

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Marilia Francisco Moreira

SENSIBILIDADE ADRENÉRGICA DE ÁTRIOS DIREITOS  
ISOLADOS DE RATOS NORMO OU HIPERLIPIDÊMICOS  
SEDENTÁRIOS OU SUBMETIDOS A NATAÇÃO

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Dora Maria Grassi-Kassisse

Campinas

2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

**M813s**

***Moreira, Marília Francisco***

Sensibilidade adrenérgica de átrios direitos isolados de ratos normo ou hiperlipidêmicos sedentários ou submetidos à natação / Marília Francisco Moreira. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

***Orientadora: Dora Maria Grassi-Kassisse.***

***Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.***

1. Beta adrenoreceptores. 2. Hiperlipidemia. 3. Isoproterenol. 4. Noradrenalina. 5. Sistema nervoso simpático. I. Grassi-Kassisse, Dora Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de

**Título em inglês:** Right atria sensitivity from normo or hiperlipidemic rats, sedentary or submitted to swimming sessions.

**Palavras-chave em inglês:** Beta adrenoreceptors; Hiperlipidemia; Isoproterenol; Noradrenaline; Sympatetic nervous system.

**Área de concentração:** Fisiologia.

**Titulação:** Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Dora Maria Grassi-Kassisse, Regina Célia Spadari Bratfish, Iraídes Nunes Santos.

**Data da defesa:** 22/12/2005.

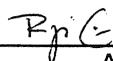
Data da Defesa: 22/12/2005

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Dora Maria Grassi-Kassise  
(Orientadora)

  
Assinatura

Profa. Dra. Regina Célia Spadari-Bratfisch

  
Assinatura

Profa. Dra. Iraídes Nunes dos Santos

  
Assinatura

Profa. Dra. Elisângela Farias Silva

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. José Roberto Moreira de Azevedo

\_\_\_\_\_  
Assinatura

## **DEDICO**

Aos meus pais, Jorge e Sueli, que acreditaram em mim, mesmo quando eu parei de acreditar, que seguraram minha mão e me guiaram até onde eu cheguei.

A minha irmã, que sempre esteve ao meu lado, apoiando meus objetivos.

A minha avó e minha tia Célia que além do enorme apoio e incentivo cuidaram muito bem dos meus pimpolhos durante meus árduos anos de estudo.

Ao meu marido, que apesar de contrariado por ter sido “abandonado” durante estes anos, me deu todo apoio e colo nos mais difíceis momentos.

Aos meus filhos Leonardo e Júlia, que abrem a cada dia meus olhos para a luz da vida e são a razão da minha existência.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar saúde e paciência para completar as minhas tarefas de mãe, esposa e estudante.

Ao meu pai e minha mãe, que são meus exemplos de vida, meus exemplos de pais, de profissionais, de intelectuais e principalmente meu exemplo de amizade e confiança. Eu amo vocês.

Ao meu professor da graduação, Serginho que me fez acreditar que eu conseguiria realizar meu sonho de me tornar mestre pela UNICAMP.

A professora Elenice, que me apresentou a Dora e que começou tudo.

A professora Dora, que acreditou no meu potencial desde o início, e que como professora, pessoa, mãe e amiga é fantástica. Com certeza sempre lembrarei de você com muito carinho.

A professora Regina e a professora Dora pela recepção, pois acredito que não haja outro laboratório para trabalhar com tamanho clima de amizade, companheirismo e cooperativismo.

Ao professor Miguel, que além de ser um professor brilhante, é uma pessoa sensacional.

Ao Alê (Miotto) que foi meu tutor, que me ensinou tudo o que eu sei hoje, e o que não me ensinou, me mostrou o caminho para que eu aprendesse. E

que além de professor, foi meu amigo, num dos momentos mais difíceis da minha vida. Obrigado

Ao Héder, que me ajudou em tudo, nos experimentos, a carregar os ratos quando eu estava grávida, a apresentar os congressos quando a Júlia estava pequena e que encheu de alegria as minhas madrugadas experimentais.

A Edla, minha grande amiga pra rir e chorar.

A todos os meus colegas de laboratório, a Elis, Ju, Elaine, Márcia, Edgar, Karina, Maria, Marcelinho e Danilo, que me deram muito carinho e muita força.

## SUMÁRIO

	PÁGINAS
Resumo	viii
Abstract	x
Lista de abreviações	xii
Lista de Tabelas	xiv
Lista de Figuras	xv
I – Introdução	1
II – Objetivos	14
III – Material e Métodos	15
IV – Resultados	20
V – Discussão	31
VI – Referências Bibliográficas	44

## Resumo

Lipídios provenientes da dieta têm um importante efeito no sistema de sinalização transmembrana presente nas células cardíacas. Um vez ingeridos em excesso ocorre aumento no conteúdo de colesterol na membrana da célula cardíaca o qual afeta a atividade da adenosina ciclase ligada ao receptor  $\beta$  e conseqüentemente as respostas cronotrópicas e inotrópicas às catecolaminas causando arritmogênese. O objetivo desta tese foi analisar os efeitos de sessões de natação com o objetivo de prevenir os efeitos de dieta hiperlipídica sobre a sensibilidade de átrios direitos isolados a agonistas adrenérgicos. Ratos Wistar machos adultos foram usados após uma semana de adaptação em salas climatizadas  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  e com ciclo claro-escuro de 12 h (luzes acendendo as 6:30 da manhã). Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios para utilização de animais em pesquisa e educação e adotado pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Os animais foram randomicamente divididos em dois grupos, sedentários (S) e que praticaram exercício (T). O exercício constou de sessões de natação na frequência de 5 dias na semana com 50 minutos de duração durante 20 dias (4x5 dias) em tanque de água com temperatura de  $34 \pm 2^\circ\text{C}$ . Estes dois grupos foram ainda subdivididos em 2 subgrupos, o que recebia ração padrão (N) e outro que recebia a dieta rica em lipídios (H). O átrio direito foi isolado e curvas cumulativas dose-resposta a noradrenalina (NA) e isoprenalina (ISO) foram obtidas, na ausência ou presença de inibição da recaptação neuronal e extraneuronal. Não houve alteração na frequência cardíaca basal ou resposta máxima aos agonistas nos átrios isolados dos diferentes grupos experimentais (NS, NT, HS e HT). O programa de exercício físico proposto induziu em ratos que ingeriram dieta padrão uma subsensibilidade à noradrenalina e uma supersensibilidade a isoprenalina. Os átrios

direitos isolados de ratos sedentários que ingeriram dieta rica em lipídios apresentaram, após quatro semanas, subsensibilidade a noradrenalina e nenhuma alteração na sensibilidade a isoprenalina. A associação da dieta rica em lipídios com o programa de exercício físico preveniu as alterações observadas tanto pela dieta hiperlipídica como pelo programa de exercício isoladamente. Os valores  $pD_2$  para NA foram:  $7,44 \pm 0,09$  (NS);  $6,65 \pm 0,17^*$  (HS);  $6,52 \pm 0,25^*$  (NT);  $7,15 \pm 0,04^{**\#}$  (HT) e para ISO foram:  $8,37 \pm 0,12$  (NS);  $8,52 \pm 0,10$  (HS);  $8,94 \pm 0,09^*$  (NT);  $8,55 \pm 0,08$  (HT). Onde as diferenças significativas ( $p < 0.05$  ANOVA seguida de Tukey) foram indicadas como segue: \* vs NS; \*\* vs NT, # vs HS. Este programa de exercício físico induziu alterações na resposta atrial semelhantes àquelas observadas no modelo de choques nas patas (três sessões diárias), ou seja, diminuição na resposta mediada pelos adrenoceptores  $\beta_1$  (NA) e aumento na resposta mediada pelo adrenoceptor  $\beta_2$  (ISO). A dieta hiperlipídica oferecida aos ratos durante 4 semanas induziu subsensibilidade a noradrenalina e esta resposta é provavelmente devida a alterações na membrana lipídica e alta atividade adrenérgica relatada neste modelo animal. O motivo da ausência de alterações cardíacas quando da associação dieta hiperlipídica e exercício físico precisa ser investigado.

