

ADRIANO SILVA MARTINS

***ESTUDO FARMACOLÓGICO DA BRADICARDIA
INDUZIDA PELO TREINAMENTO FÍSICO***

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia do Professor de Educação Física Adriano Silva Martins..

Campinas, 23 de março de 2001.

*Prof. Dr. Edson Antunes
- Orientador -*

ADRIANO SILVA MARTINS

***ESTUDO FARMACOLÓGICO DA BRADICARDIA
INDUZIDA PELO TREINAMENTO FÍSICO***

*Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas
para a obtenção do título de Mestre em
Farmacologia.*

Orientador: Prof. Dr. Edson Antunes

CAMPINAS

2001

iii

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

COLEÇÃO BE
CHAMADA T/UNICAMP
M366e
48090
16-837/02
R\$11,00
DATA _____
CPD _____

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

100165783-4

BIB ID 235724

M366e Martins, Adriano Silva
Estudo farmacológico da bradicardia induzida pelo treinamento físico / Adriano Silva Martins. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientadores : Edson Antunes, Angelina Zanesco
Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Natação. 2. Sistema Nervoso Autônomo. I .Edson Antunes. II. Angelina Zanesco.III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

PROF. DR. EDSON ANTUNES

Membros:

PROF. DR. EDSON ANTUNES

PROF. DR. HEITOR MORENO JÚNIOR

PROF. DR. JOSÉ ROBERTO MOREIRA DE AZEVEDO

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 23/03/01

200212434

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho em primeiro Lugar a minha querida eterna avó Maria. Sempre estarei com você no Coração.

Em segundo lugar, a quem me Ensinou tudo o que eu sei em Pesquisa e como pessoa: Angelina Zanesco

*“Agradeço a Deus por ter me dado
a força necessária para superar
Todos os obstáculos”.*

A minha amada família. Sem vocês eu com certeza não teria chegado até aqui. Amo vocês demais. Em especial o vovô Liu, a minha querida mãe Teresinha, a minha irmãzinha Ana Paula, a minha sobrinha Beatriz e ao meu irmão André Luiz.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes pela orientação e o companherismo.

Ao Prof.Dr. Gilberto de Nucci pelo suporte técnico e financeiro nos experimentos realizados. E claro, também por ser o meu fiador!

A todos os alunos de mestrado da Profa. Dra. Angelina Zanesco: Alessandra Lia Sonia, Rachel, Tati e em especial a minha Fê Duca (adoro você).

Ao meu companheiro de experimentos, stress e tudo mais Rogério Pirituba. Será que vamos continuar no doutorado?

Aos demais alunos do departamento: Laurinha (nunca vou esquecer você), Enilton, Sara, Cléber, Renatinha, Lúcia, Simone, Carlinha, Ivani, Juliano, Lara, e todos os demais.

Ao meu grande roomater Márcio. Espero que não percamos o contato. Obrigado pela amizade!

A minha querida amiga Taís fervida.

A todos os funcionários do departamento: Sr. Miguel, Adilson, Aguinaldo, Wanderlei, Gislaine, Rita, Alessandra, Eduardo e em especial à Dorinha (obrigado por tudo!).

Aos meus amigos da faculdade de hoje e de sempre: Adelmo, Pedro Alexandre, Carolina Medeiros, Lorival, Julio César, a minha eterna Paqueta.

Ao meu amigo verdadeiro da graduação, Gustavo Puggina. Obrigado pelos emails, pelos papos enfim pela sua amizade.

Às minhas querida primas Angela e Andrea e à Tia Zilma. Obrigado por sempre estarem na minha vida.

Aos ratinhos que nadaram e dedicaram, literalmente, seus corações a mim.

À Clarice Sibuya, pela análises de lactato realizadas.

Ao CNPq pela ajuda financeira proporcionada.

“CADA UM TÊM O QUE MERECE.”

	PÁG.
RESUMO.....	xxv
1. INTRODUÇÃO.....	29
Bradicardia induzida pelo treinamento físico.....	31
Nodo sinoatrial.....	32
Neurotransmissão adrenérgica.....	32
Neurotransmissão colinérgica.....	35
Receptores de adenosina.....	37
Adenosina e coração.....	38
Objetivos específicos.....	43
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
Animais.....	47
Avaliação dos ratos que foram treinados.....	47
Programa de treinamento físico por natação.....	47
Medida de frequência cardíaca e pressão arterial.....	48
Avaliação do condicionamento físico dos animais: lactato sanguíneo.....	48
Átrios direitos isolados.....	49
Obtenção e análise das curvas concentração-efeito.....	49
Análise estatística.....	50
3. RESULTADOS.....	51
Peso corporal.....	53
Frequência cardíaca e pressão arterial.....	53

Lactato sangüíneo.....	54
Frequência basal atrial.....	55
Agonista β adrenérgico: isoproterenol.....	55
Agonista muscarínico: carbachol.....	56
Agonista purinérgico: α -metil-ATP.....	57
Agonista de receptores de adenosina: CPA, NECA e IB-MECA.....	58
4. DISCUSSÃO.....	61
5. CONCLUSÕES.....	67
6. SUMMARY.....	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

SIGLA	NOME COMPLETO
Bat/Min.	Batimentos por minuto
CPA	N ⁶ - Cyclopenthyldenosine
E _{máx.}	Resposta máxima
IB-MECA	N ⁶ -(3-iododbenzyl)-5-N-methylcarboxamidoadenosine
NECA	5'- N-ethyl-carboxamidoadenosine
α -metil ATP	α - β methyl trifosfato de adenosina

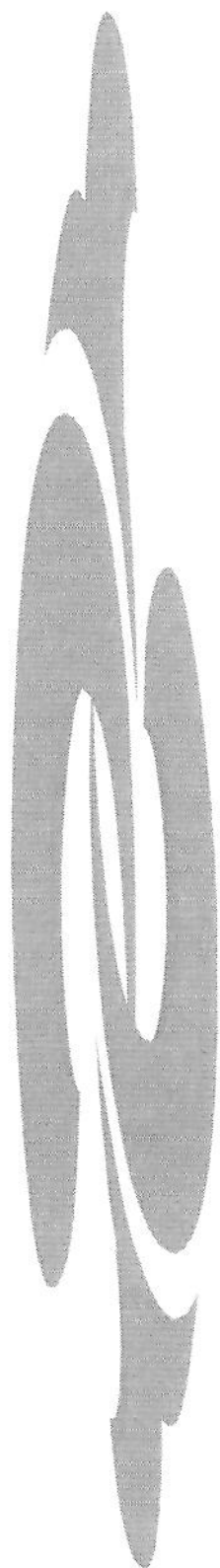
SUBSTÂNCIAS

PROCEDÊNCIA

17- β estradiol	Sigma Chem. CO (St. Louis, EUA)
Ácido Ascórbico	Sigma Chem. CO (St. Louis, EUA)
Atropina	Sigma Chem. CO (St. Louis, EUA)
Carbacol	Sigma Chem. CO (St. Louis, EUA)
CPA	Sigma Chem. CO (St. Louis, EUA)
EDTA	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Fluoreto de Sódio	Carlo Erba (São Paulo, Brasil)
Halotano	Halocarbon (New Jersey, EUA)
Heparina	Roche
Hypnol	Cristália (Itapira, Brasil)
IB-MECA	Sigma Chem. CO (St. Louis, EUA)
Isoproterenol	Sigma Chem. CO (St. Louis, EUA)
Propranolol	Sigma Chem. CO (St. Louis, EUA)

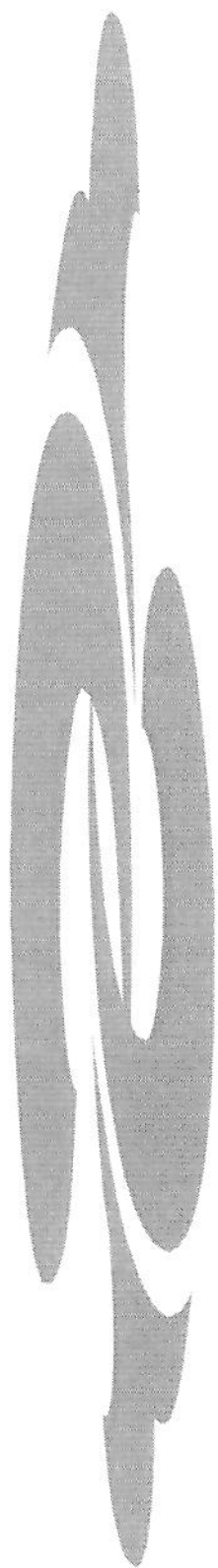
	PÁG.
Tabela 1: Peso corporal dos ratos no início e no final do estudo dos grupos controles ou treinados por natação durante 8 semanas.....	53
Tabela 2: Efeito do treinamento físico por natação durante 8 semanas nos valores de pressão arterial e frequência cardíaca de ratos.....	53
Tabela 3: Potência e resposta máxima do isoproterenol em átrios direitos isolados de ratos controles ou treinados por natação durante 8 semanas.....	55
Tabela 4: Potência e resposta máxima do carbacol em átrios direitos isolados de ratos controles ou treinados por natação durante 8 semanas.....	57
Tabela 5: Potência e respostas máximas dos agonistas CPA, NECA e IB-MECA em átrios direitos de ratos controles ou treinados por natação durante 8 semanas.....	60

	PÁG.
Figura 1: Estrutura química da adenosina, AMP, ADP e ATP.....	39
Figura 2: Metabolismo da adenosina.....	40
Figura 3: Evolução temporal do níveis de lactato sanguíneo em ratos controles ou treinados por natação durante 8 semanas.....	54
Figura 4: Curvas concentração-efeito ao carbacol em átrios isolados de ratos controles ou treinados por natação durante 8 semanas.....	56
Figura 5: Curvas concentração-efeito ao α -metil ATP em átrios isolados de ratos controles ou treinados por natação durante 8 semanas.....	57
Figura 6: Curvas concentração-efeito ao CPA em átrios isolados de ratos controles ou treinados por natação durante 8 semanas.....	58
Figura 7: Curvas concentração-efeito ao NECA em átrios isolados de ratos controles ou treinados por natação durante 8 semanas.....	59
Figura 8: Curvas concentração-efeito ao IB-MECA em átrios isolados de ratos controles ou treinados por natação durante 8 semanas.....	60



RESUMO

É conhecido que o treinamento físico de longa duração induz bradicardia. No entanto, os mecanismos pelos quais o exercício desencadeia esse fenômeno não está ainda completamente elucidado. Portanto, o objetivo desse trabalho foi investigar a participação dos receptores de adenosina na bradicardia induzida pelo treinamento físico por natação durante 8 semanas em átrios direitos isolados. Além disso, avaliamos a participação do sistema simpático e parassimpático nas respostas cronotrópicas atriais na bradicardia de repouso. Ratos Wistar machos foram treinados durante 8 semanas por natação, 5 dias por semana, com sessões de 60 minutos cada. Após o período de treinamento, os átrios direitos foram isolados e curvas concentração-efeito foram obtidas aos agonistas isoproterenol, carbachol, CPA, NECA, α metil-ATP e IB-MECA. A frequência cardíaca e pressão arterial foram avaliadas através da artéria femoral esquerda nos animais acordados. O treinamento físico por natação durante 8 semanas provocou redução do peso corporal, lactato plasmático e da frequência cardíaca. Tanto a potência quanto a resposta máxima aos agonistas β adrenérgico, isoproterenol, e de receptores de adenosina do subtipo A_3 , IB-MECA foram significativamente aumentadas nos animais treinados, enquanto que a resposta cronotrópica aos agonistas de receptores muscarínicos, carbachol, e receptores purinérgicos A_1 , A_2 e P_{2X} , CPA, NECA e α metil-ATP, respectivamente não foram alteradas pelo treinamento físico durante 8 semanas. Assim, o aumento da resposta cronotrópica negativa ao agonista de receptores de adenosina do subtipo A_3 , IB-MECA, parece participar da bradicardia de repouso após treinamento físico.



1. INTRODUÇÃO

BRADICARDIA INDUZIDA PELO TREINAMENTO FÍSICO

O treinamento físico regular produz alterações no sistema cardiovascular. Essas alterações envolvem diminuição da pressão arterial, da resistência vascular sistêmica e da frequência cardíaca que são frequentemente encontradas tanto em humanos (MEREDITH *et al.*, 1991; SEALS & REILING, 1991) quanto em animais submetidos à atividade física por várias semanas (SCHEUER & TIPTON, 1977; LUTGEMEIER *et al.*, 1987; MUSCH *et al.*, 1997; NOMA *et al.*, 1987; OVERTON *et al.*, 1988).

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar as adaptações cardiovasculares em resposta ao exercício físico. Especificamente, a bradicardia de repouso tem sido correlacionada por diversos autores com possíveis alterações da atividade nervosa autonômica sobre o coração; com diminuição da atividade simpática sobre o marca passo atrial bem como atenuação do arco reflexo dos baroreceptores arteriais e eferências dos núcleos nervosos centrais (TIPTON, 1965; LIN & HORVATH, 1972; COUSINEAU *et al.*, 1988; HASSAN, 1991; COLLINS & DICARLO, 1997; KRIEGER, BRUM & NEGRÃO, 1998). Além disso, alguns trabalhos têm avaliado a participação dos receptores adrenérgicos e colinérgicos no fenômeno da bradicardia de treinamento. No entanto, resultados conflitantes têm sido encontrados, redução na sensibilidade dos adrenoceptores β presentes no nodo sino-atrial foi demonstrada por BOLTER, HUGHSON & CRITZ (1973) e HAMMOND *et al.* (1987) enquanto que outros investigadores observaram que a bradicardia após treinamento não alterava o número desses adrenoceptores e sim o automatismo cardíaco, com diminuição da atividade intrínseca das células do marca-passo cardíaco (HUGHSON *et al.*, 1977; SMITH *et al.*, 1989; SCHAEFER *et al.*, 1992; SCARPACE, LOWENTHAL & TUMER., 1992).

A participação do sistema nervoso parasimpático na bradicardia de repouso após treinamento tem sido investigada e diferentes resultados foram encontrados. Aumento (SCHEUER & TIPTON, 1977; SMITH *et al.*, 1989), diminuição (DIEPSTRA, SHIELDS & GOLD., 1980; CHEN, CHANDLER & DICARLO., 1997) ou nenhuma alteração na atividade do sistema nervoso autônomo parasimpático (O'LEARY & SEAMANS, 1993; SCISLO, DICARLO & COLLINS, 1993; GREGOIRE *et al.*, 1996) foi observada. Assim, os mecanismos responsáveis pela bradicardia após treinamento ainda não são bem compreendidos.

NODO SINOATRIAL

O nodo sinoatrial é uma pequena porção de músculo cardíaco especializado, de cerca de 15 milímetros de comprimento, localizado na parede superior lateral do átrio direito que comanda a ritmicidade do coração. O nodo sinoatrial é quase totalmente desprovido de filamentos contráteis e sua conexão direta com as fibras atriais permite que o potencial de ação gerado no nodo, seja imediatamente propagado pelo átrio direito como um todo (GUYTON & HALL, 1996). Uma diversidade de substâncias estão implicadas no controle da frequência cardíaca. Dentre elas: catecolaminas, acetilcolina, angiotensina II, neuropeptídeos como a vasopressina, substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), endotelinas e purinas (BARNES, FERRARIO & CONOMY, 1979; PRIVITERA, THIODEAUX, & YATES, 1994; LINDSEY *et al.*, 1995; GARDNER & BROADLEY, 1999).

