBATO, C. A.; CONTARTEZE, R. V. L.; PAPOTI, M.; MELO, M. A. R. Maximal lactate steady state in running rats. Journal of Exercise Physiology, v.8, n.4, p.29 - 35. 2005.

MARCHESI, S.; LUPATTELLI, G.; SIEPI, D.; ROSCINI, A. R.; VAUDO, G.; SINZINGER, H., et al. Oral L-arginine administration attenuates postprandial endothelial dysfunction in young healthy males. J Clin Pharm Ther, v.26, n.5, Oct, p.343-9. 2001.

MARSEN, T. A.; EGINK, G.; SUCKAU, G.; BALDAMUS, C. A. Tyrosine-kinase-dependent regulation of the nitric oxide synthase gene by endothelin-1 in human endothelial cells. Pflugers Arch, v.438, n.4, Sep, p.538-44. 1999.

MARTINA, V.; MASHA, A.; GIGLIARDI, V. R.; BROCATO, L.; MANZATO, E.; BERTHIO, A., et al. Long-term N-acetylcysteine and L-arginine administration reduces endothelial activation and systolic blood pressure in hypertensive patients with type 2 diabetes. Diabetes Care, v.31, n.5, May, p.940-4. 2008.

MATSUSHITA, M.; TANAKA, Y.; KOIKE, K. Studies on the mechanisms underlying beta-adrenoceptor-mediated relaxation of rat abdominal aorta. J Smooth Muscle Res, v.42, n.6, Dec, p.217-25. 2006.

MCALLISTER, R. M.; KIMANI, J. K.; WEBSTER, J. L.; PARKER, J. L.; LAUGHLIN, M. H. Effects of exercise training on responses of peripheral and visceral arteries in swine. J Appl Physiol, v.80, n.1, Jan, p.216-25. 1996.

MINNEMAN, K. P. Alpha 1-adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell Ca²⁺. Pharmacol Rev, v.40, n.2, Jun, p.87-119. 1988.

MINNEMAN, K. P.; ESBENSHADE, T. A.; HAN, C. Subtypes of alpha-adrenoceptors in contraction of vascular smooth muscle. Jpn J Pharmacol, v.58 Suppl 2, p.128P-134P. 1992.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. Br J Pharmacol, v.147 Suppl 1, Jan, p.S193-201. 2006.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. Hypertension, v.12, n.4, Oct, p.365-72. 1988.

MONOPOLI, A.; CONTI, A.; FORLANI, A.; ONGINI, E. Beta 1 and beta 2 adrenoceptors are involved in mediating vasodilation in the human coronary artery. Pharmacol Res, v.27, n.3, Apr, p.273-9. 1993.

MULVANY, M. J.; AALKJAER, C. Structure and function of small arteries. Physiol Rev, v.70, n.4, Oct, p.921-61. 1990.

MURAD, F.; FORSTERMANN, U.; NAKANE, M.; POLLOCK, J.; TRACEY, R.; MATSUMOTO, T., et al. The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system for

intracellular and intercellular communication. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res, v.28, p.101-9. 1993.

NAKANE, T.; TSUJIMOTO, G.; HASHIMOTO, K.; CHIBA, S. Beta adrenoceptors in the canine large coronary arteries: beta-1 adrenoceptors predominate in vasodilation. J Pharmacol Exp Ther, v.245, n.3, Jun, p.936-43. 1988.

O'SULLIVAN, S. E.; BELL, C. The effects of exercise and training on human cardiovascular reflex control. J Auton Nerv Syst, v.81, n.1-3, Jul 3, p.16-24. 2000.

OLTMAN, C. L.; PARKER, J. L.; ADAMS, H. R.; LAUGHLIN, M. H. Effects of exercise training on vasomotor reactivity of porcine coronary arteries. Am J Physiol, v.263, n.2 Pt 2, Aug, p.H372-82. 1992.

OLTMAN, C. L.; PARKER, J. L.; LAUGHLIN, M. H. Endothelium-dependent vasodilation of proximal coronary arteries from exercise-trained pigs. J Appl Physiol, v.79, n.1, Jul, p.33-40. 1995.