## Abstract

Dietary lipids has an important effect on transmembrane signaling system in the heart increasing the cardiac membrane cholesterol content, which in time affect  $\beta$ -adrenoceptor/adenylyl cyclase activity and the inotropic and chronotropic responses to catecholamines causing arrhythmogenesis. The aim of this work was to analyze the effect of swimming, to prevent the effects of high fat-CHO diet on the sensitivity to adrenergic agonists in rat isolated right atria. Adult male Wistar rats were used after one week of adaptation in acclimated room at  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  and 12h light-dark cycle (lights on at 6:30 a.m.). The experiments were carried out in accordance with the principles for the use of animals in research and education and adopted by COBEA (Brazilian College for Animal Experimentation). The animals were randomly divided into two groups, sedentary (S) and exercised (T) with a swimming sessions, 5 days a week (50 min. session) during 20 days (4x5 days) in a water glass tank with temperature at  $34 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . These two groups were divided into two subgroups; one of them fed a standard chow (N) and the other, a high fat-CHO diet (H). The atrium was isolated as described before and cumulative concentration-response curves to noradrenaline (NA) and isoprenaline (ISO) were obtained, in the absence or presence of inhibitors of neuronal and extraneuronal uptake. There was no alteration in the basal heart rate or maximal response to the agonists in isolated atria rats from different groups (NS, NT, HS and HT). The physical exercise program in rats fed with standard chow induced right atria subsensitivity to noradrenaline and supersensitivity to isoprenaline. Atria isolated from rats fed with high fat-CHO diet showed subsensitivity to noradrenaline and no alterations on the sensitivity to isoprenaline. Association of high fat-CHO diet and this physical exercise program prevented the alterations induced by the diet or the exercise

programs alone. The NA pD<sub>2</sub> values were: 7.44±0.09 (NS); 6.65±0.17\* (HS); 6.52±0.25\* (NT), 7.15±0.04\*\*<sup>#</sup> (HT) and ISO pD<sub>2</sub> values were: 8.37±0.12 (NS); 8.52±0.10 (HS); 8.94±0.09\* (NT), 8.55±0.08 (HT). Significant differences (p<0.05 ANOVA plus Tukey test) were indicated as follows: \*compared to the NS group, \*\*compared to the NT group, <sup>#</sup>compared to the HS group. The uptake inhibition did not alter the responses obtained. This exercise program induced alterations in the right atria response similar to those induced by foot shock stress, it means, decrease on β<sub>1</sub>-adrenoceptor mediated (NA) response and increase on β<sub>2</sub>-adrenoceptor mediated (ISO) response. High fat-CHO diet offered during four weeks induced subsensitivity to noradrenaline, this response is probably due to alterations on the lipid membrane content and high adrenergic activity reported in this animal model. The absence of effects on atria response observed in rats submitted to high fat-CHO diet and exercise program needs to be investigated.

**Lista de abreviações**

$\alpha$ -AR	Adrenoceptor do tipo alfa
$\beta$ ARK	Quinase do adrenoceptor beta
$\beta$ 1-AR	Adrenoceptor do tipo beta 1
$\beta$ 2-AR	Adrenoceptor do tipo beta 2
$\beta$ 3-AR	Adrenoceptor do tipo beta 3
$\beta$ 4-AR	Adrenoceptor do tipo beta 4
AMPc	Adenosina Monofosfato cíclica
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
CDR	Curva dose-resposta
CT	Colesterol total
EC <sub>50</sub>	Concentração molar do agonista que determina resposta igual a 50% da resposta máxima
GDP	Difosfato de guanosina
GH	Hormônio do crescimento
G <sub>i</sub>	Proteína G inibitória
G <sub>s</sub>	Proteína G estimulatória
GTP	Trifosfato de guanosina
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HS	Rato adulto hiperlipidêmico sedentário
HSpt	Rato adulto hiperlipidêmico sedentário pré tratado
HT	Rato adulto hiperlipidêmico submetido à natação
HTpt	Rato adulto hiperlipidêmico submetido à natação pré-tratado
IA	Índice aterogênico

ISO	Isoprenalina
LCAT	Lecitina-colesterol-aciltransferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Lipase hepática
LPL	Lípase lipoprotéica
MAO	Enzima monoamino oxidase
NA	Noradrenalina
NS	Rato adulto normolipidêmico sedentário
NSpt	Rato adulto normolipidêmico sedentário pré tratado
NT	Rato adulto normolipidêmico submetido à natação
NTpt	Rato adulto normolipidêmico submetido à natação pré tratado
pD <sub>2</sub>	Logaritmo negativo da concentração molar do agonista que determina resposta igual a 50% da resposta máxima
PKA	Proteína kinase A dependente de AMPc
R <sub>máx</sub>	Resposta máxima
SNS	Sistema nervoso simpático
TAG	Triacilglicerol
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

## Lista de tabelas

- Tabela 1:** Concentrações séricas (mg/dl) de glicose, colesterol total (CT) e suas frações (LDL, VLDL, HDL), triacilglicerol (TAG) e Índice Aterogênico de ratos após quatro semanas de tratamento com dieta padrão (normolipidêmico-N) ou dieta hiperlipídica (hiperlipidêmico-H) sedentários (S) ou submetidos à natação (T). O protocolo de natação constou de sessões diárias de natação de 50 min em tanque de vidro com água a  $34\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 20 dias sendo 5 dias por semana. **21**
- Tabela 2:** Frequência de batimento basal (Basal; batimentos/min), sensibilidade ( $pD_2$ ) e resposta máxima à noradrenalina e isoprenalina ( $R_{\text{máx}}$ ; batimentos/min) em átrios direitos isolados de ratos após quatro semanas de tratamento com dieta padrão (normolipidêmico-N) ou dieta hiperlipídica (hiperlipidêmico-H) sedentários (S) ou submetidos à natação (T). O protocolo de natação constou de sessões diárias de natação de 50 min em tanque de vidro com água a  $34\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 20 dias, 5 dias por semana. **24**
- Tabela 3:** Efeitos dos bloqueios do sistema de captação neuronal e extraneuronal combinados sobre a potência da noradrenalina e isoprenalina em átrios direitos isolados de ratos após quatro semanas de tratamento com dieta padrão (normolipidêmico-N) ou dieta hiperlipídica (hiperlipidêmico-H) sedentários (S) ou submetidos à natação (T). O protocolo de natação constou de sessões diárias de natação de 50 min em tanque de vidro com água a  $34\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 20 dias, 5 dias por semana. **25**

## Lista de figuras

- Figura 1:** Curva dose-resposta para efeitos cronotrópicos da noradrenalina sem pré tratamento (A) e com pré tratamento (B) em átrios direitos isolados de ratos após quatro semanas de tratamento com dieta padrão (normolipidêmico-N) ou dieta hiperlipídica (hiperlipidêmico-H) sedentários (S) ou submetidos à natação (T). O protocolo de natação constou de sessões diárias de natação de 50 min em tanque de vidro com água a  $34 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 20 dias sendo 5 dias por semana. As diferenças estatísticas estão na tabela 2. **26**
- Figura 2:** Curva dose-resposta para efeitos cronotrópicos da isoprenalina sem pré tratamento (A) e com pré tratamento (B) em átrios direitos isolados de ratos após quatro semanas de tratamento com dieta padrão (normolipidêmico-N) ou dieta hiperlipídica (hiperlipidêmico-H) sedentários (S) ou submetidos à natação (T). O protocolo de natação constou de sessões diárias de natação de 50 min em tanque de vidro com água a  $34 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 20 dias sendo 5 dias por semana. As diferenças estatísticas estão na tabela 2. **27**
- Figura 3:** Curvas dose-resposta para efeitos cronotrópicos da noradrenalina em átrios direitos isolados de ratos após quatro semanas de tratamento com dieta padrão, normolipidêmicos sedentários (NS) e normolipidêmicos sedentários pré-tratados (NSpt) (A) ou submetidos à natação (NT) e submetidos à natação pré-tratados (NTpt) (B). Após quatro semanas de tratamento com dieta hiperlipídica, hiperlipidêmicos sedentários (HS) e hiperlipidêmicos sedentários pré-tratados (HSpt) (C) ou submetidos à **28**

natação (HT) e submetidos à natação pré-tratados.(HTpt) (D). O protocolo de natação constou de sessões diárias de natação de 50 min em tanque de vidro com água a  $34 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 20 dias sendo 5 dias por semana. As diferenças estatísticas estão na tabela 2.

**Figura 4:** Curvas dose-resposta para efeitos cronotrópicos da isoprenalina em átrios direitos isolados de ratos após quatro semanas de tratamento com dieta padrão, normolipidêmicos sedentários (NS) e normolipidêmicos sedentários pré-tratados (NSpt) (A) ou submetidos à natação (NT) e submetidos à natação pré-tratados (NTpt) (B). Após quatro semanas de tratamento com dieta hiperlipídica, hiperlipidêmicos sedentários (HS) e hiperlipidêmicos sedentários pré-tratados (HSpt) (C) ou submetidos à natação (HT) e submetidos à natação pré-tratados.(HTpt) (D). O protocolo de natação constou de sessões diárias de natação de 50 min em tanque de vidro com água a  $34 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 20 dias sendo 5 dias por semana. As diferenças estatísticas estão na tabela 2.