NEUROTRANSMISSÃO ADRENÉRGICA

As catecolaminas são os mediadores endógenos do sistema nervoso simpático os quais iniciam suas ações por interação com receptores de membrana, denominados adrenoreceptores (AHLQUIST, 1948). Esses mediadores são representadas pela noradrenalina (liberada das terminações nervosas pós-ganglionares simpáticas), adrenalina (liberada da medula adrenal) e dopamina. A ocupação dos adrenoreceptores pelas catecolaminas é rápida, reversível, saturável, estereoseletiva e leva a formação de segundos mensageiros intracelulares que desencadeiam as respostas fisiológicas.

Os adrenoreceptores foram inicialmente divididos em duas grandes categorias, α e β (LANDS *et al.*, 1967). Posteriormente, os adrenoreceptores foram subdivididos em α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , β_3 e β_4 (este não bem caracterizado) pelo uso de antagonistas seletivos e sequenciamento dos aminoácidos que participam de suas estruturas protéicas. Os subtipos α são ainda subdivididos em α_{1a} , α_{1b} , α_{1D} , α_{2a} , α_{2b} e α_{2c} (LANDS *et al.*, 1967; LANGER, 1974; BERTHELSEN & PETTINGER, 1977; STARKE, 1981; HAN *et al.*, 1987; REGAN *et al.* 1988; McGRATH & WILSON, 1988; HAN & MINNEMAN, 1990; FORD *et al.*, 1994; HIEBLE, BONDINELL & RUFFOLO, 1995; KAUMANN *et al.*, 1998).

Os adrenoreceptores pertencem a uma super família de receptores de membrana estritamente relacionados e acoplados às proteínas G. Todas essas proteínas receptoras compartilham uma estrutura peptídica comum na qual a porção amino terminal (N) no lado extracelular da membrana é conectada à uma cadeia carboxílica terminal (C) no lado intracelular da membrana, por sete domínios transmembrana. O tamanho relativo das cadeias N- e C-terminais e da terceira alça intracelular varia consideravelmente de receptor para receptor (RAYMOND *et al.*, 1990; BIRNBAUMER, 1992). A terceira alça intracelular dos adrenoreceptores β é o 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 . Baseadas na presença de isoformas da subunidade α , foram identificadas vinte e cinco proteínas G distintas: quatro isoformas de G_s ; três de G_i ; duas isoformas de G_o ; uma G_z ; duas G_q 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 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 guanosina trifosfato (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 $\beta\gamma$ (BIRNBAUMER, 1990; 1992). A subunidade α da proteína G_s , quando ativada, leva à estimulação da adenilato ciclase (RODBELL, 1980; GILMAN, 1987).

Os adrenoreceptores α_1 , quando acoplados a proteína G_q , ativam a fosfolipase C levando à formação dos segundos mensageiros inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG), os quais resultam no aumento de cálcio intracelular e na ativação da proteína quinase C (EXTON, 1985). Os adrenoreceptores α_2 parecem mediar a resposta fisiológica através da inibição da adenilato ciclase (DOCHERTY, 1998).

As respostas dos adrenoreceptores β são mediadas através da ativação da adenilato ciclase (EMORINE, MARULLO & BRIEND-SUTREN., 1989; EMORINE, BLIN & STROSBURG, 1994; COHEN, ZIEMANN & CHEN, 1999) e consequente estimulação de uma proteína G, denominada Gs, a qual leva a um aumento de AMP cíclico intracelular e ativação da proteína quinase A (BRODDE, 1993). Também sob determinadas condições, o adrenoreceptor β_2 pode estar acoplado a uma proteína G (G_i) inibitória de adenilato ciclase (DAAKA et al., 1997; XIAO et al., 1999).

O adrenoreceptor β_1 é o subtipo mais abundante (75-85%) no coração do mamífero e o receptor β_2 também é detectável no tecido cardíaco (BRISTOW et al., 1986; BRODDE, 1993; KAUMANN & MOLENAAR, 1997). Estudos recentes têm demonstrado a existência de receptores β_3 e β_4 no miocárdio de ratos e humanos (GAUTHIER et al., 1996; MOLENAAR et al., 1997; KAUMANN et al., 1998; COHEN et al., 1999). O receptor adrenérgico β_3 parece promover efeito inotrópico negativo (GAUTHIER et al., 1996), ao contrário do β_4 que semelhante ao β_1 e β_2 promovem efeito inotrópico positivo (KAUMANN & MOLENAAR, 1997; KAUMANN et al., 1998). A estimulação dos receptores β -adrenérgicos por catecolaminas circulantes ou agonistas adrenérgicos leva ao aumento da frequência cardíaca (cronotropismo positivo), força de contração (inotropismo positivo), frequência de relaxamento cardíaco e automaticidade (POST, HAMMND & INSEL, 1999).

Os adrenoreceptores β podem ser regulados por diferentes estímulos, aumentando ou diminuindo sua expressão funcional e/ou numérica. O aumento do efluxo de catecolaminas promove diminuição na expressão e no acoplamento dos receptores aos seus efetores enquanto que a diminuição dos níveis de catecolaminas produz aumento na expressão e/ou na eficácia da resposta celular (STYLES, CARON & LEFKOWITZ, 1984).

A atenuação da resposta mediada pelos receptores é denominada dessensibilização. Este fenômeno envolve os processos de desacoplamento, sequestro e *down-regulation* do receptor, resultando na perda de sua responsividade mesmo na presença de estímulo. O desacoplamento ocorre de segundos a minutos após a exposição do receptor ao agonista e resulta na modificação da proteína do receptor pela fosforilação. O

processo de seqüestro ocorre minutos após a exposição do receptor ao agonista e envolve a mobilização dos receptores da superfície celular para compartimentos intracelulares que são inacessíveis aos agonistas hidrofílicos. A "down-regulation" ocorre após horas de exposição do receptor ao agonista e resulta na perda de receptores das células por degradação ou diminuição de síntese protéica. (WALDO *et al.*, 1983; SIBLEY *et al.*, 1986; LEFKOWITZ, 1988; POST, HAMMOND & INSEL, 1999).

Os hormônios tireoideanos e glicocorticóides promovem ativação dos níveis de RNAm dos receptores, e conseqüentemente aumento do número de receptores, fenômeno esse denominado "up-regulation" (WANG, HADCOCK & MALBON, 1990). A modulação dos adrenoreceptores β pelos glicocorticóides está bem documentada (LEE & REED, 1977; MANO, AKBAZADEH & TOWNLEY, 1979). Os glicocorticóides produzem aumento do RNAm que por sua vez induz síntese de novos receptores e conseqüente mudanças na resposta celular (HADCOCK, WANG & MALON, 1989). Aumento dos níveis de glicocorticóides circulantes tem sido observado em indivíduos que praticam atividade física regular que tem sido associado à elevação do número de adrenoreceptores β em linfócitos (MAKI *et al.*, 1990).

NEUROTRANSMISSÃO COLINÉRGICA

Os receptores colinérgicos são classificados em dois tipos principais: nicotínicos que respondem a nicotina e muscarínicos que exibem resposta excitatória à muscarina). Os receptores nicotínicos compreendem dois subtipos: Nn (neuronal) e Nm (muscular e ganglionar), os quais estão presentes no sistema nervoso central, na junção neuromuscular e nos gânglios autonômicos. São constituídos por quatro ou cinco subunidades alojadas na membrana, formando um canal iônico central, que atua como o sítio de ligação da acetilcolina, e está situado no domínio extracelular da molécula do receptor (EGLEN *et al.*, 1996).

Os receptores muscarínicos são classificados em cinco subtipos distintos, denominados M₁, M₂, M₃, M₄ e M₅ (BONNER *et al.*, 1987; GOYAL, 1988; DORJE *et al.*, 1991; CAULFIELD, 1993).

Em coração de mamíferos, a população predominante de receptores muscarínicos é do subtipo M₂ (HAMMER & GIACHETTI, 1982), cujos efeitos cronotrópicos e inotrópicos negativos estão associados à inibição da atividade da adenilato ciclase ocasionada pelo acoplamento do receptor às proteínas Gi ou G_K (PETERSON *et al.*, 1984; MAEDA *et al.*, 1988; EGLEN *et al.*, 1996). Nas células endoteliais do tecido vascular estão presentes os receptores muscarínicos M₃, os quais, após estimulação, induzem a liberação do óxido nítrico que se difunde para as células adjacentes do músculo liso causando relaxamento. A vasodilatação também pode ocorrer pela ação da acetilcolina em receptores pré-sinápticos dos terminais nervosos adrenérgicos, que promovem a inibição da liberação de noradrenalina (FURCHGOTT, 1984; PALMER *et al.*, 1988; MONCADA *et al.*, 1991).

As fibras parassimpáticas colinérgicas estão distribuídas extensamente nos átrios e nos tecidos especializados de condução (nodos sinoatrial, atrioventricular e fibras de Purkinje), enquanto que no miocárdio ventricular, esta inervação é esparsa (KENT *et al.*, 1974; LEVY & SCHWARTZ, 1994). O impulso cardíaco normal é iniciado no nodo sinoatrial, pela despolarização espontânea das células do marca-passo. O potencial de ação é conduzido pelas fibras do músculo atrial do nodo atrioventricular e, em seguida, pelas fibras de Purkinje no músculo ventricular.

A acetilcolina diminui a frequência cardíaca (efeito cronotrópico negativo) e a frequência de condução em tecidos especializados dos nodos sinoatrial e atrioventricular (efeito dromotrópico negativo) através da diminuição da frequência de despolarização diastólica espontânea (a corrente do marca-passo) e pelo aumento da corrente de repolarização no nodo sinoatrial; retardando assim, o limiar de deflagração do potencial e os sucessivos efeitos do ciclo cardíaco (DI FRANCESCO, 1993).

RECEPTORES DE ADENOSINA

O grupo das purinas compreende a adenosina e nucleotídeos purinérgicos como adenosina difosfato (ADP), uridina difosfato (UDP), 5'-adenosina trifosfato (ATP) e uridina trifosfato (UTP). Além de seus papéis energéticos, estas substâncias causam uma ampla variedade de efeitos farmacológicos como, redução da frequência cardíaca e pressão arterial, inibição dos movimentos intestinais (DRURY & SZENT-GYORGY, 1929), regulação do fluxo coronariano, vasodilatação, agregação plaquetária e participação em mecanismos de transmissão autonômica (BURNSTOCK, 1978). Além disso, na última década, numerosos trabalhos mostram que a adenosina (e nucleotídeos relacionados), juntamente com a substância P e CGRP, são importantes moduladores endógenos da atividade neuronal de terminações nervosas sensoriais (DUNWIDDIE & FREDHOLM, 1988; NISHIMURA *et al.*, 1990; SAWYNOK, ZARRINDAST & REID, 1997; KHAKH & KENNEDY, 1997; DOWD *et al.*, 1998; KAKUYAMA *et al.*, 1998) e, dessa forma, dependendo do receptor, local e espécie animal, as purinas participam de processos neurogênicos como agente inibitórios ou excitatórios (AHLUWALIA & CELLEK, 1997).

Os purinoceptores estão presentes em uma grande variedade de tecidos e tipos celulares (células hematopoiéticas, mastócitos, células miocárdicas e atriais, epitélio intestinal, células musculares, endotélio, células secretoras), quer em animais de experimentação, quer em humanos (MARTIN, 1992; CASADO *et al.*, 1992; MOGUL, ADAM & FOX, 1993; PEAKMAN & HILL, 1994; 1996; BRACKETT & DALY, 1994; IWAMOTO *et al.*, 1994; MARQUARDT & WALKER, 1994; PORZIG *et al.*, 1995; PUFFINBARGER *et al.*, 1995; LIANG & HALTIWANGER, 1995; DIXON *et al.*, 1996; PRENTICE & HOURANI, 1996).

Os receptores da adenosina (e nucleotídeos relacionados) foram, durante muito tempo, classificados em subtipos P₁ e P₂, onde os primeiros eram tidos como os responsáveis pelos efeitos biológicos da adenosina, enquanto os últimos, pelos efeitos do ADP e ATP (BURNSTOCK, 1978). Entretanto, em vista do grande avanço na clonagem e expressão molecular dos sub-tipos de receptores purinérgicos, uma nova avaliação e classificação desses receptores foi recentemente feita pelo *Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification* pela IUPHAR (FREDHOLM, ABBRACCHIO & BURNSTOCK, 1997).

De acordo com essa nova classificação, os receptores P_1 foram divididos em 3 novas classes, denominados A_1 , A_2 e A_3 . O receptor A_2 foi ainda sub-dividido em dois sub-tipos: A_{2A} e A_{2B} (ONGINI & FREDHOLM, 1996). Em relação ao mecanismo de transdução desses receptores, sabe-se que a ativação dos receptores A_1 e A_3 determina inibição da adenil ciclase, reduzindo a formação do AMPc intracelular (CARRUTHERS & FOZARD, 1993). Ao contrário, os sub-tipos A_{2A} e A_{2B} são acoplados à proteína G e, uma vez estimulados, determinam ativação da adenil ciclase. Mais recentemente, foi relatado que algumas das ações mediadas pelos receptores A_{2B} são moduladas por outras vias que não a do AMPc (HORI & KITAKAZE, 1991; FREDHOLM et al., 1996; FEOKTISTOV & BIAGGIONI, 1997).

Os receptores P_2 permanecem com a mesma denominação, divididos em duas classes, segundo seus mecanismos de acoplamento e estrutura molecular: P_{2X} (aqueles ligados aos canais iônicos) e P_{2Y} (receptores com 7 domínios de membrana acoplados à proteína G). Dessas duas classes, vários sub-tipos já foram clonados tais como P_{2X1} , P_{2X2} , P_{2X3} e P_{2Y1} , P_{2Y2} , P_{2Y3} , P_{2Y4} , P_{2Y5} , P_{2Y6} , P_{2Y7} e P_{2Y11} (KHAKH & KENNEDY, 1997). O RNA mensageiro dos vários sub-tipos de receptores P_{2X} estão expressos em gânglios sensoriais (COLLO *et al.*, 1996).

ADENOSINA E CORAÇÃO

A adenosina é um nucleosídeo que compreende a adenina ligada a uma ribose por uma ponte glicosídica. A adenosina é um precursor ou um metabólito dos nucleotídeos purínicos como AMP, ADP e ATP (figura 1).