ORIOWO, M. A. Atypical beta-adrenoceptors in the rat isolated common carotid artery. Br J Pharmacol, v.113, n.3, Nov, p.699-702. 1994.

PALMER, R. M.; REES, D. D.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. Biochem Biophys Res Commun, v.153, n.3, Jun 30, p.1251-6. 1988.

PALLOSHI, A.; FRAGASSO, G.; PIATTI, P.; MONTI, L. D.; SETOLA, E.; VALSECCHI, G., et al. Effect of oral L-arginine on blood pressure and symptoms and endothelial function in patients with systemic hypertension, positive exercise tests, and normal coronary arteries. Am J Cardiol, v.93, n.7, Apr 1, p.933-5. 2004.

PARKER, J. L.; MATTOX, M. L.; LAUGHLIN, M. H. Contractile responsiveness of coronary arteries from exercise-trained rats. J Appl Physiol, v.83, n.2, Aug, p.434-43. 1997.

PELA, G.; MISSALE, C.; RADDINO, R.; CONDORELLI, E.; SPANO, P. F.; VISIOLI, O. Beta 1- and beta 2-receptors are differentially desensitized in an experimental model of heart failure. J Cardiovasc Pharmacol, v.16, n.5, Nov, p.839-46. 1990.

PHILLIPS, J. K.; HICKEY, H.; HILL, C. E. Heterogeneity in mechanisms underlying vasodilatory responses in small arteries of the rat hepatic mesentery. Auton Neurosci, v.83, n.3, Oct 2, p.159-70. 2000.

PITCHER, J. A.; FREEDMAN, N. J.; LEFKOWITZ, R. J. G protein-coupled receptor kinases. Annu Rev Biochem, v.67, p.653-92. 1998.

POURAGEAUD, F.; LEBLAIS, V.; BELLANCE, N.; MARTHAN, R.; MULLER, B. Role of beta2-adrenoceptors (beta-AR), but not beta1-, beta3-AR and endothelial nitric oxide, in beta-AR-mediated relaxation of rat intrapulmonary artery. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, v.372, n.1, Jul, p.14-23. 2005.

PRELI, R. B.; KLEIN, K. P.; HERRINGTON, D. M. Vascular effects of dietary L-arginine supplementation. Atherosclerosis, v.162, n.1, May, p.1-15. 2002.

PRIVIERO, F.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E.; ZANESCO, A. Negative chronotropic response to adenosine receptor stimulation in rat right atria after run training. Clin Exp Pharmacol Physiol, v.31, n.10, Oct, p.741-3. 2004.

PUZSEROVA, A.; CSIZMADIOVA, Z.; ANDRIANTSITOHAINA, R.; BERNATOVA, I. Vascular effects of red wine polyphenols in chronic stress-exposed Wistar-Kyoto rats. Physiol Res, v.55 Suppl 1, p.S39-47. 2006.

QUEEN, L. R.; FERRO, A. Beta-adrenergic receptors and nitric oxide generation in the cardiovascular system. Cell Mol Life Sci, v.63, n.9, May, p.1070-83. 2006.

RAYMOND, J. R.; HNATOWICH, M.; LEFKOWITZ, R. J.; CARON, M. G. Adrenergic receptors. Models for regulation of signal transduction processes. Hypertension, v.15, n.2, Feb, p.119-31. 1990.

RECTOR, T. S.; BANK, A. J.; MULLEN, K. A.; TSCHUMPERLIN, L. K.; SIH, R.; PILLAI, K., et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of supplemental oral L-arginine in patients with heart failure. Circulation, v.93, n.12, Jun 15, p.2135-41. 1996.

ROBERTS, C. K.; WON, D.; PRUTHI, S.; KURTOVIC, S.; SINDHU, R. K.; VAZIRI, N. D., et al. Effect of a short-term diet and exercise intervention on oxidative stress, inflammation, MMP-9, and monocyte chemotactic activity in men with metabolic syndrome factors. J Appl Physiol, v.100, n.5, May, p.1657-65. 2006.

RODBELL, M. The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. Nature, v.284, n.5751, Mar 6, p.17-22. 1980.

ROGERS, P. J.; MILLER, T. D.; BAUER, B. A.; BRUM, J. M.; BOVE, A. A.; VANHOUTTE, P. M. Exercise training and responsiveness of isolated coronary arteries. J Appl Physiol, v.71, n.6, Dec, p.2346-51. 1991.