## **I- Introdução**

Os sistemas cardiovascular, endócrino e nervoso são fundamentais na integração e controle das funções orgânicas. O sistema cardiovascular consiste, de uma bomba propulsora contrátil, o coração, responsável por manter constante o fluxo sanguíneo para todas as regiões do organismo, através da variação das suas propriedades inotrópicas e cronotrópicas, e de um circuito de distribuição do sangue, os vasos sanguíneos, que controlam o fluxo sanguíneo para estas regiões conforme a necessidade dos tecidos e órgãos. O sistema cardiovascular integra o corpo como uma unidade, proporcionando uma corrente contínua de hormônios, nutrientes e oxigênio para os diversos órgãos e tecidos, ao mesmo tempo que remove os produtos do metabolismo celular.

Os sistemas endócrino e nervoso, por sua vez, alteram as velocidades das reações das “células-alvo”, modificando seu metabolismo através das alterações na velocidade da síntese protéica intracelular, no ritmo da atividade enzimática, no transporte através da membrana plasmática e na atividade secretória.

Os sistemas endócrino, nervoso e cardiovascular agem de forma a proporcionar a estabilidade do meio corporal interno, isto é, a homeostasia.

Até o século XX, predominaram as chamadas doenças transmissíveis decorrentes de agentes vivos como vírus, bactérias e parasitas responsáveis pela paralisia infantil, tuberculose e verminoses intestinais respectivamente. A modernidade, no entanto, trouxe consigo a erradicação destas doenças através da universalização da assistência médica, avanço da tecnologia sobre a prevenção e o tratamento destas doenças, reduzindo assim o tempo de incapacitação causado por elas e permitindo maior longevidade. O avanço tecnológico em inúmeros campos, também nos proporcionou uma vida mais confortável, porém mais sedentária, a base de aparelhos eletrônicos, e alimentação hipercalórica. As doenças infecto-parasitárias passaram, então, a dar lugar às doenças crônico-degenerativas como

diabetes, neoplasias, doenças respiratórias, articulares, gastrintestinais e doenças cardiovasculares que comprometem a integridade funcional dos sistemas responsáveis pelo equilíbrio interno (GONÇALVES *et al.*, 1997).

Estudos realizados em Framingham (EUA), a partir de 1948, demonstraram que determinados fatores de risco como a concentração sérica de colesterol, o tabagismo e a hipertensão arterial estavam associados à existência de cardiopatia isquêmica (WONG *et al.*, 1991), inaugurando uma nova etapa de estudos sobre as doenças cardiovasculares.

Segundo Mion & Nobre (1999), fator de risco é, qualquer fator clínico (antecedentes pessoais e familiares) ou laboratorial (hiperglicemia, hiperlipidemia) que se associe com a probabilidade de ocorrência de determinada doença em um período de tempo variável. De acordo com a *American Heart Association*, os fatores de risco das cardiopatias são o tabagismo (25%), a hipertensão, a pressão arterial (25%), o colesterol plasmático (20%), a inatividade física (60%), a idade acima de 65 anos (13%), o diabetes mellitus (7%), a obesidade (33%) e em porcentagens menores, o sexo masculino, o estresse e a hereditariedade.

Hiperlipidemia é o quadro clínico no qual as concentrações plasmáticas de triacilgliceróis e de colesterol total e/ou suas frações estão acima da faixa considerada normal. Esta dislipidemia pode ter origem primária, ou seja, ocorrer como resultado de predisposição genética, ou ser de origem secundária, desenvolvida a partir de condições ambientais como, por exemplo, uma dieta desequilibrada e sedentarismo; pode, ainda, ser conseqüência da combinação de ambas (GINSBERG, 1990; HAVEL & KANE, 1995). Portanto, na dislipidemia secundária, o consumo de dieta contendo quantidade de gordura acima do recomendado (principalmente saturada) pode alterar a composição dos lipídios sanguíneos, favorecendo o desenvolvimento das hiperlipidemias. De fato, alto conteúdo de gordura na dieta, especialmente gordura saturada e colesterol, resulta em elevada adiposidade que pode conduzir à obesidade e à resistência à insulina o qual pode progredir para diabetes mellitus tipo II

(HOWARD & HANNAH, 1995). Ambas contribuem para aumento da incidência de doenças ateroscleróticas e cardíacas (BRUMMELEN, 1983; HAVEL & KANE, 1995). Desta forma, a hiperlipidemia caracteriza-se como um dos principais fatores de risco para as doenças cardiovasculares por alterar a função cardíaca e a responsividade vascular (MOKLER *et al.*, 1985).

Elevadas concentrações plasmáticas de lipídios estão correlacionadas significativamente com um tônus simpático cronicamente aumentado (CRANDALL *et al.*, 1983; KAUFMAN *et al.*, 1991; DANEV *et al.*, 1997). O tônus simpático cronicamente aumentado, por sua vez, resulta em elevação da frequência cardíaca e/ou da pressão arterial. Além disso, a hiperlipidemia pode aumentar a contratilidade cardíaca e a responsividade pressora vascular à catecolaminas (MOKLER *et al.* 1985). Esse aumento da responsividade pressora vascular à noradrenalina também foi relatado em artérias femurais de coelhos isoladas, perfundidas com plasma hipercolesterolêmico (BLOOM *et al.*, 1975). Estas condições são favoráveis à ocorrência de arritmias, as quais podem progredir para fibrilação ventricular e morte súbita.

O sistema alvo periférico das catecolaminas é caracterizado por cinco tipos de receptores de superfície celular ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ ) acoplados a diferentes sistemas efetores. A sensibilidade da resposta celular às catecolaminas é dependente do tipo e da proporção de cada tipo de receptor adrenérgico.

A diferença entre os subtipos de adrenoceptores está na sensibilidade da resposta celular às catecolaminas. A primeira classificação foi proposta por Ahlquist (1948), segundo a qual os receptores  $\alpha$ -adrenérgicos apresentariam afinidade decrescente à noradrenalina, adrenalina e isoprenalina, respectivamente (noradrenalina > adrenalina >> isoprenalina) e os receptores  $\beta$ -adrenérgicos se caracterizariam por afinidade decrescente à isoprenalina, adrenalina e noradrenalina respectivamente (isoprenalina > adrenalina > noradrenalina). Em 1967, Lands e colaboradores propuseram uma

subdivisão para os receptores  $\beta$ -adrenérgicos, sendo os receptores  $\beta_1$  identificados nos tecidos cardíaco e adiposo, e apresentando afinidade maior à isoprenalina do que para adrenalina e a noradrenalina (isoprenalina > adrenalina = noradrenalina) enquanto que os receptores  $\beta_2$ , localizados no músculo liso da traquéia e dos vasos, apresentaria afinidade decrescente à isoprenalina, adrenalina e noradrenalina respectivamente (isoprenalina > adrenalina > noradrenalina). Àquela época, acreditava-se que houvesse somente um subtipo de receptor em cada órgão.

Carlsson *et al.*, em 1972 apresentaram evidências de que ambos os subtipos de adrenoceptores  $\beta$  coexistiam no coração do gato e, com o aparecimento de novas substâncias agonistas e antagonistas, mais seletivas, não foi difícil diferenciar as características desses subtipos de adrenoceptores. Em 1979, Minneman *et al.* sugeriram a existência de 83% de adrenoceptores  $\beta_1$  e 17% de adrenoceptores  $\beta_2$  em corações de ratos, enquanto Juberg *et al.* (1985) detectaram em átrios direitos de ratos 67% de adrenoceptores  $\beta_1$  e 33% de  $\beta_2$ . Em corações humanos, a proporção de receptores é de 60 a 70% de  $\beta_1$  e 30 a 40% de  $\beta_2$  (BRODDE, 1991).

Desta forma, verificou-se a existência de populações de adrenoceptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  em corações de mamíferos como gato, rato, porco da índia e cães, e em humanos verificou-se também a existência de um terceiro adrenoceptor, o  $\beta_3$ .

Os adrenoceptores pertencem a uma família de receptores de membrana integrais com sete alças transmembrana, ligados na terceira alça citoplasmática à uma proteína G. Dependendo da natureza desta proteína, inibitória ou excitatória, ela ativa ou inativa uma enzima efetora, ligando assim o estímulo externo a respostas intracelulares (SIMON *et al.*, 1991).

A proteína excitatória (Gs) ativada pelo complexo ligante-receptor é constituída de três subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ), sendo a subunidade  $\alpha$  a porção catalítica e, geralmente, determinante da função e especificidade da proteína. Em estado de repouso, a subunidade  $\alpha$  está ligada a uma molécula de

difosfato de guanosina (GDP). Na interação do ligante com o receptor, esse complexo acopla-se ao trímero da proteína Gs, a subunidade  $\alpha$  se desliga de GDP ligando-se em seguida à GTP (trifosfato de guanosina) e, assim, deslocando-se do complexo trimérico e associando-se à enzima adenilil ciclase, que converte ATP em AMPc. O AMPc se liga a proteínas quinases dependentes de AMPc (PKA) que, ativadas, utilizam ATP como fonte de grupos fosfato para catalisar a fosforilação dos resíduos de serina e treonina de diversas proteínas intracelulares, tais como os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-dependentes nas células musculares cardíacas, que resultam em efeitos inotrópicos positivos (CHIU *et al.*, 1993; COOK *et al.*, 1993; CLAPHAM, 1994; KAUMANN & MOLENNAR, 1997; KUSHEL *et al.*, 1999).