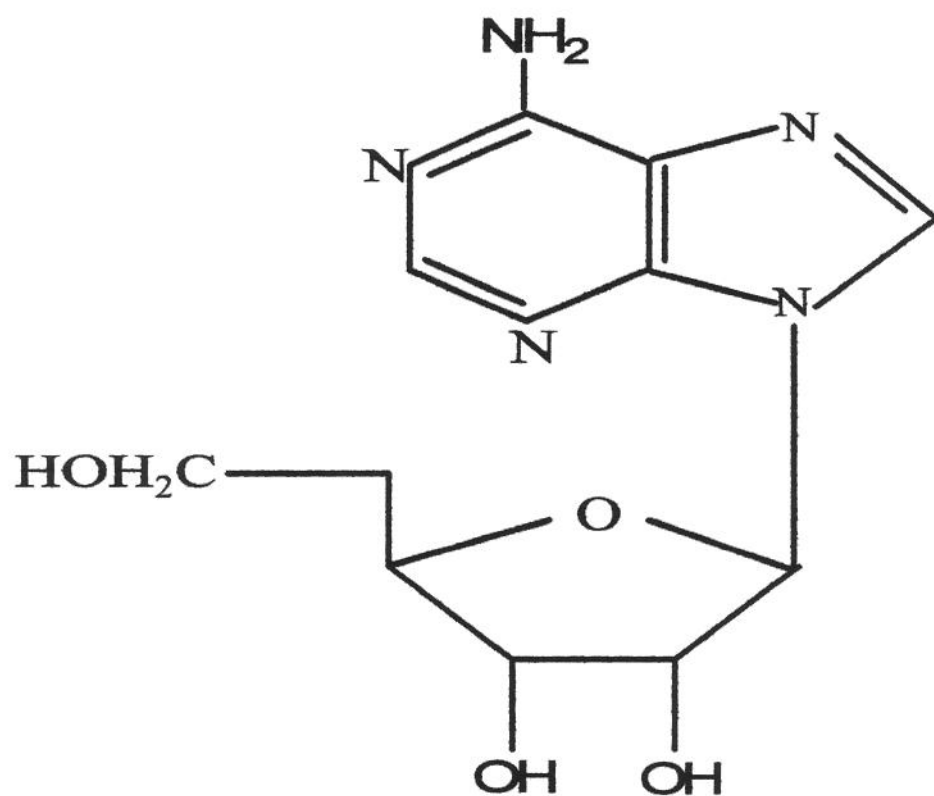


Figura 1: Estrutura química da adenosina. Adaptado de Voet & Voet, 1995.

Esses nucleotídeos podem ser liberados do interior das células ou dos terminais nervosos simpáticos onde são prontamente degradados pelas enzimas ecto-nucleotidases, localizadas na membrana celular das células, levando a formação de adenosina e posterior metabolismo (figura 2).

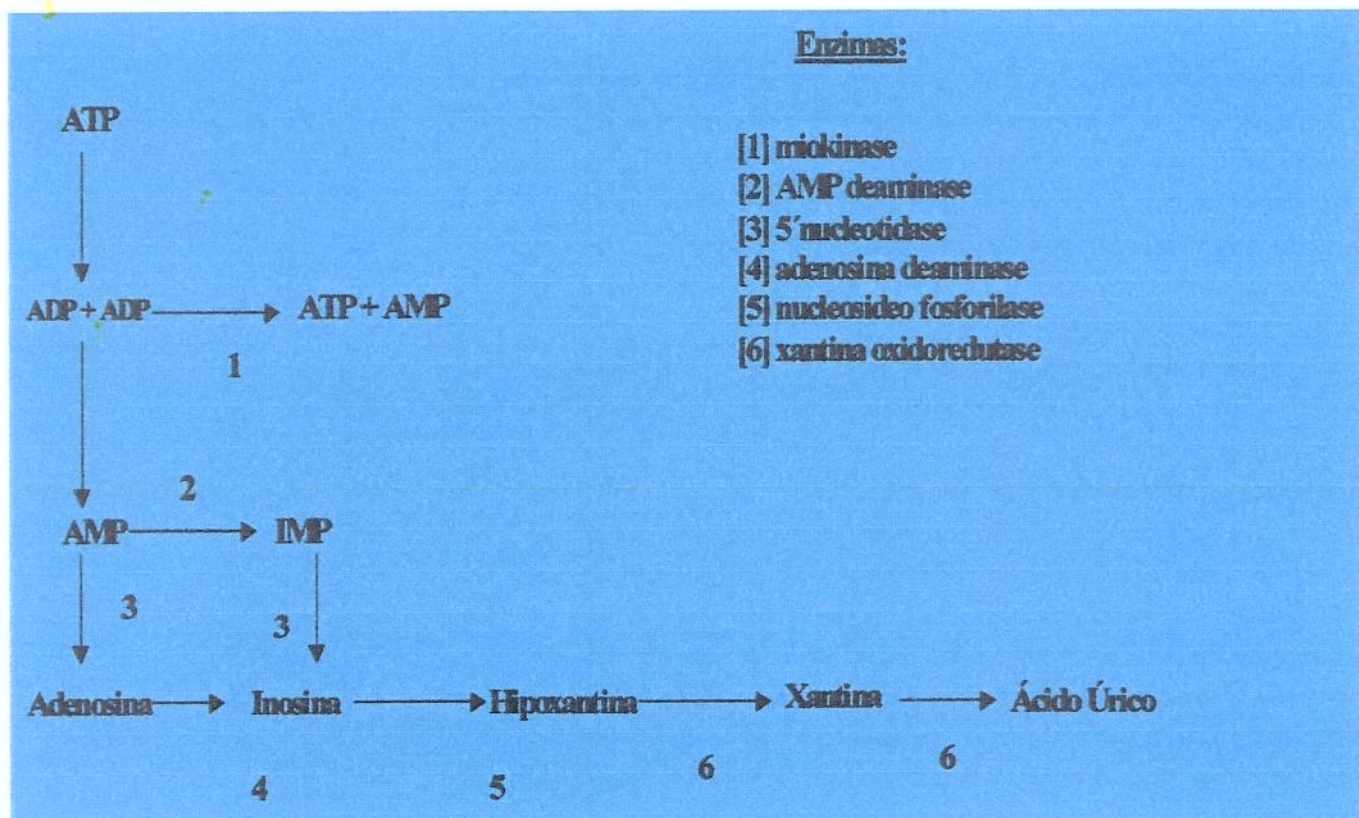


Figura 2: Metabolismo da adenosina. Adaptado de Voet & Voet, 1995.

A concentração de adenosina no sangue e fluido intersticial, em normoxia, é normalmente baixa, uma vez que um eficiente sistema de transporte capta a adenosina de volta para a célula formando novamente AMP (KROLL *et al.*, 1993). No entanto, em condições de hipóxia, a formação de adenosina é grandemente aumentada e seu processo de degradação é intensificado (SWAIN *et al.*, 1982). A adenosina exerce efeitos inotrópicos e cronotrópicos negativos no coração. Além disso, a adenosina produz dilatação dos vasos coronarianos (JAMES, 1965; ENDOH, MARUYAMA & TAIRA, 1983). A injeção de adenosina no nodo sinoatrial induz diminuição da frequência cardíaca em cães (BELLONI *et al.*, 1985), coelhos (WEST & BELARDINELLI, 1985) e em humanos (DRURY & SZENT-GYORGYI, 1982). Assim, a adenosina é liberada do coração quando ocorre deficiência no aporte de oxigênio para o miocárdio, como por exemplo: isquemia, hipóxia e durante o exercício. O exercício é o único agente estressor que desencadeia adaptações positivas no coração. Durante o exercício, ocorre um aumento na demanda de oxigênio em vários tecidos e no coração e conseqüente elevação dos níveis de adenosina no miocárdio e no efluxo coronariano, indicando que a maior liberação de adenosina no tecido cardíaco seria um mecanismo protetor em resposta à isquemia (BERNE, 1963; SCHRADER, HADDY & GERLACH, 1977; BARDENHEUER & SCHRADER, 1986).

Os receptores de adenosina estão presentes no coração de várias espécies animais, incluindo o homem. Existem, pelo menos quatro subtipos de receptores de adenosina: A₁, A_{2A}, A_{2B}, e A₃, membros da família dos receptores acoplados a proteína G com 7 domínios transmembrana e composição glicoproteica. (OLAH, REN & STILES, 1995).

Os receptores de adenosina A₁ foram clonados, sequenciados e purificados apresentando 36.600 daltons e 326 aminoácidos. São encontrados em grande número no cérebro (cerebelo e hipocampo), medula espinhal, testículos e tecido adiposo, e em menor número nos rins, baço e coração. A ativação dos receptores de adenosina do subtipo A₁ e a resposta celular envolve vários segundos mensageiros, pode haver inibição da ativação da adenilato ciclase (MUNSHI *et al.*, 1991), aumento da corrente de potássio (TRUSSEL & JACKSON, 1985), inibição da corrente de cálcio, por modulação de canais de cálcio do tipo N (GREEN & HAAS, 1991), estimulação da fosfolipase C através da proteína Gs

(GERWINS & FREDHOLM, 1992, OLAH & STILES, 1995), e finalmente pode haver inibição da hidrólise do fosfatidilinositol (DELAHUNTY *et al.*, 1988). No nodo sino-atrial, a adenosina parece aumentar a corrente iônica retificadora dos canais de potássio, bem como inibe a atividade da adenilato ciclase acarretando ações cronotrópicas negativas (BELARDINELLI *et al.*, 1995).

Os receptores A_2 de adenosina medeiam a estimulação da adenilato ciclase e são classificados em dois subtipos, A_{2A} e A_{2B} . Os receptores A_{2A} possuem peso molecular em torno de 45.000 daltons e alta afinidade para adenosina, estão presentes em grande número no cérebro, timo, plaquetas e células endoteliais (SCHIFFMANN *et al.*, 1991; PETERFREUND *et al.*, 1996). Os receptores A_{2B} tem peso molecular em torno de 36.350 daltons e baixa afinidade pela adenosina, são encontrados principalmente no cólon, esôfago, antro gástrico e mastócitos (RIVKEES *et al.*, 1992; SHEPHERD, LINDEN & DULING, 1996).

Os receptores A_3 de adenosina foram clonados de testículos de rato e cérebro de ratos, ovelhas e humanos (MEYERHOF *et al.*, 1991; ZHOU *et al.*, 1992; SALVATORE *et al.*, 1993). Sua estimulação produz inibição da adenilato ciclase, ativação do metabolismo dos fosfoinositídeos com formação de IP₃, além de ativar enzimas anti-oxidantes (ALI *et al.*, 1990; JACABSON, 1998). No coração, os receptores A_3 de adenosina possuem papel cardioprotetor em resposta à isquemia pela redução da frequência e força de contração (TAWFIK-SCHLIEPER *et al.*, 1989; HORI & KITAKAZE, 1991; SHRYOCK & BELARDINELLI, 1997).

As relações de causa e efeito do aumento dos níveis de adenosina no coração após atividade física e sua associação com a bradicardia ainda não são claras. Portanto, o objetivo geral desse projeto foi investigar a participação dos receptores de adenosina na bradicardia de repouso presente em animais submetidos a 8 semanas de treinamento físico por natação e também a participação dos mediadores clássicos do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático nesse fenômeno, usando átrios direitos isolados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram:

1. Avaliar as respostas cronotrópicas de átrios direitos de ratos controles ou treinados por natação por 8 semanas para os agonistas β adrenérgicos, muscarínicos e purinérgicos. Para isso foram construídas curvas dose-resposta em ambos os grupos ao:

- Isoproterenol (agonista β adrenérgico)
- Carbacol (agonista muscarínico)
- ATP (agonista purinérgico)
- CPA (N-ciclopentiladenosina, agonista de receptores de adenosina A_1)
- NECA (5'-N- ethylcarboxamido adenosina, agonista de receptores de adenosina A_2)
- IB MECA (agonista de receptores de adenosina A_3)



2. MATERIAL E MÉTODO

ANIMAIS

Ratos Wistar, pesando entre 150 a 200 g, provenientes do Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB-UNICAMP, Campinas, SP) foram usados em todos os experimentos. Os ratos foram alojados, pelo menos por uma semana, no biotério de manutenção do Departamento de Farmacologia - FCM - UNICAMP, em gaiolas coletivas. água e ração foram fornecidas *ad libitum*.

Os animais foram divididos em dois grupos: ratos controles, sem qualquer manipulação e ratos treinados por natação durante oito semanas.

AVALIAÇÃO DOS RATOS QUE FORAM USADOS NO ESTUDO

Na primeira semana de estudo, os animais passaram por um período de adaptação tanto ao meio líquido quanto a carga imposta, que consistiu de aumentos progressivos no tempo de natação, iniciando a atividade física com 15 minutos, na primeira sessão, com aumento progressivo de 15 minutos por dia até completar o tempo total de 60 minutos. A carga foi adicionada no período equivalente da natação. Somente os animais adaptados ao meio líquido foram utilizados no estudo.

PROGRAMA DE TREINAMENTO FÍSICO POR NATAÇÃO

Os animais foram submetidos a sessões de natação que consistiram de 5 sessões por semana, cada sessão de 60 minutos, durante oito semanas consecutivas. As sessões foram realizadas num tanque de amianto com 100 cm de comprimento, 70 cm de largura e 60 cm de altura. A água foi colocada à uma profundidade de 40 cm com temperatura mantida em torno de 32° C. Foram fixados ao tórax dos ratos, pesos equivalentes a 5 % do peso corporal do animal (GOBATTO *et al.*, 1992). Os animais foram treinados em grupos de 10 ratos. A natação foi escolhida para efetuar o treinamento físico por facilidades metodológicas. Após o término do período total de treinamento, os animais foram mantidos em repouso por um período de 48 horas e então sacrificados para medida de frequência cardíaca ou para obtenção dos átrios direitos isolados.

MEDIDA DE FREQUÊNCIA CARDÍACA E PRESSÃO ARTERIAL

A medida da frequência cardíaca e pressão arterial foi avaliada diretamente através de uma população de cinco ratos de cada grupo no final do protocolo experimental de acordo com Jansakul (1995). Vinte e quatro horas após o período de treinamento, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico, 50 µg/kg de peso, i.p. A artéria femoral esquerda de cada rato foi canulada, usando tubos de PE-10. A cânula foi exteriorizada na região dorsal do rato e após 24 horas, a frequência cardíaca e a pressão arterial foram avaliadas, conectando-se o catéter a um transdutor de pressão acoplado a um polígrafo Grass modelo 7D.

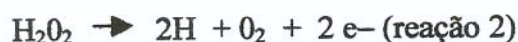
AVALIAÇÃO DO CONDICIONAMENTO FÍSICO DOS ANIMAIS: LACTATO SANGÜÍNEO

Para controle do efeito do treinamento no condicionamento físico dos animais submetidos à natação foi realizado teste de esforço com a análise do lactato sangüíneo, modificado de SANTOS *et al.* (1998). O teste foi realizado 48 horas após a última sessão de natação e consistiu de uma única sessão de 1 hora. Foram coletadas amostras de sangue da extremidade da cauda do rato para determinação de teores de lactato sangüíneo a cada 20 minutos.

O lactato sangüíneo foi analisado através de coleta de 25 µl desprezando-se a primeira gota. Imediatamente, o sangue foi diluído em 50 µl de solução de fluoreto de sódio (1%), contida em tubos de Eppendorf. As amostras coletadas foram estocadas em freezer para posterior análise que foi feita através do método eletroquímico segundo ENGELS & JONES (1978).