RUSH, J. W.; TURK, J. R.; LAUGHLIN, M. H. Exercise training regulates SOD-1 and oxidative stress in porcine aortic endothelium. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.284, n.4, Apr, p.H1378-87. 2003.

SALT, P. J. Inhibition of noradrenaline uptake 2 in the isolated rat heart by steroids, clonidine and methoxylated phenylethylamines. Eur J Pharmacol, v.20, n.3, Dec, p.329-40. 1972.

SCHMITT, J. M.; STORK, P. J. beta 2-adrenergic receptor activates extracellular signal-regulated kinases (ERKs) via the small G protein rap1 and the serine/threonine kinase B-Raf. J Biol Chem, v.275, n.33, Aug 18, p.25342-50. 2000.

SHAFIEI, M.; MAHMOUDIAN, M. Atypical beta-adrenoceptors of rat thoracic aorta. Gen Pharmacol, v.32, n.5, May, p.557-62. 1999.

SHERIDAN, B. C.; MCINTYRE, R. C., JR.; MELDRUM, D. R.; FULLERTON, D. A. L-arginine prevents lung neutrophil accumulation and preserves pulmonary endothelial function after endotoxin. Am J Physiol, v.274, n.3 Pt 1, Mar, p.L337-42. 1998.

SIBLEY, D. R.; STRASSER, R. H.; BENOVIC, J. L.; DANIEL, K.; LEFKOWITZ, R. J. Phosphorylation/dephosphorylation of the beta-adrenergic receptor regulates its functional coupling to adenylate cyclase and subcellular distribution. Proc Natl Acad Sci U S A, v.83, n.24, Dec, p.9408-12. 1986.

SONG, Y.; SIMARD, J. M. beta-Adrenoceptor stimulation activates large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in smooth muscle cells from basilar artery of guinea pig. Pflugers Arch, v.430, n.6, Oct, p.984-93. 1995.

SPADARI, R. C.; DE MORAES, S. Repeated swimming stress and responsiveness of the isolated rat pacemaker to the chronotropic effect of noradrenaline and isoprenaline: role of adrenal corticosteroids. Gen Pharmacol, v.19, n.4, p.553-7. 1988.

SPIER, S. A.; DELP, M. D.; MEININGER, C. J.; DONATO, A. J.; RAMSEY, M. W.; MULLER-DELP, J. M. Effects of ageing and exercise training on endothelium-dependent vasodilatation and structure of rat skeletal muscle arterioles. J Physiol, v.556, n.Pt 3, May 1, p.947-58. 2004.

STARKE, K. Alpha-adrenoceptor subclassification. Rev Physiol Biochem Pharmacol, v.88, p.199-236. 1981.

TAGAYA, E.; TAMAOKI, J.; TAKEMURA, H.; ISONO, K.; NAGAI, A. [Relaxation of canine pulmonary arteries caused by stimulation of atypical beta-adrenergic receptors]. Nihon Kogyuki Gakkai Zasshi, v.36, n.5, May, p.433-7. 1998.

_____. Atypical adrenoceptor-mediated relaxation of canine pulmonary artery through a cyclic adenosine monophosphate-dependent pathway. Lung, v.177, n.5, p.321-32. 1999.

TAMAOKI, J.; TAGAYA, E.; ISONO, K.; NAGAI, A. Atypical adrenoceptor-mediated relaxation of canine pulmonary artery through a cAMP-dependent pathway. Biochem Biophys Res Commun, v.248, n.3, Jul 30, p.722-7. 1998.

TANG, Z. L.; WU, W. J.; XIONG, X. M. Influence of endothelium on responses of isolated dog coronary artery to beta-adrenoceptor agonists. Zhongguo Yao Li Xue Bao, v.16, n.4, Jul, p.357-60. 1995.

TRAVERSE, J. H.; ALTMAN, J. D.; KINN, J.; DUNCKER, D. J.; BACHE, R. J. Effect of beta-adrenergic receptor blockade on blood flow to collateral-dependent myocardium during exercise. Circulation, v.91, n.5, Mar 1, p.1560-7. 1995.