Ambos adrenoceptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  estimulam a proteína G excitatória G(s), porém,  $\beta_2$ -AR ativa também a proteína G inibitória G(i), ativando duas vias de transdução de sinais. No coração, esta dupla ligação de  $\beta_2$ -AR com as respectivas proteínas G desencadeia duas respostas;  $\beta_2$ -AR-G(s) induz a abertura de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  atingindo proteínas alvo citoplasmáticas como fosfolambam e miofilamentos contráteis, aumentando a frequência cardíaca e a força de contração quando estimulados por agonistas, e a ligação  $\beta_2$ -AR-G(i) profere uma poderosa via de proteção cardíaca contra apoptose induzida por superestimulação de G(s), através da via de transdução G(i)-G(beta)(gama) - fosfoinositidio-3-kinase – Akt (XIAO, 2000; XIAO, 2001). Em ratos, as respostas cronotrópicas e inotrópicas a noradrenalina circulante liberada por terminações nervosas são mediadas pelo subtipo  $\beta_1$ -AR (JUBERG *et al.*, 1985) enquanto que as respostas a altas concentrações de adrenalina são também mediadas por  $\beta_2$ -AR (KAUMANN, 1986).

Por outro lado, os adrenoceptores  $\beta_3$  cardíacos são acoplados à proteína G inibitória (Gi), de modo que agonistas seletivos  $\beta_3$  encurtam o potencial de ação e causam cardiodepressão em humanos,

sugerindo um acoplamento direto de  $G_i$  a um canal de  $K^+$  (STROSBERG & PIETRI-RUXEL, 1996; KAUMANN & MOLENAAR, 1997).

Santos e colaboradores (2005), estudando átrios direitos isolados de ratos com 48h de denervação sino-aórtica, observaram que o agonista não convencional CGP12177 age tanto ativando  $\beta_2$ -G(i) como interage com o sítio de baixa afinidade de  $\beta_1$  ligado a G(s), comprovando a existência desta via de transdução de sinal já que este é resistente aos antagonistas propanolol e CGP20712A que bloqueiam o  $\beta_1$  ADR convencional.

Os efeitos cardíacos cronotrópicos e inotrópicos positivos mediados pelos receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  são promovidos através da estimulação do sistema adenilil ciclase / AMPc.

É comum observarmos a diminuição gradual da resposta ao estímulo mesmo este se mantendo contínuo e com intensidade constante. Isto se dá por um fenômeno chamado dessensibilização. Três mecanismos principais estão associados com o desenvolvimento da dessensibilização de  $\beta$  adrenoceptores. São eles: 1. rápido desacoplamento do receptor de suas unidades efetoras como consequência de sua fosforilação por diversas quinases, incluindo a proteína quinase A (PKA) e a quinase do adrenoceptor  $\beta$  ( $\beta$ ARK); 2. sequestro do receptor para o interior célula, envolvendo alguma mudança conformacional no receptor, possivelmente facilitada por fosforilação, sendo esta internalização, às vezes, irreversível mas, geralmente, reversível com o receptor retornando a superfície da membrana; sendo esta internalização irreversível a terceira forma de dessensibilização, a *downregulation*, que é uma diminuição do número de receptores de membrana por destruição pelos lisossomos e redução de sua síntese. Esta, demora diversas horas para ocorrer (COLLINS *et al.*, 1990; BÜNEMANN *et al.*, 1999). A *downregulation* ocorre da seguinte forma; os adrenoceptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  possuem sítios de fosforilação em seus domínios citoplasmáticos que são reconhecidos por, pelo menos, duas diferentes quinases: PKA e  $\beta$ ARK. A primeira, fosforila o receptor, o que diminui a

ativação de Gs pelo receptor enquanto que a segunda fosforila apenas os receptores ocupados por agonistas (dessensibilização homóloga). A proteína citoplasmática,  $\beta$  arrestina se fixa no receptor desacoplando o receptor  $\beta$  de Gs (CASTELLANO & BÖHM, 1997).

Os três subtipos de adrenoceptores  $\beta$  não são igualmente sensíveis à dessensibilização. O adrenoceptor  $\beta_1$  é menos sensível que  $\beta_2$  para dessensibilização a curto e a longo prazo, pois possui poucos sítios de fosforilação e faltam resíduos de tirosina necessários para a *downregulation*;  $\beta_3$  é quase completamente resistente à dessensibilização a curto prazo, pois não sofre fosforilação por PKA e  $\beta$ ARK, devido à ausência das seqüências – alvo, identificadas nos adrenoceptores  $\beta_2$  (STROSBURG, 1995).

A membrana celular é composta principalmente por proteínas (55%); lipídios polares, incluindo fosfolipídios (25%), glicerofosfolipídeos e glicoesfingolipídios (4%); esteróis (13%). Carboidratos (3%) formam as partes externas da bicamada. Os fosfolipídios são constituídos por uma porção hidrofílica fosforilada voltada para a face externa ou interna da bicamada (glicerol) e uma porção hidrofóbica no interior da bicamada composta de um ou mais ácidos graxos. Assim, os fosfolipídios constituem a matriz da membrana podendo interagir tanto com a água dos meios intra e extracelular, como com os lipídios, controlando a sua absorção através da membrana, alterando a sua composição, devido a fatores como a dieta, a idade e a ação de vários hormônios (PATTEN *et al.*, 1989; FIELD *et al.*, 1990). Variações na composição lipídica da membrana acarreta alteração funcional das enzimas, canais iônicos e receptores que a compõem provocando mudanças conformacionais nos segmentos transmembrana dos receptores, liberando ou obstruindo sítios de fixação dos ligantes, aumentando ou diminuindo a ativação da “cascata” de respostas intracelulares. Portanto, alterações nas concentrações de colesterol da membrana podem afetar a atividade das proteínas integrais, entre as quais se

encontram os adrenoceptores, comprometendo o funcionamento do órgão (LURIE *et al.*, 1985; BRODERICK *et al.*, 1989).

O colesterol, além de construir a membrana plasmática, é um precursor da vitamina D, dos hormônios da glândula supra-renal e dos hormônios sexuais estrogênio, androgênio e progesterona, e tem importante papel na formação da bile. Porém, altas concentrações séricas de colesterol associadas a outros fatores de risco, como fumo e hipertensão, são poderosos prognósticos de coronariopatias (MARTIN, 1986; KLAG *et al.*, 1993; IRIBARREN *et al.*, 1995). A relação entre o colesterol sérico e morte por coronariopatia é contínua e progressiva (STAMLER, 1986; LEVY, 1990).

Numerosos estudos indicam que as dietas ricas em colesterol e gorduras saturadas elevam o colesterol sérico em animais “suscetíveis”, acarretando um processo degenerativo, caracterizado pela formação de depósitos ricos em colesterol, denominados placas, sobre o revestimento interno das artérias de médio e grande calibre. Esse processo degenerativo é designado aterosclerose, termo utilizado para denominar um grupo de distúrbios que resulta no espessamento e perda de elasticidade das paredes arteriais, estreitamento e eventual fechamento desses vasos, diminuindo o fluxo sanguíneo para os órgãos, podendo causar angina, infarto do miocárdio, acidentes vasculares cerebrais, doença vascular periférica e morte súbita (OLIVEIRA, 1995; GERSH *et al.*, 1996).

É evidente a relação entre a aterosclerose e as lipoproteínas de baixa densidade e de muito baixa densidade (LDL e VLDL). A lipoproteína VLDL contém um alto percentual de gordura (95%), do qual 60% está na forma de triacilgliceróis. Esta lipoproteína é responsável pelo transporte dos triacilgliceróis, formados no fígado a partir das gorduras, carboidratos, álcool e colesterol, para os músculos e tecido adiposo. Sob a ação da enzima lipoproteína lipase, a VLDL se converte em LDL, com menos gordura. Entre as lipoproteínas, as LDLs transportam 60 a 80% do colesterol sérico total e possuem maior afinidade pelas células da parede arterial, ajudando a levar o colesterol para dentro do

tecido arterial, onde será oxidado para participar na proliferação das células musculares lisas e em outras alterações desfavoráveis que estreitam e lesam a luz arterial (SLYPER, 1994).

Em contrapartida, as lipoproteínas de alta densidade (HDLs) produzidas no fígado e no intestino delgado contêm um maior percentual de proteína (50%), menor quantidade de gordura total (20%) e menor quantidade de colesterol (20%). As lipoproteínas HDLs removem o colesterol da parede arterial, transportando-o para o fígado, onde é utilizado na síntese dos sais biliares e excretado.