A determinação do ácido láctico baseia-se primariamente na existência de um sensor de prova e três camadas de membranas. A camada média contém a enzima L-lactato oxidase numa forma imobilizada. A face da prova, coberta pela membrana, está situada em uma câmara contendo tampão na qual é injetada a amostra. Uma parte do substrato difunde-se através da membrana e quando ocorre o contato entre a amostra e a enzima L-

lactato oxidase produz-se peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (reação 1) que é então oxidado, no ânodo de platina, produzindo elétrons (reação 2).



O fluxo de elétron é linearmente proporcional a concentração de equilíbrio de peróxido de hidrogênio e, portanto, proporcional à concentração de lactato. Os valores de lactato são lidos então no aparelho YSL 2300 STAT (Yellow Spring, Inc. E.U.A.).

ÁTRIOS DIREITOS ISOLADOS

Os animais foram anestesiados com halotano e exsanguinados por secção dos vasos cervicais. Em seguida, os corações foram removidos e colocados em solução de Krebs ringer bicarbonato com a seguinte composição em mM: NaCl, 124; KCl, 4,75; $MgSO_4$, 1,30; $CaCl_2$, 2,25; $NaHCO_3$, 25,0; NaH_2PO_4 , 0,6; glicose, 10,0; ascorbato, 0,3; EDTA, 0,03 e 17- β -estradiol (5 μM). Nesta solução de Krebs-ringer bicarbonato, o 17- β -estradiol foi adicionado para evitar a metabolização do isoproterenol (HUGHES & SMITH, 1978). Em seguida, os átrios direitos foram isolados e montados em câmaras de incubação de tecido (20 ml volume) preenchidas com a solução Krebs ringer bicarbonato continuamente aerada com 95% de O_2 e 5% de CO_2 , mantido à temperatura de 36.5°C, e pH entre 7,3 a 7,5.

OBTENÇÃO E ANÁLISE DAS CURVAS CONCENTRAÇÃO-EFEITO

Em átrios direitos isolados de ratos controles ou treinados, as curvas concentração-efeito aos agonistas: isoproterenol, carbacol, α metil- ATP, CPA, NECA e IB-MECA foram obtidas através do aumento cumulativo das concentrações do agonista em meia unidade logarítmica entre doses sucessivas (VAN ROSSUM, 1963). As curvas concentração-efeito aos agonistas de adenosina foram feitas na presença de propranolol (1 μM) e atropina (3 μM) para eliminar qualquer interferência dos receptores β e muscarínicos, respectivamente, na resposta purinérgica.

O efeito dos agonistas sobre os batimentos espontâneos dos átrios direitos foram avaliados pelo aumento ou diminuição dos batimentos por minuto. Os dados obtidos das curvas concentração-efeito nos átrios direitos isolados foram avaliados segundo a equação descrita abaixo:

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

A letra E representa o aumento da frequência de batimentos atrial em resposta ao agonista (efeito); $E_{\max}$ 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.

A análise de regressão não linear para determinar os parâmetros: $E_{\max}$, log EC_{50} e n foi determinada utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) com o valor basal dos batimentos atriais iguais a zero, $\Phi =$ zero.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão das médias. O teste t de Student não pareado e pareado foi usado dentro do programa InStat (GraphPad Software). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.



3. RESULTADOS

PESO CORPORAL

O treinamento físico por natação durante 8 semanas reduziu significativamente o peso corporal dos animais quando comparados com o grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1: Peso corporal dos ratos no início e no final do estudo dos grupos controle ou treinado por natação durante 8 semanas.

GRUPOS	Início	Fim	N
Controle	166±2.9	342 ± 3.3	59
Treinado	171±1.7	304 ± 3.5*	59

Os dados estão apresentados como médias ± E.P.M. para N experimentos.

* P < 0,05, em relação aos seus respectivos grupos controle (teste t de Student pareado).

FREQUÊNCIA CARDÍACA E PRESSÃO ARTERIAL

O treinamento físico por natação durante 8 semanas dos animais, não produziu qualquer alteração nos valores de pressão arterial dos animais, quando comparados com seus respectivos grupos controles enquanto que a frequência cardíaca dos animais treinados foi significativamente reduzida (Tabela 2).

Tabela 2: Efeito do treinamento físico por natação durante 8 semanas nos valores de pressão arterial e frequência cardíaca de ratos.

GRUPOS	Pressão Arterial (mmHg)		Frequência cardíaca (bat/min)
	Início	Final	Final
Controle	128 ± 7	123 ± 1.2	396 ± 5
Treinado	127 ± 8	123 ± 6	300 ± 18*

Os dados estão apresentados como médias ± E.P.M. para N experimentos.

* P < 0,05, comparação entre o grupo controle e treinado pelo teste t de Student não pareado.

LACTATO SANGUÍNEO

A figura 3 mostra a concentração de lactato sanguíneo nos animais controles ou submetidos ao treinamento físico por natação durante 8 semanas. A menor concentração de lactato nos animais treinados mostra que o programa de treinamento físico empregado neste trabalho foi eficaz.

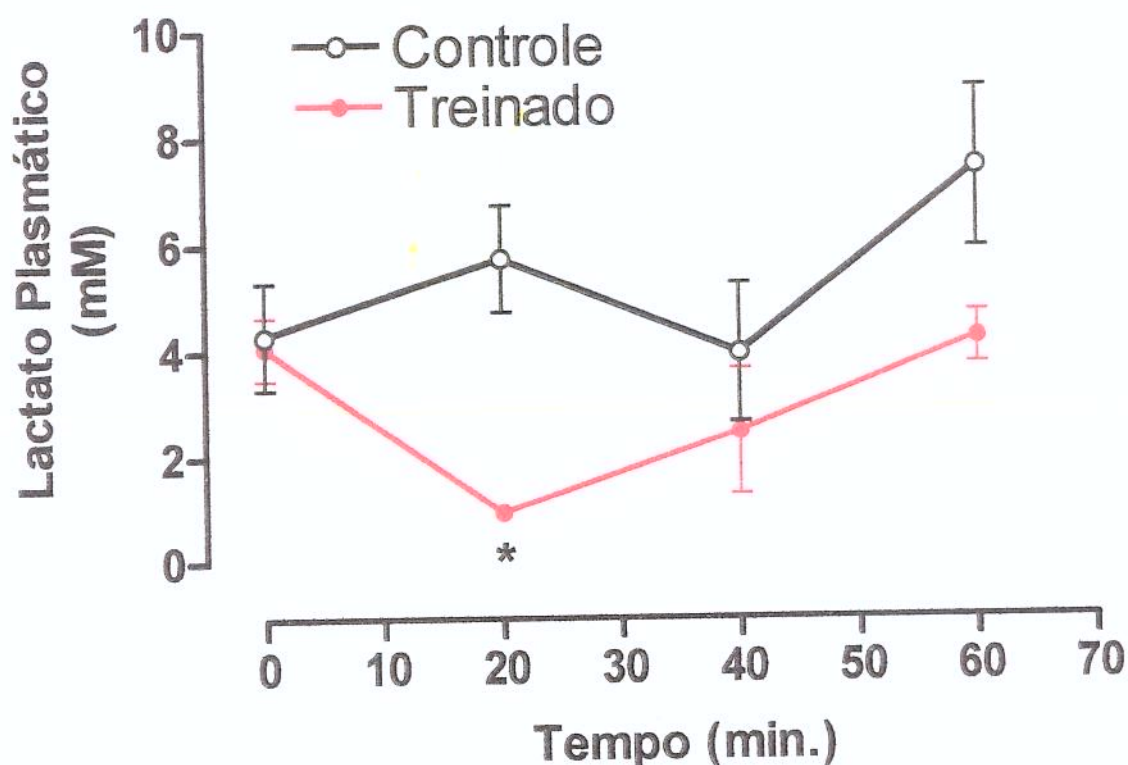


Figura 3: Evolução temporal dos níveis de lactato sanguíneos em ratos controles (○) ou treinados por natação durante 8 semanas (●). Os dados representam as médias $\pm$ E.P.M. para 5 animais.

FREQUÊNCIA BASAL ATRIAL

A frequência dos batimentos espontâneos dos átrios direitos de ratos controles (259 ± 6 , bat/min) não foram diferentes daquelas dos animais treinados por natação durante 8 semanas (256 ± 6 , bat/min).

AGONISTA β ADRENÉRGICO: ISOPROTERENOL

O efeito do treinamento físico por natação durante 8 semanas na sensibilidade da resposta cronotrópica positiva ao isoproterenol em átrios direitos isolados foi avaliado. Tanto a potência quanto a resposta máxima ao isoproterenol foram significativamente aumentadas nos átrios direitos de ratos treinados (tabelas 3).

Tabela 3: Potência e resposta máxima (Δ , bat/min) do isoproterenol em átrios direitos isolados de ratos controles ou treinados por natação durante 8 semanas.

GRUPOS	PEC ₅₀	E _{max}	N
Controle	$8,76 \pm 0,08$	115 ± 10	6
Treinado	$9,25 \pm 0,12^*$	$172 \pm 13^*$	8

Os dados estão representados como médias $\pm$ E.P.M. para N experimentos.

* $P < 0,05$, comparação entre o grupo controle e treinado pelo teste t de Student não pareado.

AGONISTA MUSCARÍNICO: CARBACOL

A figura 4 ilustra as curvas concentração-efeito ao agonista muscarínico, carbacol. Podemos observar que o treinamento físico por natação durante 8 semanas não determinou qualquer alteração na sensibilidade da resposta cronotrópica negativa ao carbacol quando comparados aos animais controles. A resposta máxima ao carbacol também não foi afetada pelo treinamento. A tabela 4 mostra os valores de pEC_{50} e da resposta máxima ao agonista.

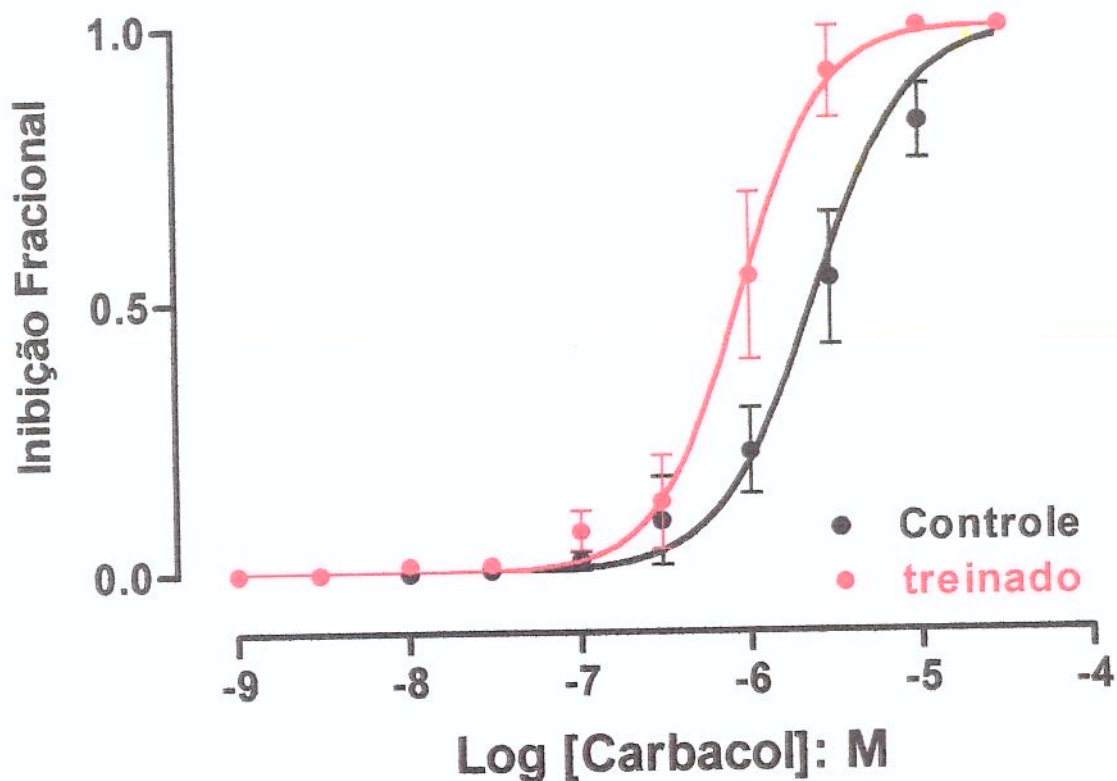


Figura 4: Curvas concentração-efeito ao carbacol em átrios isolados de ratos controles (○) ou treinados por natação durante 8 semanas (●). Os dados estão representados como médias $\pm$ E.P.M. para 6 experimentos.

Tabela 4: Potência e resposta máxima (Δ , bat/min) do carbacol em átrios direitos isolados de ratos controles ou treinados por natação durante 8 semanas.

GRUPOS	pEC ₅₀	E _{max}	N
Controle	5,61 $\pm$ 15	-200 $\pm$ 27	6
Treinado	6,07 $\pm$ 15	- 182 $\pm$ 20	6

Os dados estão representados como médias $\pm$ E.P.M. para N experimentos.

E_{max}, resposta máxima.

AGONISTA PURINÉRGICO: α -METIL- ATP

O agonista purinérgico α -metil ATP produziu pequena atividade cronotrópica negativa tanto em átrios direitos isolados de animais controle (-36 $\pm$ 5, bat/min) quanto nos átrios de ratos treinados por natação durante 8 semanas (-30 $\pm$ 7, bat/min), que não foi estatisticamente diferente entre os grupos (figura 5).

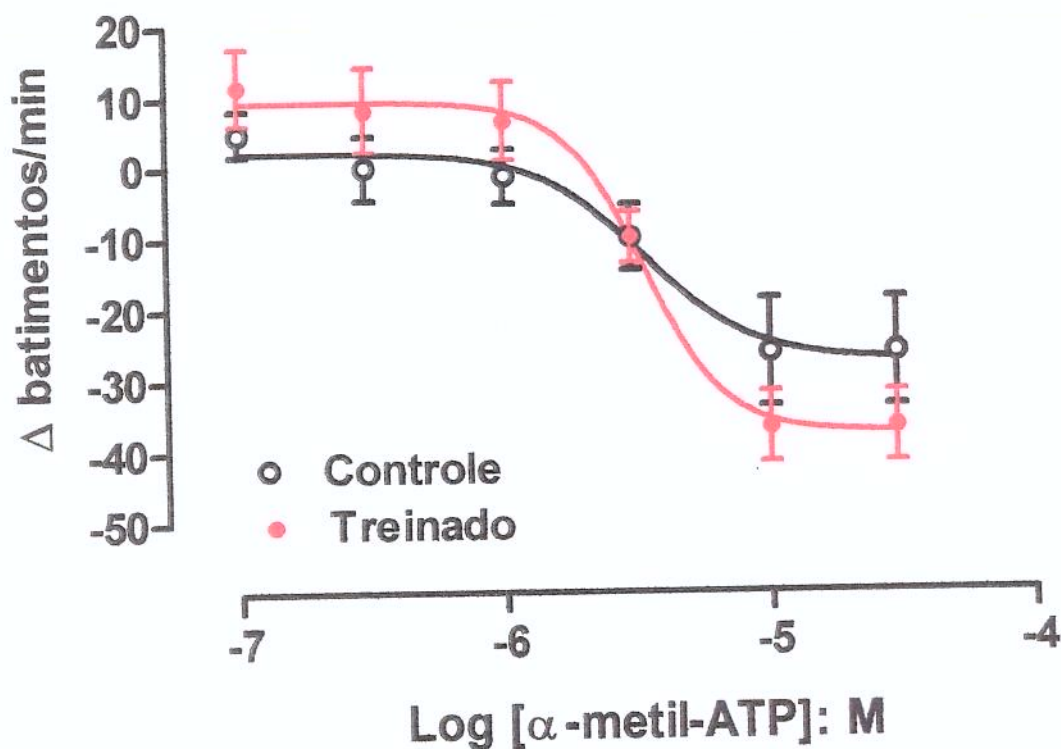


Figura 5: Curvas concentração-efeito ao α -metil ATP em átrios isolados de ratos controles (O) ou treinados por natação durante 8 semanas (●). Os dados estão representados como médias $\pm$ E.P.M. para 6 experimentos.