TRENDELENBURG, U. Extraneuronal uptake and metabolism of catecholamines as a site of loss. Life Sci, v.22, n.13-15, Apr 3-17, p.1217-22. 1978.

_____. A kinetic analysis of the extraneuronal uptake and metabolism of catecholamines. Rev Physiol Biochem Pharmacol, v.87, p.33-115. 1980.

_____. The interaction of transport mechanisms and intracellular enzymes in metabolizing systems. J Neural Transm Suppl, v.32, p.3-18. 1990.

_____. The TiPS lecture: functional aspects of the neuronal uptake of noradrenaline. Trends Pharmacol Sci, v.12, n.9, Sep, p.334-7. 1991.

UNGERER, M.; PARRUTI, G.; BOHM, M.; PUZICHA, M.; DEBLASI, A.; ERDMANN, E., et al. Expression of beta-arrestins and beta-adrenergic receptor kinases in the failing human heart. Circ Res, v.74, n.2, Feb, p.206-13. 1994.

VAN DER ZYPP, A.; KANG, K. B.; MAJEWSKI, H. Age-related involvement of the endothelium in beta-adrenoceptor-mediated relaxation of rat aorta. Eur J Pharmacol, v.397, n.1, May 26, p.129-38. 2000.

WANG, J.; WOLIN, M. S.; HINTZE, T. H. Chronic exercise enhances endothelium-mediated dilation of epicardial coronary artery in conscious dogs. Circ Res, v.73, n.5, Nov, p.829-38. 1993.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. Adv Physiol Educ, v.27, n.1-4, Dec, p.201-6. 2003.

WERSTIUK, E. S.; LEE, R. M. Vascular beta-adrenoceptor function in hypertension and in ageing. Can J Physiol Pharmacol, v.78, n.6, Jun, p.433-52. 2000.

WETZSTEIN, C. J.; SHERN-BREWER, R. A.; SANTANAM, N.; GREEN, N. R.; WHITE-WELKLEY, J. E.; PARTHASARATHY, S. Does acute exercise affect the susceptibility of low density lipoprotein to oxidation? Free Radic Biol Med, v.24, n.4, Mar 1, p.679-82. 1998.

WOLF, A.; ZALPOUR, C.; THEILMEIER, G.; WANG, B. Y.; MA, A.; ANDERSON, B., et al. Dietary L-arginine supplementation normalizes platelet aggregation in hypercholesterolemic humans. J Am Coll Cardiol, v.29, n.3, Mar 1, p.479-85. 1997.

XU, B.; HUANG, Y. Different mechanisms mediate beta adrenoceptor stimulated vasorelaxation of coronary and femoral arteries. Acta Pharmacol Sin, v.21, n.4, Apr, p.309-12. 2000.

XU, B.; LI, J.; GAO, L.; FERRO, A. Nitric oxide-dependent vasodilatation of rabbit femoral artery by beta(2)-adrenergic stimulation or cyclic AMP elevation in vivo. Br J Pharmacol, v.129, n.5, Mar, p.969-74. 2000.

YATANI, A.; CODINA, J.; IMOTO, Y.; REEVES, J. P.; BIRNBAUMER, L.; BROWN, A. M. A G protein directly regulates mammalian cardiac calcium channels. Science, v.238, n.4831, Nov 27, p.1288-92. 1987.

YATANI, A.; OKABE, K.; CODINA, J.; BIRNBAUMER, L.; BROWN, A. M. Heart rate regulation by G proteins acting on the cardiac pacemaker channel. Science, v.249, n.4973, Sep 7, p.1163-6. 1990.

ZANESCO, A.; ANTUNES, E. Células endoteliais. In: H. Carvalho e C. Collares-Buzato (Ed.). Células. Barueri-SP: Manole, v.1, 2005. Células endoteliais, p.184-191

_____. Effects of exercise training on the cardiovascular system: Pharmacological approaches. Pharmacol Ther, v.114, n.3, Jun, p.307-17. 2007.

ZANESCO, A.; SPADARI-BRATFISCH, R. C.; BARKER, L. A. Sino-aortic denervation causes right atrial beta adrenoceptor down-regulation. J Pharmacol Exp Ther, v.280, n.2, Feb, p.677-85. 1997.