O metabolismo do colesterol é regulado e influenciado por diversos fatores como ingestão alimentar, hormônios tireoideanos, estrógenos, beta-endorfinas e insulina. Hormônios tireoideanos e estrógenos reduzem o colesterol, enquanto a falta de insulina aumenta sua concentração sérica. A melatonina tem influência sobre o metabolismo do colesterol, pois promove a liberação de hormônios tireoideanos, insulina e beta-endorfinas (SANDYK & AWERBUCH, 1994) e regula o neurotransmissor cerebral, a serotonina, que funciona como mediador entre a melatonina e seus efeitos sobre o colesterol.

A hipercolesterolemia é causada por defeito no metabolismo das lipoproteínas e, além de ser encontrada em diversas patologias como doenças do sistema endócrino, hepático e renal, é o principal fator de risco para as doenças cardiovasculares, por alterar a contratilidade cardíaca e a responsividade vascular (MOKLER *et al.*, 1990). Bonora *et al.*, (1998) constataram que a hipertrigliceridemia e a diminuição de HDL não ocorrem como distúrbios isolados e sim como uma síndrome plurimetabólica.

A atividade nervosa simpática também modula o metabolismo lipoprotéico. O seu aumento estimula um subtipo de adrenoceptor  $\alpha$ , o  $\alpha_1$ . O adrenoceptor  $\alpha_1$ , além de mediar mudanças no tônus dos esfíncteres pré-capilares, é responsável pelo aumento nas concentrações séricas de LDL e VLDL, pois diminui sua oferta para ação da lipase endotelial, conseqüentemente, diminuído seu metabolismo. A frequência cardíaca está correlacionada positivamente com concentrações séricas de LDL e

inversamente com HDL (BØNAA & ARNESEN, 1992). Estudos em artérias coronárias de porcos, incubadas em concentrações moderadamente elevadas de LDL, mostraram uma redução na densidade dos adrenoceptores  $\beta$ , com concomitante aumento da atividade da enzima adenilil ciclase comprovando alteração da vasoregulação em concentrações séricas elevadas de colesterol (BREHM *et al.*, 1998).

Conforme já mencionado, Bonora *et al.*, (1998) constataram que a hipertrigliceridemia e a diminuição do HDL podem não ocorrer como distúrbios isolados e sim como uma síndrome plurimetabólica (ou síndrome X) onde uma série de reações metabólicas, como reduzida tolerância à glicose, com subsequente hiperinsulinemia e progressão para diabetes tipo II, hipertensão, aterosclerose e a própria dislipidemia, entre outros, se apresentam num mesmo indivíduo. Esta síndrome parece demonstrar bem as inter-relações entre a dislipidemia e o sistema endócrino, representado principalmente pelos hormônios insulina, catecolaminas e, possivelmente, também os adrenocorticotróficos, e o sistema cardiovascular e nervoso.

Já em 1978, Bernstein *et al.*, sugeriam um mecanismo patogênico para o desenvolvimento de hipertrigliceridemia, que acarretaria um estado de resistência à captação de glicose e subsequente hiperinsulinemia que, por sua vez, aumentaria a produção de VLDL rica em triacilgliceróis, aumentando assim a concentração plasmática de triacilgliceróis. A fração VLDL, por sua vez, está intimamente associada com a fração LDL, sendo que o aumento da primeira se faz acompanhar do aumento da segunda, a qual é a principal responsável na gênese da aterosclerose. Concomitantemente, sabe-se que a insulina possui um papel fundamental na regulação do tônus vascular, principalmente nos pequenos leitos vasculares, por ativar vias intracelulares responsáveis pela liberação de óxido nítrico, o principal fator de relaxamento derivado do endotélio (BARON, 1996). Assim, condições que conduzem à deterioração do sistema vascular, como processos ateroscleróticos ou resistência à

insulina, comprometeriam todo o sistema cardiovascular e, na sua continuidade, a homeostasia de todo o organismo.

Nosso laboratório vem estudando a indução de hiperlipidemia pela dieta em ratos desde 1996. Os resultados obtidos até o momento demonstraram que a ingesta de dieta hiperlipídica, por seis semanas, promoveu subsensibilidade da resposta cronotrópica a agonistas de adrenoceptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  em átrios direitos isolados destes animais sem conduzir à obesidade nem hiperglicemia (MIOTTO, 2001). Esta subsensibilidade poderia ser decorrente de vários fatores, como o aumento da atividade simpática em resposta à dieta, que aumentaria a concentração de catecolaminas circulantes, as quais promoveriam dessensibilização da resposta adrenérgica, seja por seqüestro ou por *downregulation* dos receptores (STROSBURG, 1995; CASTELLANO & BÖHM, 1997; BÜNEMANN *et al.*, 1999), ou ainda por uma alteração da via de sinalização intracelular iniciada pelos  $\beta$  adrenoceptores cardíacos (DAAKA *et al.*, 1997). Além disso, dados de nosso laboratório indicam que, já na quarta semana ingerindo dieta hiperlipídica, ratos apresentam concentrações séricas de colesterol total e principalmente de LDL aumentadas significativamente.

A partir dos dados fornecidos pela *American Heart Association*, percebemos o quanto a atividade física é importante, pois dos fatores de risco, o sedentarismo é o principal contribuinte para as cardiopatias. O *National Cholesterol Education Program* propõe a prática regular de exercício físico como ajuda no controle do peso, da pressão arterial, do perfil lipídico, do diabetes e/ou resistência á insulina e do estresse mental. Kannel *et al.*, (1986) ainda ressaltam que quanto maior quantidade de atividade física praticada, independente da idade, maior a redução da incidência de doenças cardiovasculares, coronarianas e da mortalidade. Outros estudos evidenciam o benefício da atividade física no metabolismo dos lipídios pela ativação da lipase lipoprotéica (LPL) e da lecitina-colesterol-aciltransferase (LCAT) e diminuição da atividade da lipase hepática (LH) que levam à

diminuição da trigliceridemia e elevação das concentrações séricas de HDL. Além destes benefícios, a atividade física junto a uma orientação dietética e conseqüente redução de peso corpóreo, reduz as concentrações plasmáticas de colesterol total, de LDL-colesterol, aumenta a atividade insulínica, a liberação do hormônio de crescimento (GH), do hormônio tireóideo, das catecolaminas e de neuro-hormônios, responsáveis pela estabilidade psíquica, aumenta a atividade fibrinolítica, diminuindo a tendência à agregação plaquetária responsável pela aterosclerose (LAVIE *et al.*, 1993). Indivíduos treinados apresentam concentrações plasmáticas de HDL colesterol 20 a 30 % maiores que os sedentários (HARDMAN, 1996), redução nas concentrações plasmáticas de triacilgliceróis em 16 mg/dl, de colesterol total em 10mg/dl, de LDL colesterol em 5 mg/dl, enquanto que as concentrações plasmáticas de HDL colesterol aumentam 1 mg/dl com o treinamento físico. Esses efeitos são ainda maiores em indivíduos que apresentam concentrações lipídicas elevadas (HARDMAN, 1996) ou quando o exercício é associado a ingesta de dieta hipocalórica (DEPRÉS *et al.*, 1991).

Existem algumas controvérsias em relação à frequência, intensidade e duração do treinamento. As alterações lipídicas dependem, principalmente, do gasto energético. Segundo Hardman (1996), a baixa intensidade associada à maior duração do exercício tem se mostrado mais eficaz em reduzir as frações lipídicas, supondo que intensidades elevadas, por diminuírem o tempo de atividade, gerem um menor gasto calórico total. Porém Hagberg (1991) acredita que uma alta intensidade também apresenta resultados positivos. Já, Stubbe *et al.* (1983) observaram elevações de HDL colesterol somente em indivíduos que praticaram exercícios de baixa intensidade. E, segundo o *American College of Sports and Medicine* (1987), uma atividade moderada de quinze minutos, três vezes por semana é suficiente para gerar benefícios. Apesar de todos os dados apresentados, Forjaz & Negrão (1999) relatam que, quanto a dislipidemia, o protocolo de treinamento necessário para produzir as alterações relatadas anteriormente ainda não está definido.

Apesar desta dificuldade, a prática de exercício físico vem sendo utilizada com frequência crescente como medida não-medicamentosa na prevenção e tratamento de patologias como a hipertensão, diabetes do tipo II, obesidade e dislipidemias. As diretrizes para uma prescrição de exercício físico são baseadas na intensidade, frequência, duração e tipo de exercício envolvido e devem seguir um programa planejado de exercícios, precedido de um teste de esforço para detecção de problemas, principalmente cardiovasculares, além de determinar o limiar de treinamento correto (FRANCIS, 2000; GIBBONS *et al.*, 2000; STEWARD *et al.*, 2000).