AGONISTAS DE RECEPTORES DE ADENOSINA: CPA, NECA e IB-MECA

Os agonistas de receptores de adenosina CPA, NECA e IB-MECA produziram cronotropismo negativo que foi concentração-dependente. A potência e as respostas máximas ao CPA e NECA em átrios direitos isolados de ratos treinados por natação durante 8 semanas não foram alteradas quando comparada aos seus respectivos grupos controle (figuras 6 e 7, tabela 5). No entanto, verificamos um aumento tanto na potência quanto na resposta máxima ao agonista de receptores de adenosina do subtipo A_3 , IB-MECA nos átrios direitos isolados de ratos treinados (figura 8 e tabela 5).

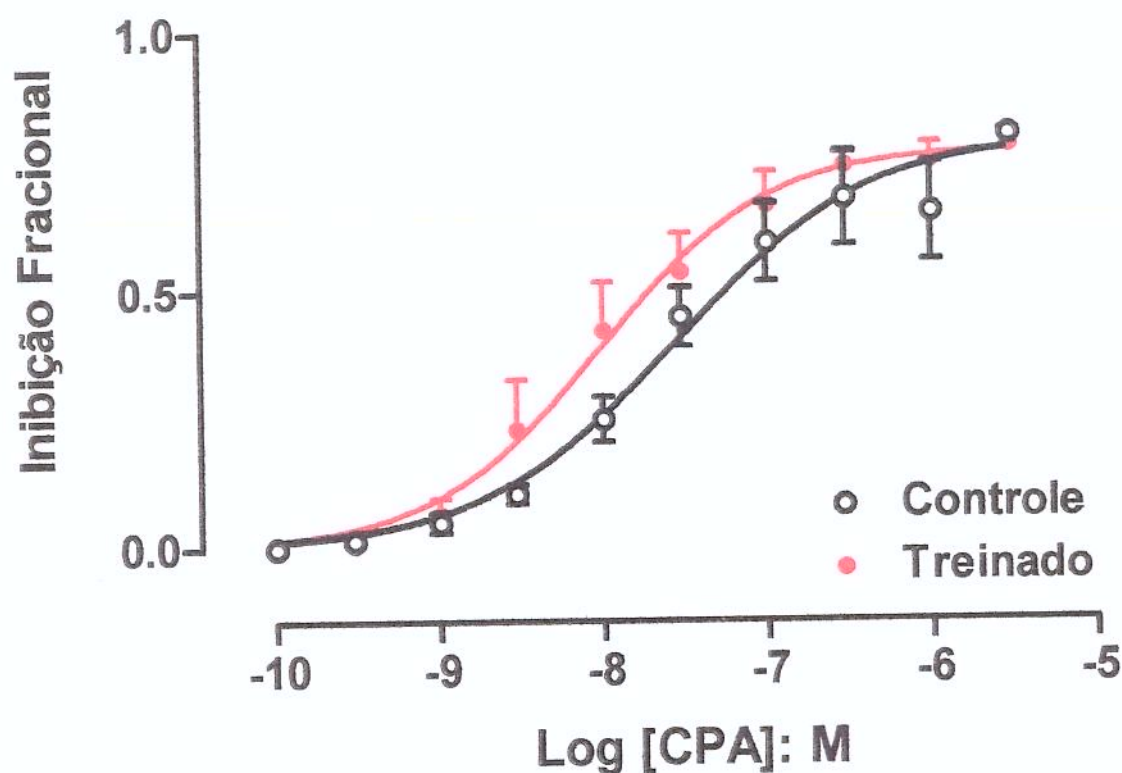


Figura 6: Curvas concentração-efeito ao CPA em átrios isolados de ratos controles (○) ou treinados por natação durante 8 semanas (●). Os dados estão representados como médias ± E.P.M. para 6 experimentos.

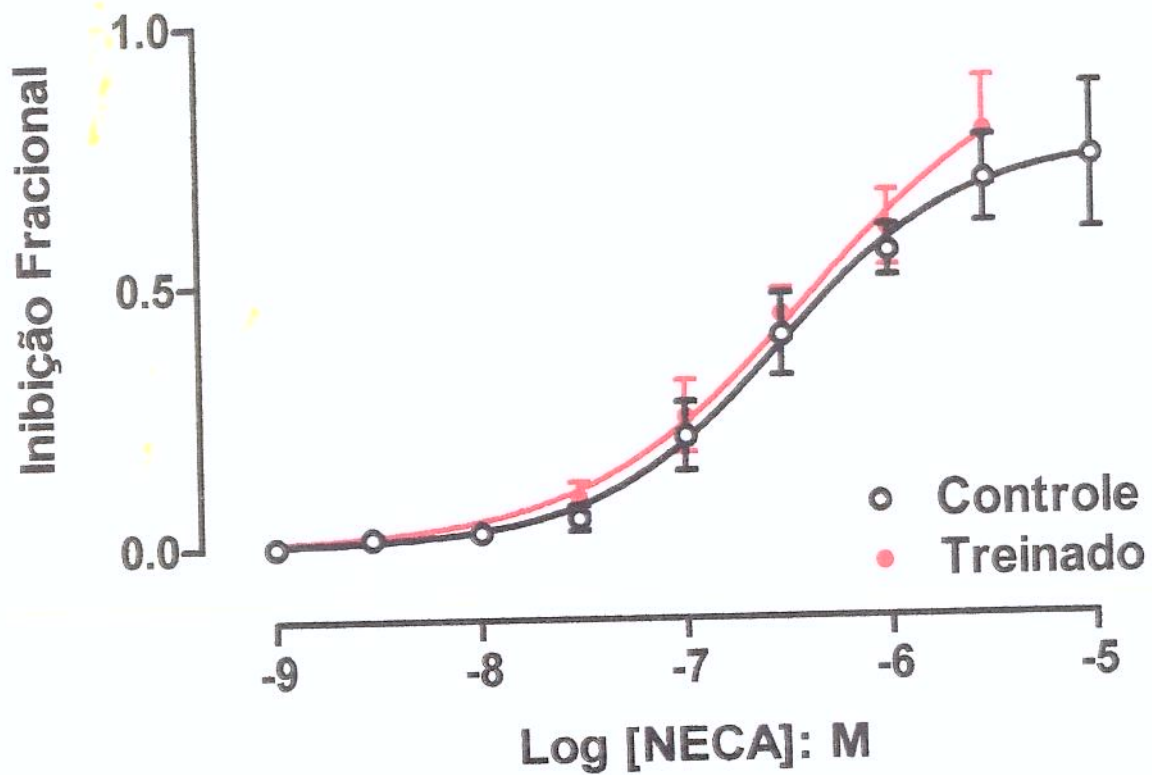


Figura 7: Curvas concentração-efeito ao NECA em átrios isolados de ratos controles (○) ou treinados por natação durante 8 semanas (●). Os dados estão representados como médias $\pm$ E.P.M. para 7 experimentos.



4. DISCUSSÃO

Em corações de mamíferos, o nodo sinoatrial controla a ritmicidade cardíaca através da despolarização de suas células que determinam uma frequência de batimentos espontâneos. A frequência cardíaca é controlada essencialmente por fibras do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático, que liberam na região do nodo sinoatrial noradrenalina e acetilcolina, respectivamente. Além desses neurotransmissores clássicos, peptídeos e purinas coexistem nas terminações nervosas autonômicas do nodo sinoatrial, e controlam a frequência atrial. Entre os peptídeos presentes no marca-passo temos a angiotensina II, o peptídeo natriurético atrial, a bombesina, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), a colecistoquinina, a encefalina, a galanina, a gastrina, o neuropeptídeo Y, a neurotensina, a somatostatina, o peptídeo intestinal vasoativo e a vasopressina (HOKFELT *et al.*, 1977; WEIHE & REINECKE, 1981; STEELE & CHOATE, 1994; Lundberg, 1996; Beaulieu & Lambert, 1998).

As purinas (adenosina, AMP, ADP e ATP) são co-estocadas e liberadas junto com a noradrenalina das fibras simpáticas no nodo-sinoatrial e suas ações caracterizam-se por diminuição da atividade do marca passo cardíaco, além de reduzir a velocidade de condução ventricular (PELLEG *et al.*, 1986, BURNSTOCK, 1995). Sabe-se que o treinamento físico regular induz uma diminuição da frequência cardíaca, no entanto os mecanismos pelos quais a bradicardia de repouso aparece após o treinamento físico regular não está ainda bem esclarecida.

O menor valor de frequência cardíaca, peso corporal e concentração de lactato sanguíneo mostram que o programa de natação por 8 semanas empregado em nosso estudo foi eficaz. Assim passamos a avaliar o papel do sistema nervoso simpático, parassimpático e das purinas na resposta cronotrópica de átrios direitos isolados de ratos treinados por 8 semanas de treinamento e sua correlação com a bradicardia de repouso.

Alterações do sistema nervoso autônomo com diminuição da atividade simpática sobre o marca passo atrial bem como atenuação do arco reflexo dos baroreceptores arteriais e eferências dos núcleos nervosos centrais tem sido atribuída como uma das causas da bradicardia de repouso após treinamento (TIPTON, 1965; LIN & HORVATH, 1972; COUSINEAU *et al.*, 1988; HASSAN, 1991; COLLINS & DICARLO, 1997; KRIEGER *et al.*, 1998). A resposta cronotrópica positiva mediada pelos

adrenoceptores β é um dos determinantes da atividade simpática. Nós, portanto, avaliamos se a atividade física por natação durante poderia causar alguma alteração na resposta cronotrópica mediada por adrenoceptores β em átrios isolados. Nossos resultados mostram que tanto a potência quanto a resposta máxima ao isoproterenol em átrios direitos isolados foram significativamente aumentadas, confirmando assim que a atividade do sistema nervoso simpático diminui com o treinamento físico. No entanto, esse aumento da resposta β adrenérgica descarta a participação desses receptores na bradicardia de repouso, pelo contrário, a maior sensibilidade da resposta cronotrópica positiva ao isoproterenol contrapõe-se ao fenômeno de bradicardia.

Para explicar o aumento da potência e da resposta máxima ao isoproterenol nos animais treinados dois mecanismos poderiam estar envolvidos. Primeiro, supersensibilidade da resposta cronotrópica mediada pelos adrenoceptores β no tecido atrial pela atenuação da atividade simpática. O fenômeno da supersensibilidade é um mecanismo adaptativo do organismo amplamente conhecido e estudado, onde a retirada ou diminuição da transmissão neuronal no tecido, levaria ao aumento da resposta celular na tentativa de manter a homeostase do organismo (FLEMING *et al.*, 1971; 1989). Estudos prévios mostram que atletas apresentam redução dos níveis plasmáticos de catecolaminas e conseqüente aumento do número de adrenoceptores β em linfócitos (LEHMAN *et al.*, 1981; MAKI, KONTULA, HARKONEN, 1990) e aumento da resposta β adrenérgica ao isoproterenol e noradrenalina (WYATT *et al.*, 1978). Portanto, o exercício físico dinâmico diminui a atividade simpática acarretando supersensibilidade da resposta β adrenérgica.

O segundo mecanismo possível para explicar o aumento da resposta cronotrópica ao isoproterenol em átrios direitos seria a elevação dos níveis plasmático de glicocorticóides. A modulação dos adrenoceptores β pelos glicocorticóides está bem documentada (BUGAJSKI *et al.*, 1991; MOURA & DE MORAES, 1994; BUGAJSKI *et al.*, 1995; TSENG *et al.*, 1995). Sua ação nos receptores esteróides nucleares desencadeiam aumento da síntese de RNAm, que por sua vez produz aumento da síntese de novos receptores, aumentando a resposta celular (LEE & REED, 1977; MANO *et al.*, 1979; HADCOCK *et al.*, 1989; TUOHIMAA *et al.*, 1996). A atividade física regular produz aumento significativo dos níveis de glicocorticóides circulantes (VASANKARI *et al.*, 1991;

TABATA *et al.*, 1991), o que poderia promover aumento do número de adrenocetores β resultando em aumento da resposta β adrenérgica no coração.

Assim, esses dois mecanismos associados ou não poderiam desencadear aumento da resposta β adrenérgica de átrios isolados de animais treinados.

A participação do sistema nervoso parassimpático na bradicardia de repouso após treinamento apresenta resultados conflitantes. Alguns autores detectaram aumento da atividade parassimpática (SCHEUER & TIPTON, 1977; SMITH *et al.*, 1989; SHI *et al.*, 1995), outros observaram diminuição da atividade (DIESPTRA *et al.*, 1980; CHEN *et al.*, 1997), enquanto que nenhuma alteração na atividade do sistema nervoso autônomo parassimpático foi observada por outros investigadores (O'LEARY & SEAMANS, 1993; SCISLO, DICARLO & COLLIN, 1993; GREGOIRE *et al.*, 1996). Nossos resultados mostram que o treinamento físico por natação por 8 semanas, não determinou qualquer alteração da resposta cronotrópica mediada pelos receptores muscarínicos em átrios direitos isolados, sugerindo que o programa de treinamento empregado não modificou a atividade parassimpática, assim a bradicardia de repouso encontrada nos animais treinados não parece estar associada à maior atividade parassimpática sobre o marca-passo cardíaco em nosso estudo.

As purinas exercem efeitos inotrópicos e cronotrópicos negativos no coração de diversas espécies que são mediadas pelos diferentes receptores purinérgicos L (JAMES, 1965; BURNSTOCK & MEGHJI, 1981; DRURY & SZENT-GYORGYL, 1982; ENDOH, MARUYAMA & TAIRA, 1983; BELLONI *et al.*, 1985; WEST & BELARDINELLI, 1985; MANTELLI *et al.*, 1993; QI & KWAN, 1996).