Pesquisas desenvolvidas com humanos (WETZTEIN *et al.*, 1998; PESCATELLO, 1999; DUSTINE *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2001) e modelos animais (DESHAIES *et al.*, 1983) comprovam o efeito do exercício físico sobre o metabolismo lipídico.

Pels e colaboradores (1991) observaram que ratos tratados com dieta rica em colesterol apresentaram aumento nas concentrações séricas de HDL-colesterol quando submetidos ao exercício, e nenhuma modificação do perfil lipídico foi observada em ratos normocolesterolêmicos (PELS, 1985). Além disso, o exercício físico é um componente indispensável na terapia do diabetes tipo II, pois está relacionado ao aumento da sensibilidade à insulina (FEUERSTEIN & WENSTOCK, 1997; RIGLA *et al.*, 1997). Isto é importante, pois estes dois fatores de risco, diabetes tipo II e dislipidemias, estão intimamente associados em uma relação causa-efeito.

Considerando o benefício dos exercícios aeróbicos sobre o perfil lipídico, estes vêm sendo utilizados como recomendação não farmacológica coadjuvante no tratamento da síndrome plurimetabólica (PESCATELLO, 1999; ERIKSSON *et al.*, 2000).

Frente ao exposto, nossos objetivos foram: avaliar se um programa de exercício físico aeróbio (natação) tem efeito protetor sobre as concentrações lipídicas de ratos tratados com dieta hiperlipídica e, analisar o efeito deste programa sobre a sensibilidade atrial, focalizando as alterações verificadas ao nível dos adrenoceptores cardíacos localizados no átrio direito.

## **II- Objetivos**

Os objetivos deste trabalho foram:

- 1- Avaliar se a sensibilidade adrenérgica de átrios direitos isolados de ratos normo ou hiperlipidêmicos sedentários ou submetidos à natação (programa de exercício físico aeróbio).
- 2- Avaliar o efeito da natação sobre os valores plasmáticos de glicose, triacilgliceróis e de colesterol total e suas frações (HDL, LHL, VLDL) em ratos alimentados ou não com dieta hiperlipídica durante 4 semanas.

### III - Material e Métodos

**Animais.** Foram utilizados ratos machos jovens da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, Albina, Rodentia, Mammalia), de cinco semanas, pesando aproximadamente 170 g. Os ratos foram mantidos em gaiolas coletivas (seis animais por gaiola) durante quatro semanas com a temperatura média de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e ciclo claro/escuro de 12 horas, com o ciclo claro iniciando-se às 6:30 horas. Durante os experimentos, os ratos foram tratados de acordo com as normas descritas por Olfert *et al.* (1993), para uso de animais para pesquisa e educação e os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia (Protocolo número: 797-1; UNICAMP).

**Grupos e dieta.** Os ratos foram mantidos em gaiolas coletivas (seis por gaiola) e alimentados com ração padrão para animais de laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol, marca Labina-Purina, Brasil (ratos normolipidêmicos, N) ou com ração hiperlipídica contendo 15% de gordura monoinsaturada, 1,25% de colesterol e 0,5% de ácido cólico (ratos hiperlipidêmicos, H) (WOLF-NUNES *et al.*, 2000; 2004 MIOTTO, 2001).

Cada grupo de ratos foi dividido em dois subgrupos, um deles foi submetido ao exercício físico com natação e o outro permaneceu sedentário, formando um total de quatro grupos: normolipidêmicos sedentários (NS), hiperlipidêmicos sedentários (HS), normolipidêmicos submetidos à natação (NT) e hiperlipidêmicos submetidos à natação (HT). Estes tratamentos (dieta e treinamento) foram mantidos por quatro semanas. A ração e a água foram oferecidas diariamente, *ad libitum*.

**Protocolo de atividade física.** Os ratos dos grupos exercitados foram submetidos à natação, diariamente, durante 50 minutos em tanque com água à temperatura de  $34 \pm 2^\circ\text{C}$ , 5 dias por semana, durante 4 semanas.

**Coleta de sangue e análise das concentrações sanguíneas.** Após jejum de 16 hs, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (60 mg /Kg. i.p.; Hypnol, Fontoveter, Itapira, SP, Brasil) e a coleta de 5 ml de sangue foi feita por punção cardíaca. Glicemia, colesterol total, HDL-colesterol e triglicérides (TAG) foram determinados colorimetricamente usando *kits* diagnósticos comerciais (Laborlab, Barueri, SP, Brasil). Calculamos os valores das concentrações de LDL e VLDL a partir das concentrações de HDL, utilizando as fórmulas de Friedewald (1972) e Alonso (2001), respectivamente, especificadas à seguir:

$$\text{LDL (mg/dl)} = \text{Colesterol Total} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$$

$$\text{VLDL (mg/dl)} = \frac{\text{Triacilgliceróis}}{5}$$

5

**Isolamento do átrio e curvas dose-resposta (CDR).** Os experimentos foram realizados de acordo com relatos prévios (SANTOS & SPADARI-BRATFISCH, 2001). Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sob anestesia. Em seguida os átrios direitos foram rapidamente isolados assegurando-se a integridade do nodo sino-atrial. Os átrios direitos foram preparados para registro isométrico de suas contrações espontâneas, sob tensão diastólica de 0,5g, em cubas para órgão isolado, contendo 20 ml de solução de Krebs-Henseleit (KHB) com a seguinte composição química

(milimolar): NaCl, 115,0; KCl, 4,6; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 2,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2,5; NaHCO<sub>3</sub>, 25,0; glicose, 11,0 e ácido ascórbico, 0,11, mantida a 36, 5±0,1 °C, saturadas com carbogênio (95% de CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub>).

Para registro das contrações espontâneas foi utilizado um transdutor isométrico de tensão Narco BioSystem (modelo F-60) conectado a um polígrafo Narco BioSystem (modelo DMP-4). As preparações foram incubadas até a obtenção de uma frequência estável de batimentos espontâneos, determinada por flutuações de frequência menores que 5 batimentos por minuto durante intervalos de 15 minutos. Durante o período de incubação a solução de Krebs-Henseleit foi substituída a cada 15 minutos. Os átrios que apresentaram irregularidades rítmicas ou não estabilizaram a sua frequência após 60 minutos de incubação, foram descartados. Doses cumulativas dos agonistas, noradrenalina e isoprenalina, foram adicionadas e a sensibilidade atrial foi avaliada, com base nos valores de pD<sub>2</sub> do agonista, que corresponde ao logaritmo negativo da concentração molar do agonista que determina uma resposta igual a 50% da resposta máxima (EC<sub>50</sub>) em cada experimento (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

***Pré-tratamento farmacológico in vitro do tecido atrial – Inibição dos sistemas de captação neuronal e extraneuronal.*** Para avaliarmos se as preparações sofriam alguma influência da liberação de catecolaminas endógenas, realizamos uma série de experimentos em que o tecido atrial passou por um processo de desnervação, *in vitro*. A desnervação adrenérgica (APRIGLIANO & HERMSMEYER, 1976) foi feita através da exposição da preparação a 6-hidroxi-dopamina (38 µM) por 16 min, divididos em dois tempos de 8 minutos cada. Para evitar a oxidação da 6-hidroxi-dopamina, ela foi adicionada a uma solução de Krebs-Henseleit modificada, onde foram omitidos o NaHCO<sub>3</sub> e o KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e adicionado o antioxidante glutation (31 µM). O pH da

solução foi reduzido a 4,9 pela remoção do  $\text{NaHCO}_3$  e a adição de glutatión. Entretanto apesar da acidificação temporária do meio, não ocorre deterioração do tecido. Após o período de 16 min, o líquido de incubação foi substituído pela solução original de Krebs-Henseleit, trocada aos 15 e 30 min.

A inibição do sistema de captação extraneuronal foi realizada pela adição de fenoxibenzamina (10  $\mu\text{M}$ ) ao líquido de incubação. A fenoxibenzamina promove a inibição do sistema de captação extraneuronal e recaptação neuronal (IVERSEN & WILSON, 1972; BRYAN *et al.*, 1981), bloqueio dos adrenoceptores  $\alpha$  (BESSE & FURCHGOTT, 1976; BRYAN *et al.*, 1981) e dos receptores colinérgicos muscarínicos (FURCHGOTT & BURSZTYN, 1967).

A fenoxibenzamina permaneceu em contato com a preparação por 30 minutos e, após este período, o líquido de incubação foi substituído, sendo ainda renovado a cada 10 minutos até o retorno de uma frequência próxima à inicial.

Para garantir o bloqueio do processo de captação extraneuronal, após a estabilização da frequência de batimentos espontâneos, foi adicionada a corticosterona (30  $\mu\text{M}$ ) e desipramina (0,1  $\mu\text{M}$ ) à preparação por cerca de 10 minutos antes da realização da curva concentração-efeito que permaneceram em contato com a preparação durante todo o processo inibindo assim respectivamente, a captação extraneuronal (IVERSEN & SALT, 1973; BONISCH & TRENDELENBURG, 1974) e a captação neuronal (SALT, 1972). Em seguida foram realizadas as CDRs para os agonistas noradrenalina e isoprenalina.

**Índice Aterogênico.** O índice aterogênico (IA), o qual representa o risco potencial de morbidade adquirido pelo consumo de dieta com alto teor em lipídios, também foi determinado utilizando a seguinte fórmula (CHOI *et al.*, 1991):

$$IA = \frac{(\text{colesterol total} - \text{HDL})}{\text{HDL}}$$

**Análises estatísticas.** Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  EPM, e foram analisados estatisticamente usando Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, com  $p \leq 0,05$  sendo considerado índice de significância. A regressão não linear foi utilizada para determinar a resposta máxima (Rmax), valores de  $pD_2$  e análise de dois sítios foram feitos com auxílio do software GraphPad Prism (GraphPad Software, Santiago,CA).

Para calcular o desvio entre as curvas dose-resposta foi utilizada a seguinte fórmula que compara duas curvas por vez:

$$pD_2 \text{ de uma CDR} - pD_2 \text{ de outra CDR} = X$$
$$\text{LOG [X]} = \text{DR (desvio entre estas duas curvas)}$$

## **IV - Resultados**

### ***IV.2. Análises plasmáticas.***

A atividade física não modificou os perfis glicêmico e lipídico dos animais que ingeriram ração padrão (tabela 1).

A dieta hiperlipídica oferecida durante quatro semanas aumentou 23% as concentrações plasmáticas de glicose, 162% as concentrações plasmáticas de CT, 469% as concentrações plasmáticas de LDL, 200% as concentrações plasmáticas de VLDL, 148% as concentrações plasmáticas de TAG e 150% o IA, porém não houve alteração significativa na concentração plasmática de HDL (Tabela 1).

Ratos submetidos à atividade física associada à ingestão de dieta apresentaram aumento significativamente menor nas concentrações séricas de CT (29%), LDL (138%) e IA (36%) e concentrações plasmáticas de VLDL, TAG e glicose semelhantes aos valores obtidos em animais sedentários que ingeriram dieta padrão (NS; Tabela 1).

**Tabela 1:** Concentrações séricas (mg/dl) de glicose, colesterol total (CT) e suas frações (LDL, VLDL, HDL), triacilglicerol (TAG) e Índice Aterogênico de ratos após quatro semanas de tratamento com dieta padrão (normolipidêmico-N) ou dieta hiperlipídica (hiperlipidêmico-H) sedentários (S) ou treinados com natação (T). O protocolo de natação constou de sessões diárias de natação de 50 min, em tanque de vidro com água a  $34\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 20 dias sendo 5 dias por semana.

Grupos	glicemia	CT	LDL	VLDL	HDL	TAG	Índice Aterogênico
<b>NS</b>	102,64±2,72 (8)	37,08±3,67 (10)	13,73±2,79 (8)	4,46±0,35 (8)	18,32±1,37 (10)	25,35±1,37(10)	1,68±0,30
<b>NT</b>	111,64±3,37 (8)	33,21±1,11 (10)	16,73±0,94 (9)	4,92±0,9 (8)	13,88±0,96 (9)	24,21±0,95(9)	1,48±0,19
<b>HS</b>	126,04±6,67* (10)	97,99±8,27* (10)	74,53±5,85* (10)	12,04±1,05* (8)	19,37±1,33 (10)	62,71±4,55*(8)	4,20±0,50*
<b>HT</b>	100,05±8,33**(6)	48,62±2,12**#(10)	31,37±1**# (6)	4,54±0,36**(6)	14,5±0,58 (6)	23,03±1,8**(6)	2,30±0,20**#

Amostras plasmáticas foram retiradas após 16h de jejum. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  SEM. O número de ratos utilizados está entre parênteses. Índice aterogênico = (Colesterol total – HDL)/HDL. Diferenças estatísticas ( $p < 0.05$ ): \* comparado ao grupo NS, \*\*comparado ao grupo HS, # comparado ao grupo NT; (ANOVA seguida por teste de Tukey).

## *Sensibilidade atrial*

### **IV.2. Sensibilidade aos Agonistas Noradrenalina e Isoprenalina**

Os resultados obtidos foram analisados quanto à frequência de batimentos espontâneos dos átrios direitos isolados, respostas máximas e valores  $pD_2$  de agonistas (considerados como indicativos de sensibilidade dos tecidos). Nenhum dos grupos experimentais avaliados apresentou alterações na frequência de batimentos espontâneos ou na resposta máxima, quando comparados com seus respectivos controles (Tabela 2).

#### **IV.2.1 - Avaliação da sensibilidade atrial em átrios direitos não submetidos ao pré-tratamento farmacológico**

Curvas dose resposta à noradrenalina foram obtidas em átrios direitos de ratos sedentários ou submetidos à atividade física e/ou ao tratamento com dieta hiperlipídica. Tanto o treinamento físico, quanto o tratamento com a dieta hiperlipídica, induziram subsensibilidade atrial os efeitos cronotrópicos da noradrenalina, caracterizada por um desvio à direita da curva dose-resposta, de aproximadamente 7 vezes ao nível do  $pD_2$ , quando comparadas com as curvas dose-resposta obtidas em átrios direitos de ratos sedentários. Em átrios direitos de ratos submetidos à atividade física, a curva dose resposta à noradrenalina apresentou duas fases distintas, sendo que a primeira fase da resposta inicia-se com aumento da frequência de batimentos em resposta a dose de 9,5 M do agonista e aumenta progressivamente até a dose de 7,5 M. Esta primeira fase corresponde a aproximadamente 20 % da

resposta máxima. A sensibilidade à noradrenalina em átrios direitos de ratos que foram tratados com dieta hiperlipídica e submetidos à atividade física, não diferiu da sensibilidade dos átrios direitos de ratos sedentários.

Curvas dose resposta isoprenalina (Figura 2 A) também foram obtidas em átrios direitos de ratos sedentários ou submetidos à atividade física e/ou ao tratamento com dieta hiperlipídica. O treinamento físico induziu um deslocamento de 3,7 vezes para esquerda na curva dose-resposta da isoprenalina, quando comparada com a curva dose-resposta obtida em átrios direitos de animais sedentários, indicando portanto que os átrios direitos dos animais submetidos a atividade física apresentam supersensibilidade à isoprenalina. Neste grupo, a curva dose resposta à isoprenalina também apresentou uma resposta bifásica, sendo que a primeira fase da resposta inicia-se com aumento da frequência de batimentos em resposta a dose de  $11 \text{ M}$  do agonista e aumenta progressivamente até a dose de  $9,5 \text{ M}$ . Nem o tratamento com a dieta hiperlipídica, nem a associação da dieta com a atividade física, induziram alterações na sensibilidade atrial à isoprenalina.

#### **IV.2.2 - Avaliação da sensibilidade atrial em átrios direitos submetidos ao pré-tratamento farmacológico**

Curvas dose-resposta foram obtidas em preparações tratadas previamente com bloqueadores do sistema de recaptação neuronal e extraneuronal. Assim, nesta etapa do trabalho compararemos estes dados com aqueles obtidos na ausência do pré-tratamento farmacológico (Tabela 3) O pré-tratamento farmacológico, não alterou a sensibilidade dos átrios direitos obtidos de animais controles, tratados com dieta hiperlipídica ou naqueles em que houve associação da dieta hiperlipídica e da atividade

física. No entanto, em átrios direitos de ratos submetidos à atividade física, o pré-tratamento reduziu o subsensibilidade dos átrios direitos à noradrenalina. Esta redução foi caracterizada por um desvio à direita da curva dose-resposta de 2,8 vezes.

Em átrios direitos de ratos submetidos à atividade física o pré-tratamento aboliu a supersensibilidade dos átrios direitos à isoprenalina, mas não alterou a característica bifásica destas curvas dose-resposta (Tabela 3, Figura 4B). Em átrios direitos de ratos tratados com a dieta hiperlipídica, o pré-tratamento reduziu significativamente a sensibilidade do tecido atrial a isoprenalina (Figura 4C)

**Tabela 2:** Frequência espontânea de batimentos (Basal; batimentos/min), sensibilidade ( $pD_2$ ) e resposta máxima à noradrenalina e isoprenalina ( $R_{m\acute{a}x}$ ; batimentos/min) em átrios direitos isolados de ratos após quatro semanas de tratamento com dieta padrão (normolipidêmico-N) ou dieta hiperlipídica (hiperlipidêmico-H) sedentários (S) ou submetidos à natação (T). O protocolo de natação constou de sessões diárias de natação de 50 min em tanque de vidro com água a  $34\pm 2^\circ\text{C}$  durante 20 dias, 5 dias por semana.