A formação de adenosina através da degradação do ATP é grandemente aumentada quando ocorre deficiência no aporte de oxigênio para o miocárdio, como por exemplo na isquemia, em hipóxia ou durante o exercício (BERNE, 1963; SCHRADER, HADDY & GERLACH, 1977; BARDENHEUER & SCHRADER, 1986). No exercício, ocorre um aumento na demanda de oxigênio em vários tecidos do organismo e principalmente no coração, elevando os níveis de adenosina no miocárdio. A adenosina teria uma ação cardioprotetora em resposta à isquemia e/ou maior consumo de oxigênio, através da diminuição da força e da frequência de contração do tecido cardíaco, reduzindo

assim o trabalho do coração e futuras lesões miocárdicas, além do seu efeito vasodilator promovendo maior aporte de sangue ao miocárdio por vasodilatação coronariana. Os valores de pEC_{50} da adenosina para os receptores A_1 e A_2 estão na faixa de 10^{-7} a 10^{-8} M enquanto que a afinidade para os receptores do subtipo A_3 é em torno de 10^{-6} M, assim a ativação deste subtipo requer altas concentrações do agonista (SALVATORE *et al.*, 1993; JACOBSON *et al.*, 1995). Nossos resultados mostram que os valores de pEC_{50} aos agonistas de receptores de adenosina nos átrios direitos isolados de animais controle foram similares aos encontrados na literatura. No entanto, a resposta cronotrópica negativa ao agonista de receptores de adenosina do subtipo A_3 , IB-MECA foi significativamente aumentada em átrios de animais treinados por natação durante 8 semanas. Diversos trabalhos mostram que os receptores de adenosina do subtipo A_3 parecem estar mais envolvidos nos processos patológicos e em resposta à isquemia do que os receptores do subtipo A_1 e A_2 (SALVATORE *et al.*, 1993; JACOBSON *et al.*, 1995; SEBASTIÃO & RIBEIRO, 2000), sugerindo que esses subtipos de receptores são mais sensíveis às alterações das funções hemodinâmicas em resposta ao exercício.

Recentemente foi proposto existir uma modulação intracelular dos diferentes segundos mensageiros dos receptores de adenosina, onde a ativação de um subtipo de receptor pode aumentar a resposta de outro através de seus segundos mensageiros (SEBASTIÃO & RIBEIRO, 2000). Poderíamos assim especular que a supersensibilidade observada ao isoproterenol poderia ser decorrente de maior ativação da proteína Gs que por sua vez induziria maior estimulação dos mecanismos intracelulares da resposta mediada pelos receptores A_3 , uma vez que foi postulada uma interação entre a proteína Gs e os segundos mensageiros envolvidos na resposta dos receptores A_3 . Colaborando com essa hipótese, XU *et al.* (1999) observaram que os efeitos cronotrópicos negativos da adenosina eram potenciados na presença de isoproterenol sugerindo que a interação entre os segundos mensageiros intracelulares é uma resposta do organismo para a manutenção da homeostase funcional do tecido. Assim, a bradicardia de repouso após treinamento físico parece ser uma resposta do organismo ao aumento do metabolismo por intensificação de quebra de moléculas de ATP com maior participação dos receptores de adenosina do subtipo A_3 , além de mecanismos modulatórios intracelulares entre os diferentes receptores presentes no marca-passo cardíaco.



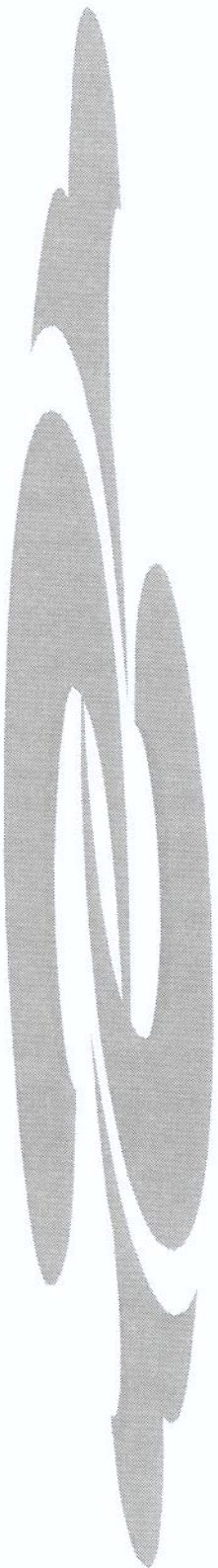
5. CONCLUSÕES

1. O programa de treinamento físico por natação durante 8 semanas foi eficaz levando à diminuição de peso corporal, lactato sanguíneo e da frequência cardíaca.
2. O treinamento físico por natação determinou supersensibilidade da resposta β adrenérgica em átrios direitos, sem alteração da resposta mediada pelos receptores muscarínicos, mostrando que o programa de exercício empregado nesse estudo leva à atenuação da atividade simpática sobre o marca passo cardíaco e nenhuma mudança da atividade parassimpática.
3. A resposta cronotrópica negativa ao agonista IB-MECA foi significativamente aumentada nos átrios direitos de ratos treinados por natação por 8 semanas sugerindo uma participação dos receptores do subtipo A_3 na bradicardia de repouso após treinamento.



6. SUMMARY

Endogenous adenosine is produced by the heart during ischaemia and exercise as a natural cardioprotective nucleoside. Physical training can produce many adaptations on cardiovascular system such as bradycardia, but the underlying mechanisms by which bradycardia is established still not understood. Therefore the aim of this work was to investigate the role of adenosine receptors on the bradycardia induced by swim training. Also we evaluated the activation of sympathetic and parasympathetic activity on the rat right atria. Adult Wistar rats were divided in two groups, control and trained animals. Swim training program consisted of regular physical activity for 8 weeks, five days a week, for 60 minutes each session. After 48 hours of swim training, the right atria were isolated and concentration-response curves were obtained for isoproterenol, carbachol, CPA, NECA, IB-MECA, and α methyl ATP. Heart rate and blood pressure were measured by femoral artery catheter. Swim training produced a significant reduction on plasma lactate level, body weight and heart rate without changes on the blood pressure. No changes were seen at the pEC₅₀ values for α methyl-ATP, CPA, NECA, and carbachol in both groups. However, the chronotropic responses to β adrenergic agonist, isoproterenol, and for A₃ agonist, IB-MECA, were markedly augmented in trained animals as compared to control group. Thus, bradycardia induced by swim training program may involve the participation of adenosine A₃ receptors in rat right atria.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLQUIST, R.P. - A study of adrenergic receptors. **Am J Physiol**, **153**: 586-600, 1948.
- AHLUWALIA, A. & CELLEK, S. - Regulation of the cardiovascular system by non-adrenergic and non-cholinergic nerves. **Curr Opinion Neph Hypert**, **6**: 74-79, 1997.
- ALI, H.; CUNHA-MELO, J.R.; SAUL, W.F.; BEAVEN, M.A. Activation of phospholipase C via adenosine receptors provides synergistic signal for secretion in antigen-stimulated RBL-2H3 cells. Evidence for a novel adenosine receptor. **J Biol Chem**, **265**: 745-53, 1990.
- BARDENHEUER, H. & SCHRADER J. - Supply to-demand ration for oxygen determines formation of adenosine by the heart. **Am J Physiol**, **250**: H173-80, 1986.
- BARNES, K.L.; FERRARIO, C.M.; CONOMY, J.P. - Comparison of the hemodynamic changes produced by electrical stimulation of the area postrema and nucleus tractus solitarii in the dog. **Circ Res**, **45**: 136-143, 1979.
- BELARDINELLI, L.; SHRYOCK J.C.; SONG, Y.; WANG, D.; SRINIVAS, M. Ionic basis of the electrophysiological actions of adenosine on cardiomyocytes. **FASEB J**, **9**: 359-63, 1995.
- BEAULIEU, P. & LAMBERT, C. Peptidic regulation of heart rate and interactions with the autonomic nervous system. **Cardiovasc Res**, **37**: 578-85, 1998.
- BELLONI, F.L.; ELKIN, P.L.; GIANNOTTO, B. The mechanism of adenosine release from hypoxic rat liver cells. **Br J Pharmacol**, **85**: 441-6, 1985.
- BERNE, R.M. Cardiac nucleotide in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. **Am J Physiol**, **204**: 317-322, 1963.
- BERTHELSEN, S. & PETTINGER, W.A. - A functional basis for classification of alpha-adrenergic receptor. **Life Sci**, **21**: 595-606, 1977.
- BIRNBAUMER, L. - Receptor-to-effector signaling through G proteins: roles for beta gamma dimers as well as alpha subunits. **Cell**, **71**: 1069-72, 1992.

- BIRNBAUMER, L. - Transduction of receptor signal into modulation of effector activity by G proteins: the first 20 years or so. **Faseb J**, 4: 3178-88, 1990.
- BOLTER, C.P.; HUGHSON, R.L.; CRITZ, J.B. - Intrinsic rate and cholinergic sensitivity of isolated atria from trained and sedentary rats. **Proc Soc Exp Biol Med**, 144: 364-367, 1973.
- BONNER, T.I.; BUCKLEY, N.J.; YOUNG, A.C.; BRANN, M.R. - Identification of a family of muscarinic receptor genes. **Science**, 237: 527-531, 1987.
- BRACKETT, L.E. & DALY J.W.- Functional characterization of the A2b adenosine receptor in NIH 3T3 fibroblasts. **Biochem Pharmacol**, 47:801-14, 1994.
- BRISTOW, M.R.; GINSBURG, R.; UMANS, V.; FOWLER, M.; MINOBE, W.; RASMUSSEN, R.; ZERA, P.; MENLOVE, R.; SHAH, P.; JAMIESON, S.. - Beta 1- and beta 2- adrenergic receptor subpopulations in non-failing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1- receptor down-regulation in heart failure. **Circ Res** 59: 297-309, 1986.
- BRODDE, O.E. - Beta-adrenoceptors in cardiac disease. **Pharmacol Ther**, 60: 405-30, 1993.
- BUGAJSKI, J.; GADEK-MICHALSKA, A.; OLOWSKA, A.; BORYCZ, J.; GLOD, R.; BUGAJSKI, A. J. Adrenergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under basal and social stress. **J Physiol Pharmacol**, 46: 297-312, 1995.
- BUGAJSKI, J.; TURON, M.; GADEK-MICHALSKA, A.; BORYCZ, J.A., Catecholaminergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical activity. **J Physiol Pharmacol**, 42: 93-103, 1991.
- BURNSTOCK, G. Do some sympathetic neurons synthesize and release both noradrenaline and acetylcholine? **Prog Neurobiol**, 11: 205-22, 1978.

- BURNSTOCK, G. Noradrenaline and ATP: cotransmitters and neuromodulators. **J Physiol Pharmacol**, **46**: 365-84, 1995.
- BURNSTOCK, G. & MEGHJI, P. Distribution of P₁ and P₂ purinoceptors in the guinea-pig and frog heart. **Br J Pharmacol**, **16**: 433-440, 1981.
- CARRUTHERS, A.M. & FOZARD J.R. Adenosine A₃ receptors: two into one won't go. **Trends Pharmacol Sci**, **14**: 290-1, 1993.
- CASADO, V.; LUIS C.; CANELA, E.; FRANCO, R.; MALL, J. - The distribution of A₁ adenosine receptor and 5' nucleotidase in pig brain cortex sub-cellular fractions. **Neurochem Res**, **17**: 129-39, 1992.
- CAULFIELD, M.P. - Muscarinic receptors - characterization, coupling and function. **Pharmacol Ther**, **58**: 319-379, 1993.
- CHEN, Y.; CHANDLER, M.P.; DICARLO, S.E. Daily exercise and gender influence post-exercise cardiac autonomic responses in hypertensive rats. **Am J Physiol**, **272**: H1412-8, 1997.
- COHEN, L.; G., ZIEMANN, U.; CHEN, R. - Mechanisms, functional relevance, and modulation of plasticity in the human central nervous system. **Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl**, **51**: 174-82, 1999.
- COLINS, H.L. & DICARLO, S.E. - Daily exercise attenuates the sympathetic component of the arterial baroreflex control of heart rate. **Am J Physiol**, **273**: H2613-9, 1997.
- COLLO, G.; NORTH, R. A.; KAWASHIMA, E.; MERLO-PICH, E.; NEIDHART, S.; SURPRENANT, A.; BUELL, G. - Cloning of P₂_U and P₂_Y receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. **J Neurosci**, **16**: 2495-507, 1996.
- COUSINEAU, D.; FERGUSON, R.J.; DE CHAMPLAIN, J.; GAUTHIER, P.; COTE, P.; BOURASSA, M. Catecholamines in coronary inus diving exercise in man before and after training. **J Appl Physiol**, **43**: 801-6, 1977.

- DAAKA, Y.; LUTTRELL, L.M.; LEFKOWITZ, R.J. - Switching of the coupling of the beta 2- adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*, **390**: 88-91, 1997.
- DELAHUNTY, M.D.; STAFFORD, F.J.; YUAN, L.C.; SHAZ, D.; BONIFACINO, J.S. Uncleaved signals for glycosylphosphatidylinositol anchoring cause retention of precursor proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **268**: 12017-27, 1993.
- DI FRANCESCO, D. - Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu Rev Physiol*, **55**: 455-472, 1993.
- DIEPSTRA, G.; SHIELDS, R; GOLD, W.M. Parasympathetic innervation of the cervical trachealis muscle in living dogs. *J Appl Physiol*, **53**: 617-25, 1982.
- DIXON, A.K.; GUBITZ, A.K.; SIRINATHSINGHI, D. J.; RICHARDSON, P.J.; FREEMAN, T.C. - Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br J Pharmacol*, **118**: 1461-8, 1996.
- DOCHERTY, J.R. - Subtypes of functional alpha 1- and alpha 2- adrenoceptors. *Eur J Pharmacol*, **361**: 1-15, 1998.
- DORJE, F.; WESS, J.; LAMBRECHT, G.; TACKE, R.; MUTSCHLER, E.; BRANN, M.R. - Antagonist binding profiles of five cloned human muscarinic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther*, **256**: 727-733, 1991.
- DOWD, E.; MCQUEEN, D.S.; CHESSELL, I.P.; HUMPHREY, P.P. - Adenosine A1 receptor-mediated excitation of nociceptive afferents innervating the normal and arthritic rat knee joint. *R J Pharmacol*, **125**: 1267-71, 1998.
- DRURY, A.W. & SZENT-GYORGYI, A. The physiological activity of adenosine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* **68**, 213-237, 1929.
- ENGELS, R.C. & JONES, J.B. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolic assays involving the use of NAD⁺ in alkaline hydrazine buffers improved conditions for assays of L-glutamate, L-lactate and other metabolites. *Anal Biochem*, **88**: 475-84, 1978.

- EGLEN, R. M.; HEDGE, S. S.; WATSON, N. - Muscarinic receptor and smooth muscle function. **Pharmacol Rev**, **48**: 532-556, 1996.
- EMORINE, L.; BLIN, N.; STROBERG, A.D. - The human β_3 -adrenoceptor: the search for a physiological function. **Trends Pharmacol Sci**, **15**: 3-7, 1994.
- EMORINE, L.; MARULLO, S.; BRIEND-SUTREN, M.M.; PATEY, G.; TATE, K.; DELAVIER-KLUTCHKO, C.; STROBERG, A.D. - Molecular characterization of the human β_3 -adrenergic receptor. **Science**, **245**: 1118-1121, 1989.
- ENDO, M.; MARUYAMA, M.; TAIRA, N. - Modification by islet-activating protein of direct and indirect inhibitory actions of adenosine on rat atrial contraction in relation to cyclic nucleotide metabolism. **J Cardiovasc Pharmacol**, **5**: 131-42, 1983.
- EVONIUK, G.E.; VON BORSTEL, R.W.; WURTMAN R.J.- Adenosine affects sympathetic neurotransmission at multiple sites in vivo. **J Pharmacol Exp Ther**, **236**: 350-5, 1986.
- EXTON, J. H. - Role of calcium and phosphoinositides in the actions of certain hormones and neurotransmitters. **J Clin Invest**, **75**: 1753-7, 1985.
- FEOKTISTOV, I. & BIAGGIONI, I.- Adenosine A2B receptors. **Pharmacol Rev**, **49**: 381-402, 1997.
- FLEMING, W.W.; Supersensitivity of the denervated rat diaphragm to potassium: a comparison with supersensitivity in other tissues. **J Pharmacol Exp Ther**. **176**: 160-6, 1971.
- FLEMING, W.W.; URQUILLA, P.R.; TAYLOR D.A.; WESTFALL, D.P. Electrophysiological correlations with postjunctional supersensitivity. **Fed Proc**, **34**: 1981-4, 1975.
- FLEMING, W.W. Mechanisms of adaptive supersensitivity in smooth muscles vs cardiac muscle: a brief review. **Clin Exp Pharmacol**, **1989**: 447-50, 1989.

- FORD, A.P.; WILLIAMS, T.J.; BLUE, D.R.; CLARKE, D.E. - Alpha 1-adrenoceptor classification sharpening. Occam's razor. **Trends Pharmacol Sci**, **15**:167-70, 1994.
- FREDHOLM, B.B. & DUNWIDDIE, T.V.- How does adenosine inhibit transmitter release? **Trends Pharmacol Sci**, **9**: 130-4, 1988.
- FREDHOLM, B.B.; ABBRACCHIO, M.P.; BURNSTOCK, G.; DUBYAK, G.R.; HARDEN, T.K.; JACOBSON, K.A.; SCHWABE, U.; WILLIAMS, M. - Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors. **Trends Pharmacol Sci**, **18**: 79-82, 1997.
- FREDHOLM, B.B.; ZHANG, Y.; VAN DER PLOEG, I. - Adenosine A2A receptors mediate the inhibitory effects of adenosine on formyl-Met-Leu-Phe-stimulated respiratory burst in neutrophil leucocytes. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, **354**: 262-7, 1996.
- FURCHGOTT, R.F. - The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. **Ann Rev Pharmacol Toxicol**, **24**: 175-197, 1984.
- GARDNER, N.M. & BROADLEY, K.J. - Analysis of the atypical characteristics of adenosine receptors mediating negative inotropic and chronotropic responses of guinea-pig isolated atria and papillary muscles. **Br J Pharmacol**, **127**: 1619-26, 1999.
- GAUTHIER, C.; TAVERNIER, G.; CHARPENTIER, F.; LANGIN, D.; LE MAREC, H. - Functional beta 3-adrenoceptor in the human heart. **J Clin Invest**, **98**: 556-562, 1996.
- GERWINS, P. & FREDHOLM, B.B. Stimulation of adenosine A1 receptors and bradykinin receptors, which act via different G proteins, synergistically raises inositol 1,4,5 triphosphate and intracellular free calcium in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, **89**: 7330-4, 1992.
- GILMAN, A.G. G proteins: transducer of receptor-generated signal. **Annu Rev Biochem**, **56**: 615-49, 1987.

- GOBATTO, C.M.; FERRARI, F.; SIBUYA, C.Y.; KOKOBUN, E.; MELLO, M.A.R. - Evolução das curvas de lactato obtidas em teste de cargas progressivas em ratos desnutridos e recuperados submetidos ao treinamento físico. Resumo apresentado na **44ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso à Ciência**, pp 18, 1992.
- GOYAL, R.K. - Identification, localization and classification of muscarinic receptor subtypes in the gut. **Life Sci**, **43**: 2209-2220, 1988.
- GREEN, R.W. & HAAS, H.L. The electrophysiology of adenosine in the mammalian central nervous system. **Prog Neurobiol**, **36**: 329-41, 1991.
- GREGOIRE, J.; TUCK, S.; YAMAMOTO, Y.; HUGHSON, R.L. Heart rate variability at rest and exercise: influence of age, gender and physical training. **Can J Appl Physiol**, **21**: 455-70, 1996.
- GUYTON, A. C. & HALL J. E. **Fisiologia Médica**, 6a. edição, pp 199-232, Interamericana, Rio de Janeiro, 1996.
- HADCOCK, J.R.; WANG, H.Y.; MALON, C.C. Agonist-induced destabilization of beta-adrenergic receptor mRNA. Attenuation of glucocorticoid-induced up-regulation of beta-adrenergic receptors. **J Biol Chem**, **264**: 19928-33, 1989.
- HAMMER, R. & GIACHETTI, A - Muscarinic receptor subtypes: M₁ and M₂. Biochemical and functional characterization. **Life Sci**, **31**: 2991-2998, 1982.
- HAMMOND, H.K.; WHITE, F.C.; BRUNTON, L.L.; LONGHURST, J.C. Association of decreased myocardial beta-receptors to isoproterenol and exercise in pigs following chronic dynamic exercise. **Cir Res**, **60**: 720-6, 1987.
- HAN, C.; ABEL, P.W.; MINNEMAN, K.P. - Alpha 1-adrenoceptor subtypes linked to different mechanisms for increasing intracellular Ca²⁺ in smooth muscle. **Nature** **329**: 333-335, 1987.

- HAN, C.; LI, J.; MINNEMAN, K.P. - Subtypes of alpha 1-adrenoceptors in rat blood vessels. **Eur J Pharmacol**, **190**: 97-104, 1990.
- HASSAN, M.O. - The role of the autonomic nervous system in exercise bradycardia in rats. **East Afr Med J**, **68**: 130-3, 1991.
- HIEBLE, J. P.; BONDINELL, W. E.; RUFFOLO, R. R. Jr. - Alpha and beta-adrenoceptor: from the gene to the clinic. 1. Molecular biology and adrenoceptor subclassification. **J Med Chem**, **38**: 3415-44, 1995.
- HOKFELT, T.; KELLERTH, J.O.; LJUNGDAHLA; NILSSON, G.; NYGARDS, A.; PERNOW, B. Immunohistochemical localization of substance P in the central and peripheral nervous system. **Monograph**, pp299-311, 1977.
- HORI, M. & KITAKAZE, M. - Adenosine, the heart, and coronary circulation. **Hypertension**, **18**: 565-74, 1991.
- HUGHES, I.E. & SMITH, J.A. The stability of noradrenaline in physiological saline solutions. **J Pharm Pharmacol**, **30**: 124-6, 1978.
- HUGHSON, R.L.; SUTTON, J.R.; FITZGERALD, J.D.; JONES, N.L. - Reduction of intrinsic sinoatrial frequency and norepinephrine response of the exercised rat. **Can J Physiol Pharmacol**, **55**: 813-20, 1977.
- HUHTANIEMI, I.T. Carbohydrate ingestion during prolonged running exercise results an increase of serum cortisol and decrease of gonadotrophins. **Acta Physiol Scand**, **141**: 373-7, 1991.
- IWAMOTO, T.; UMEMURA, S.; TOYA, Y.; UCHIBORI, T.; KOGI K.; TAKAGI, N.; ISHII, M. - Identification of adenosine A2 receptor-cAMP system in human aortic endothelial cells **Biochem Biophys Res Commun**, **199**: 905-10, 1994.
- JACOBSON, K.A.; SIDDIQI, S.M.; OLAH, M.E.; JI, X.D.; MELMAN, N.; BELLAMKONDA, K.; MESHULAM, Y.; STILES, G.L.; KIM, H.O. Structure-activity relationships of 9-alkyladenine and ribose-modified adenosine derivatives at rat A₃ adenosine receptors. **J Med Chem**, **38**: 720-35, 1995.

- JACOBSON, A. K. - Adenosine A₃ receptors: novel ligands and paradoxical effects **Trends Pharmacol Sci**, **19**: 184-191, 1998.
- JAMES, T. N. - The chronotropic action of ATP and related compounds studied by direct perfusion of the sinus node. **J Pharmacol Exp Ther**, **149**: 233-247, 1965.
- JANSKUL, C. - Effect of swimming on vascular reactivity to phenylephrine and KC1 in male rats. **Br J Pharmacol**, **115**: 587-594, 1995.
- KAKUYAMA, M.; VALLANCE, P.; AHLUWALIA, A. - Endothelium-dependent sensory NANC vasodilatation: involvement of ATP, CGRP and a possible NO store. **Br J Pharmacol**, **123**: 310-316, 1998.
- KAUMANN, A. J. & MOLENAAR P. - Modulation of human cardiac function through 4 beta- adrenoceptor population **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, **355**: 667-681, 1997.
- KAUMANN, A. J.; PREITNER, F.; SARSERO, D.; MOLENAAR, P.; REVELLI, J. P.; GIACOBINO, J. P. (-) - C-GP 12177 causes cardiostimulation and binds to cardiac putative beta 4-adrenoceptors in the wild-type and beta 3-adrenoceptor knockout mice. **Mol Pharmacol**, **53**: 670-675, 1998.
- KENT, K. M.; EPSTEIN, S. E.; COOPER, T.; JACOBWITZ, D. M. - Cholinergic innervation of the canine and human ventricular conducting system, anatomic and electrophysiologic correlation. **Circulation**, **58**: 948-955, 1974.
- KHAK, B.S & KENNEDY, C. Adenosine and ATP: progress in their receptors' structure and function. **Trends Pharmacol Sci**, **19**: 39-41, 1998.
- KRIEGER, E. M.; BRUM, P. C.; NEGRAO, C. E. - Role of arterial baroreceptor function on cardiovascular adjustments to acute and chronic dynamic exercise. **Biol Res**, **31**: 273-279, 1998.

- KROLL, K.; DECKING, V. K.; DREIKOM, K.; SCHARADER, J. Rapid turnover of the AMP-adenosine metabolic cycle in the guinea pig heart. **Circ Res**, 73: 846-856, 1993.
- LANDS, A.M.; ARNOLD, A.; McAULIFF, J. P.; LUDUENA, F. P.; BROWN, T.G. Jr. - Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. **Nature**, 214: 597-598, 1967.
- LANGER, S. Z. - Presynaptic regulation of catecholamine release. **Biochem. Pharmacol**, 23: 1793-1800, 1974.
- LEE, T. P. & REED, C. E.; Effects of steroids on the regulation of the levels of cyclic AMP in human lymphocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, 78: 998-1004, 1977.
- LEFKOWITZ, R. J. - G Protein-coupled receptors III. New roles for receptor kinases and β -arrestin in receptor signaling and desensitization. **J Biol Chem**, 243: 18677-18680, 1998.
- LEHMANN, M.; KEUL, J. HUBER G.; DA PRADA, M. Plasma catecholamines in trained and untrained volunteers during graduated exercise. **Int J Sports Med**, 2: 143-7, 1981.
- LEVY, M. N. & SCHWARTZ P.J., ed. - Vagal Control of the Heart: Experimental Basis and Clinical implications. N.Y. **Futura Publishing CO.**, Armonk, 1994.
- LIANG, B. T. & HALTIWANGER, B. - Adenosine A2a and A2b receptors in cultured fetal chick heart cells. High- and low-affinity coupling to stimulation of myocyte contractility and cAMP accumulation. **Circ Res**, 76: 242-251, 1995.
- LIN, Y.C. & HORVATH, S.M., - Autonomic nervous control of cardiac frequency in the exercise trained rats. **J.Appl Physiol**, 33: 796-799, 1972.
- LINDSEY, C.J. - Central bradykinin receptor in the SHR and blood pressure. **Progress in Hypertension**, 3: 109-125, 1995.

- LUNDBERG, J.M. Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. **Pharmacol Rev**, **48**: 113-78, 1996.
- LUTGEMEIER, I.; LUFT, F.C.; UNGER, T.; GANTEM, U.; LANG R.E.; GLESS, K.H.; GANTEM, D. Blood pressure, eletrolyte and adrenal responses in swim-trained hypertensive rats. **J Hypertens**, **5**: 241-247, 1987.
- MAEDA, A.; KUBO, T.; MISHINA, M.; NUMA, S. - Tissue distribution of mRNAs encoding muscarinic acetylcholine receptors subtypes. **FEBS Lett**, **239**: 339-342, 1988.
- MAKI, T.; NAVERI, H.; LEINONE H.; SOUIJARVI, A.; LEWKO, HARKONEN, M.; KONTULA, K. Effect of propranolol and pindolol on the up-regulation of lymphocytic beta-adrenoceptors during acute submaximal physical exercise. A placed controlled double-blind study. **J Cardiovasc Pharmacol**, **15**: 544-551, 1990.
- MANO, K.; AKBARZADEH, A. TOWNLEY, R. G. Effect of hydrocortisone on beta-adrenergic receptors in lung membranes. **Life Sci**, **25**: 1925-30, 1979.
- MANTELLI, L.; AMERINI, S.; FILIPPI, S.; LEDDA, F. Blockade of adenosine receptors unmasks a stimulatory effect of ATP on cardiac contractility. **Br J Pharmacol**, **109**: 1268-71, 1993.
- MARQUARDT, D.L.; WALKER, L.L.; HEINEMANN, S. - Cloning of two adenosine receptor subtypes from mouse bone marrow-derived mast cells. **J Immunol**, **152**: 4508-4515, 1994.
- MARTIN, P.L - Evidence that adenosine receptors in the dog left atrium are not of the typical A1 or A2 adenosine receptor subtypes. **Eur J Pharmacol**, **214**: 199-205, 1992.
- McGRATH, J. & WILSON V. - Alpha adrenoceptor subclassification by classical and response-related methods: same function, different answer. **Trends Pharmacol Sci**, **9**: 162-165, 1988.

- MEREDITH, I.T.; FRIBERG, P.; JENNINGS, G.L.; DEWAR, E.M.; FAZIO, V. A.; LAMBERT, G.W.; ESLER, M.D. Exercise training lowers resting renal but not cardiac sympathetic activity in humans. **Hypertension**, **18**: 575-582, 1991.
- MEYERHOF, W.; PAUST, H.J.; SCHRONROCK, C. RICHTER, D. Cloning of a cDNA encoding a novel putative G-protein-coupled receptor expressed in specific rat brain regions. **DNA Cell Biol**, **10**: 689-694, 1991.
- MOGUL, D.J. ADAMS, M. E.; FOX, A. P. - Differential activation of adenosine receptors decreases N-type but potentiates P-type Ca^{2+} current in hippocampal CA3 neurons. **Neuron**, **10**: 327-334, 1993.
- MOLENAAR P.; SARSERO, D.; KAUMANN, A.J. Proposal for the interaction of non-conventional partial agonist and catecholamines with the 'putative beta 4-adrenoceptor in mamalian heart. **Clin Ex Pharmacol Physiol**, **24**: 647-656, 1997.
- MONCADA, S.; PALMER R.M.; HIGGS, E.A. - Nitric oxide: physiology pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev**, **43**:109-142, 1991.
- MOURA, M.J & DE MORAES, S. Forced swim stress supersensitivity of the isolated rat pacemaker to the chronotropic isoprenaline and the role of corticosterone. **Gen Pharmacol**, **25**:1341-7, 1994.
- MUNSHI, R.; PANG, I, H.; STERNWEIS, P.C.; LINDEN, J. A1 adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins $Gi1$, $Gi2$, $G0$. **J Biol Chem**, **266**: 22285-22289, 1991.
- MUSCH, IT.; HAIDET, G.C.; ORDWAY, G.A.; LONGHURST J.C.; MITCHELL J.H. Training effects on regional blood flow response to maximal exercise in fox hounds. **J Appl Physiol**, **62**: 1724-1732, 1997.
- NISHIMURA, S.; MOHRI, M.; OKADA, Y.; MORI, M. - Excitatory and inhibitory effects of adenosine on the neurotransmission in the hippocampal slices of guinea pig. **Brain Res**, **525**: 165-169, 1990.

- NOMA, K; RUPP, H.; JACOB, R. Subcutaneous and long term of swimming training on blood pressure in young and old spontaneously hypertensive rats. **Cardiovasc Res**, **21**: 871-877, 1987.
- O'LEARY, D.S. & SEAMANS, D.P. Effect of exercise on autonomic mechanisms of baroreflex control of heart rate. **J Appl Physiol**, **75**:2251-2257, 1993.
- OLAH, M.E.; REN, H.; STILES, G.L. Adenosine receptors: protein and gene structure. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, **329**:135-150, 1995.
- ONGINI E. & FREDHOLM B. B. - Pharmacology of adenosine A2A receptors. **Trends Pharmacol Sci**, **17**: 364-372, 1996.
- OVERTON, J.M.; JOYNER, M.J.; TIPTON C.M. - Reductions in blood pressure after acute exercise by hypertensive rats. **J Appl Physiol**, **64**: 748-752, 1988.
- PALMER, R.M.J.; REES 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 Comm**, **153**: 1251-1256, 1988.
- PEAKMAN, M.C. & HILL, S.J. - Adenosine A1 receptor-mediated inhibition of cyclic AMP accumulation in type-2 but not type-1 rat astrocytes. **Eur J Pharmacol**, **306**: 281-289, 1996.
- PEAKMAN, M.C. & HILL, S.J. - Adenosine A2B-receptor-mediated cyclic AMP accumulation in primary rat astrocytes. **Br J Pharmacol**, **111**:191-198, 1994.
- PELLEG A.; MITAMURA, H.; MICHELSON, E.L.; DREIFUS, L.S. Evidence against prostaglandin mediation of the differential electrophysiologic effects of ATP versus adenosine in the canine heart. **J Cardiovasc Pharmacol**, **8**: 534-8, 1986.
- PETERFREUND, R.A.; MACCOLLIN M.; GUSELLA, J.; FINK, J.S. Characterization and expression of the human A2a adenosine receptor gene. **J Neurochem**, **66**: 362-368, 1996.

- PETERSON, G.L.; HERRON, G.S.; YAMAKI, M.; FULLERTON, D.S.; SCHIMERLIK, M.I. - Purification of the muscarinic acetylcholine receptor from porcine atria. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.**, **81**:4993-4997, 1984.
- PORZIG, H.; GUTKNECHT, R.; KOSTOVA, G.; THALMEIER, K. - G-protein-coupled receptors in normal human erythroid progenitor cells. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, **353**: 11-20, 1995.
- POST, S.R.; HAMMOND, H.K.; INSEL, P.A. - Beta-Adrenergic receptors and receptor signaling in heart failure. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, **39**: 343-360, 1999.
- PRENTICE, D.J. & HOURANI, S.M. - Activation of multiple sites by adenosine analogues in the rat isolated aorta. **Br J Pharmacol**, **118**: 1509-1517, 1996.
- PRIVITERA, P.J.; THIODEAUX, H.; YATES, P. - Rostral ventrolateral medulla as a site for the central hypertensive action of kinins. **Hypertension**, **23**: 52-57, 1994.
- PUFFINBARGER, N.K.; HANSEN, K.R.; RESTA, R.; LAURENT, A.B.; KNUDSEN, T.B.; MADARA, J.L.; THOMPSON, L.F. - Production and characterization of multiple antigenic peptide antibodies to the adenosine A2b receptor. **Mol Pharmacol**, **47**: 1126-1132, 1995.
- QI, A. D. & KWAN, Y. W. modulation by extracellular ATP of L-type calcium channels in guinea-pig single sinoatrial nodal cell. **Br J Pharmacol**, **119**: 1454-62, 1996.
- RAYMOND, J.R.; HNATOWICH, M.; LEFKOWIT, R.J.; CARON, M.G. - Adrenergic receptors. Models for regulation of signal transduction process. **Hypertension**, **15**: 119-131, 1990.
- REGAN, J.W.; KOBILKA, T.S.; YANG-FENG, T.L., CARON, M.G.; LEFKOWITZ R.J.; KOBILKA, B.K. Cloning and expression of a human kidney cDNA for an α_2 - adrenergic receptor subtype. **Proc Natl Acad Sci USA**, **85**: 1-5, 1988.

- RICHARDT, G.; WAAS, W.; KRANZHOFFER Adenosine inhibits exocytotic release of endogenous noradrenaline in rat heart: A protective mechanism in early myocardial ischaemia **Circ. Res.** **61**: 117-123, 1987.
- RIVKEES S.A & REPPERT, S.W. RFLA9 encodes an A2b-adenosine receptors. **Mol Endocrinol**, **6**: 1598-1604, 1992.
- RODBELL, M. The role of hormone receptor and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. **Nature**, **284**:17-22, 1980.
- SALVATORE, C. A.; JACOBSON, M. A.; TAYLOR, H. E.; LINDEN, J.; JOHNSON, R. G. Molecular cloning and characterization of the human A3 adenosine receptor. **Proc natl Acad Sci USA**, **90**: 10365-10369, 1993.
- SANTOS, L. A.; KOKOBUN, E.; MELLO, M. A. R.; SIBUYA, C. A.; STEVANATO, E.; LUCIANO, E.; AZEVEDO, J. R. M.; GOBATO, C. A. Determinação do "steady-state" máximo de lactato em ratos submetidos a natação. **Reunião Anual da Fesbe**, **Anais**: 259-260, 1998
- SAWYNOK, J.; ZARRINDAST, M. R.; REID A. R.; DOAK, G. J. - Adenosine A3 receptor activation produces nociceptive behaviour and edema by release of histamine and 5-hydroxytryptamine. **Eur J Pharmacol**, **333**: 1-7, 1997.
- SCARPACE, P. J.; LOWENTHAL, D. T.; TUMER, N. - Influence of exercise and age on myocardial beta-adrenergic receptor properties. **Exp Gerontol**, **27**: 169-177, 1992.
- SCHAEFER, M.E.; ALBERT, J.A.; ADAMS, H.R.; LAUGHLIN, M.H. - Adrenergic responsiveness and intrinsic sinoatrial automaticity of exercise-trained rats. **Med Sci Sports Exerc**, **24**: 887-894, 1992.
- SCHARADER, J.; HADDY, F. J.; GERLACH, E - Release of adenosine, inosine and hypoxanthine from the isolated guinea pig heart during hypoxia, flow-autoregulation and reactive hyperemia. **Pflugers Arch**, **369**:1-6, 1977.

- SCHEUER, J. & TIPTON, C. M. - Cardiovascular adaptations to physical training. *Ann Rev Physiol*, **39**: 221-225, 1977.
- SCHIFFMAN S. N.; LIBERT, F.; VASSART, G.; VANDERHAEGHEN, J. J. Distribution of adenosine A2 receptor mRNA in the human brain *Neurosci Lett*, **130**:177-181, 1991.
- SCISLO, T. J.; DICARLO, S E.; COLLINS, H. L. Daily spontaneous running did not alter vagal afferent reactivity. *Am J Physiol*, **265**: H1564-H1570, 1993.
- SEALS, D.R. & REILING, M.J. Effect of regular exercise on 24-hour arterial blood pressure in older hypertensive humans. *Hypertension*, **18**: 593-92, 1991
- SEBASTIÃO, A.M. & RIBEIRO, J.A. Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Trend Pharmacol Sci*, **21**: 341-46, 2000.
- SHEPHERD, R.K.; LINDEN, J.; DULING, B.R. Adenosine-induced vasoconstriction in vivo. Role of the mast cell and A₃ adenosine receptor. *Circ Res*, **78**: 627-34, 1996.
- SHI, X.; STEVENS, G.H.; FORESMAN, B.H.; STERN, S.A.; RAVEN, P.B. Autonomic nervous system control of the heart: endurance exercise training. *Med Sci Sports Exerc*, **27**: 1406-13, 1995.
- SHRYOCK, J. C. & BELARDINELLI, L. Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am J Cardiol*, **79**: 2-10, 1997.
- STEELE, P.A. & CHOATE, J.K. Innervation of the pacemaker in guinea-pig sinoatrial node. *J Auton Nerv Syst*, **47**: 177-87, 1994.
- SIBLEY, D. R.; STRASSER, R. H.; BENOVIÉ, 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 USA*, **83**: 9408-9412, 1986.

- SMITH, M. L.; HUDSON, D. L.; GRAITZER, H. M.; RAVEN, P. B. - Exercise training bradycardia: the role of autonomic balance. **Med Sci Sports Exerc**, **21**: 40-44, 1989.
- SNYDER, S. H. & SKLAR, P. - Behavioral and molecular actions of caffeine: focus on adenosine. **J Psychiatr Res**, **18**: 91-106, 1984.
- STARKE, K. - Presynaptic receptor of central catecholamine neurones. **Postgrad Med J**, **57** Suppl. 1:30-35, 1981.
- STYLLES, G. L.; CARON, M. G.; LEFKOWITZ, R. J. - Beta-adrenergic receptors: biochemical mechanisms of physiological regulation. **Physiol Rev**, **64**: 661-743, 1984.
- SWAIN, J. L.; HINES, J. J.; SABINA, R. L.; HOLMES, E. W. Accelerated repletion of ATP and GTP pools in postischaemic canine myocardium using a precursor of purine synthesis. **Cir Res**, **51**: 102-105, 1982.
- TABATA, I.; OGITA, F.; MIYACHI, M.; SHIBAYAMA, H. Effect of low blood glucose on plasma CRF, ACTH, and cortisol during prolonged physical exercise. **J Appl Physiol**, **71**: 1807-12, 1991.
- TAWFIK-SCHLIEPER, H.; KLOTZ, K. N.; KREYE, V. A.; SCHWABE, U. - Characterization of the K(+) -channel coupled adenosine receptor in guinea pig atria **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, **340**: 684-688, 1989.
- TIPTON, C. M. - Training and bradycardia in rats. **Am J Physiol**, **209**: 1089-1094, 1965.
- TRUSSEL, L. O. & JACKSON, M. B. Adenosine-activated potassium conductance in cultured striatal neurons. **Proc Natl Acad Sci USA**, **82**: 4857-61, 1985.
- TSENG, Y.Y.; TUCKER, M.A.; KASHIWAI, K.T.; WASCHEK, J.A.; PADBURY, J.F. Regulation of beta 1-adrenoceptors by glucocorticoids and thyroid hormones in fetal sheep. **Eur J Pharmacol**, **28**: 353-9, 1995.

- TUOHIMAA, P.; BLAUER, M.; PASANEN, S.; PASSINEN, S.; PEKKI, A; PUNNONE, R.; SYVA, H.; VALKILA, J.; WALLEN, M.; VALIAHO, J.; ZHUANG, Y.H.; YLIKOMI, T. Mechanisms of action of sex steroid hormones: basic concepts and clinical correlations. **Maturitas**, **23**: S3-12, 1996.
- VASANKARI, T.J.; KUJALA, U.M.; VILJANEN, T.T.; HUHTANIEMI, I.T. Carbohydrate ingestion during prolonged running exercise results in an increase of serum cortisol and decrease of gonadotrophins. **Acta Physiol Scand**, **141**: 373-7, 1991.
- VAN ROSSUM, J. M. - Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of the drug parameters. **Arch Inter Pharmacodyn Ther**, **143**: 229-330, 1963.
- VOET, D. & VOET, J.G. Biochemistry Textbook **Second Edition**: pp. 428, 1995.
- WAKADE, A. R. & WAKADE, T. D. - Inhibition of noradrenaline release by adenosine. **J Physiol**, **282**: 35-49, 1978.
- WALDO, G. L.; NORTHYP, J. K.; PERKINS, J. P.; HARDEN, T. K. Characterization of an altered membrane from the beta-adrenergic receptor produced during agonist-induced desensitization **J Biol Chem**, **258**: 13900-13908, 1983.
- WANG, H. Y.; HADCOCK, J. R.; MALBON, C. C. Beta-adrenergic receptor regulation. New insights on biochemical and molecular mechanisms. **Winter**, **1**: 13-32, 1990-91.
- WEIHE, E. & REINECKE, M. Peptidergic innervation of the mammalian sinus nodes: vasoactive intestinal polypeptide, neurotensin, substance P. **Neurosci Lett**, **4**: 283-8, 1981.
- WEST, G. A. & BELARDINELLI, L., - Sinus slowing and pacemaker shift caused by adenosine in rabbit AS node. **Pflugers Arch**, **403**: 66-74, 1985.

- WYATT, L.H.; CHUCK, L.; RABINOWITZ, B.; TYBERG, J.V.; PARMLEY, W.W.
Enhanced cardiac response to catecholamines in physically trained cats. *Am J Physiol*, **234**: H608-H613, 1978.
- XIAO, R. P.; AVDONIN, P.; ZHOU, Y. Y.; CHENG, H.; AKHTER, S. A.;
ESCHENHAGEN, T.; LEFKOWITZ, R. J.; KOCH, W. J.; LAKATTA, E. G. -
Coupling of beta 2-adrenoceptor to G: proteins and its physiological relevance in
murine cardiac myocytes. *Circ Res*, **84**: 43-52, 1999.
- XU, J.; GAO, F.; MA, X.L.; GAO, E.; FRIEDMAN, E.; SNYDER D.L.; HORWITZ, J.;
PELLEG, A. Effect of aging on the negative chronotropic and anti-beta-adrenergic
actions of adenosine in the rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol*, **34**: 904-12, 1999.
- ZHOU, Q. Y.; LI, C.; OTAH, M. E.; JOHNSON, R. A.; STILES G. L.; CIVELLI, O.
Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine
receptor. *Proc Natl Acad Sci US*, **89**: 7432-6, 1992.