<b>Agonistas/Grupos</b>	<b>N</b>	<b>Basal (bpm)</b>	<b><math>pD_2</math></b>	<b><math>R_{m\acute{a}x}</math> (bpm)</b>
<b><i>Noradrenalina</i></b>				
NS	4	245±9	7,44±0,09	157±20
NT	7	248±6	6,52±0,25*	161±7
HS	6	243±7	6,65±0,17*	185±15
HT	7	211±10	7,15±0,04**#	185±12
<b><i>Isoprenalina</i></b>				
NS	6	245±8	8,37±0,12	193±13
NT	11	240±9	8,94±0,09*	171±15
HS	10	223±10	8,52±0,10	187±7
HT	7	210±7	8,55±0,08	207±6

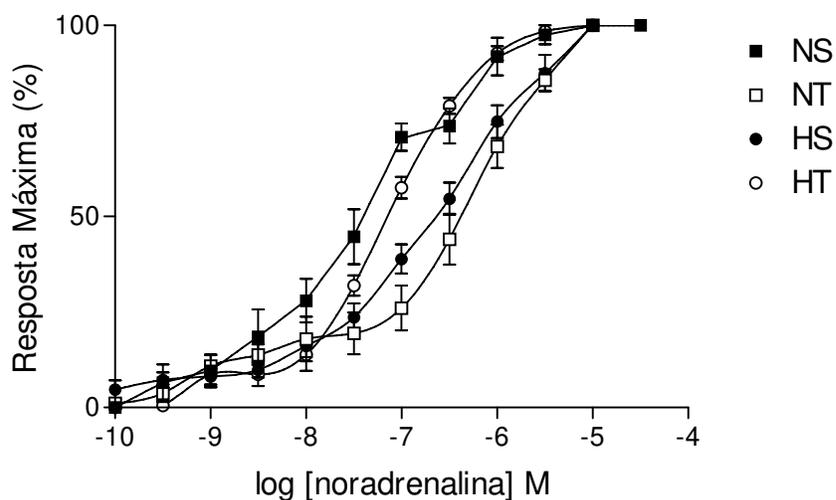
Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM. Diferenças estatísticas ( $p < 0.05$ ): \* comparado ao grupo NS, \*\* comparado ao grupo NT, # comparado ao grupo HS (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

**Tabela 3:** Efeitos dos bloqueios do sistema de captação neuronal e extraneuronal combinados sobre a potência (pD<sub>2</sub>) da noradrenalina e isoprenalina em átrios direitos isolados de ratos após quatro semanas de tratamento com dieta padrão (normolipidêmico-N) ou dieta hiperlipídica (hiperlipidêmico-H) sedentários (S) ou submetidos à natação (T). O protocolo de natação constou de sessões diárias de natação de 50 min em tanque de vidro com água a 34±2°C durante 20 dias, 5 dias por semana.

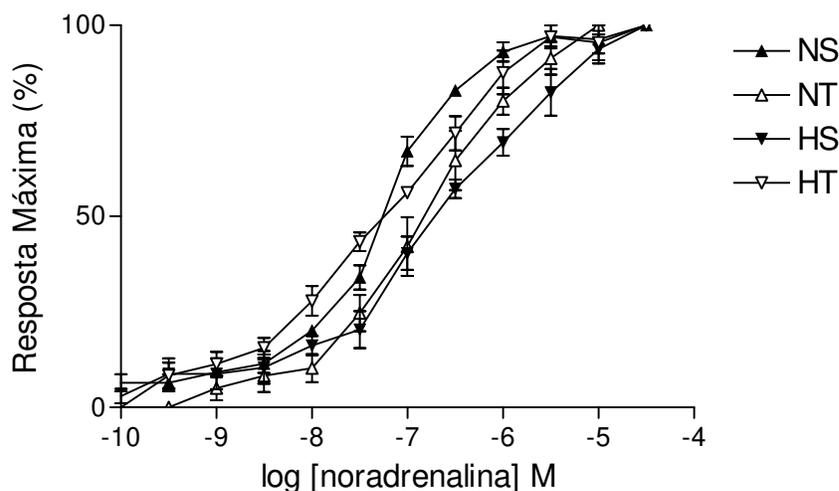
Agonistas/Grupos	n	pD <sub>2</sub> pré-bloqueio	pD <sub>2</sub> pós-bloqueio
Noradrenalina			
NS	4	7,44±0,09	7,26±0,07
NT	7	6,52±0,25*	6,81±0,33* <sup>••</sup>
HS	6	6,65±0,17*	6,80±0,10*
HT	7	7,15±0,04** <sup>#</sup>	7,27±0,07** <sup>#</sup>
Isoprenalina			
NS	6	8,37±0,12	8,28±0,07
NT	11	8,94±0,09*	8,34±0,06 <sup>••</sup>
HS	10	8,52±0,10	7,91±0,11* <sup>++</sup>
HT	7	8,55±0,08	8,20±0,10

Os dados estão apresentados como média ± EPM. Diferenças estatísticas (p<0.05):\* comparado ao grupo NS, \*\* comparado ao grupo NT, # comparado ao grupo HS, <sup>++</sup> comparado ao grupo HS pré-bloqueio, <sup>••</sup> comparado ao grupo NT pré bloqueio (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

A

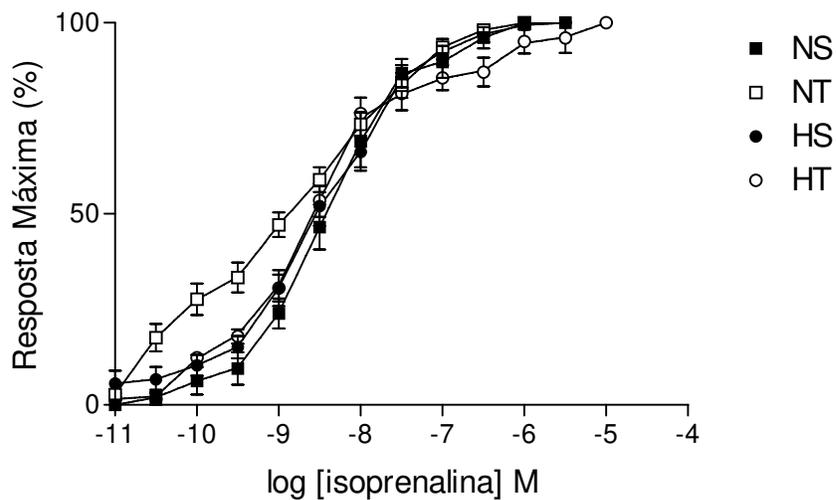


B

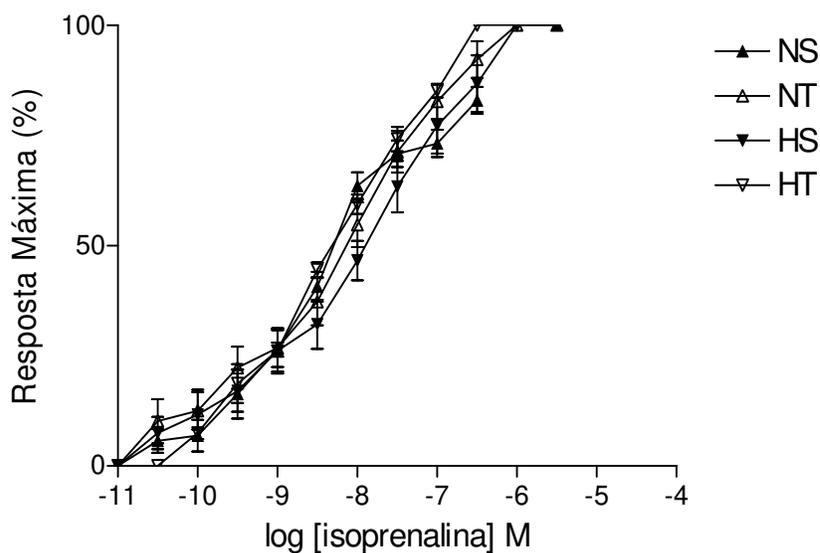


**Figura 1:** Curva dose-resposta para efeitos cronotrópicos da noradrenalina sem pré tratamento (A) e com pré tratamento (B) em átrios direitos isolados de ratos após quatro semanas de tratamento com dieta padrão (normolipidêmico-N) ou dieta hiperlipídica (hiperlipidêmico-H) sedentários (S) ou submetidos à natação (T). O protocolo de natação constou de sessões diárias de natação de 50 min em tanque de vidro com água a  $34 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 20 dias sendo 5 dias por semana. As diferenças estatísticas estão na tabela 2.

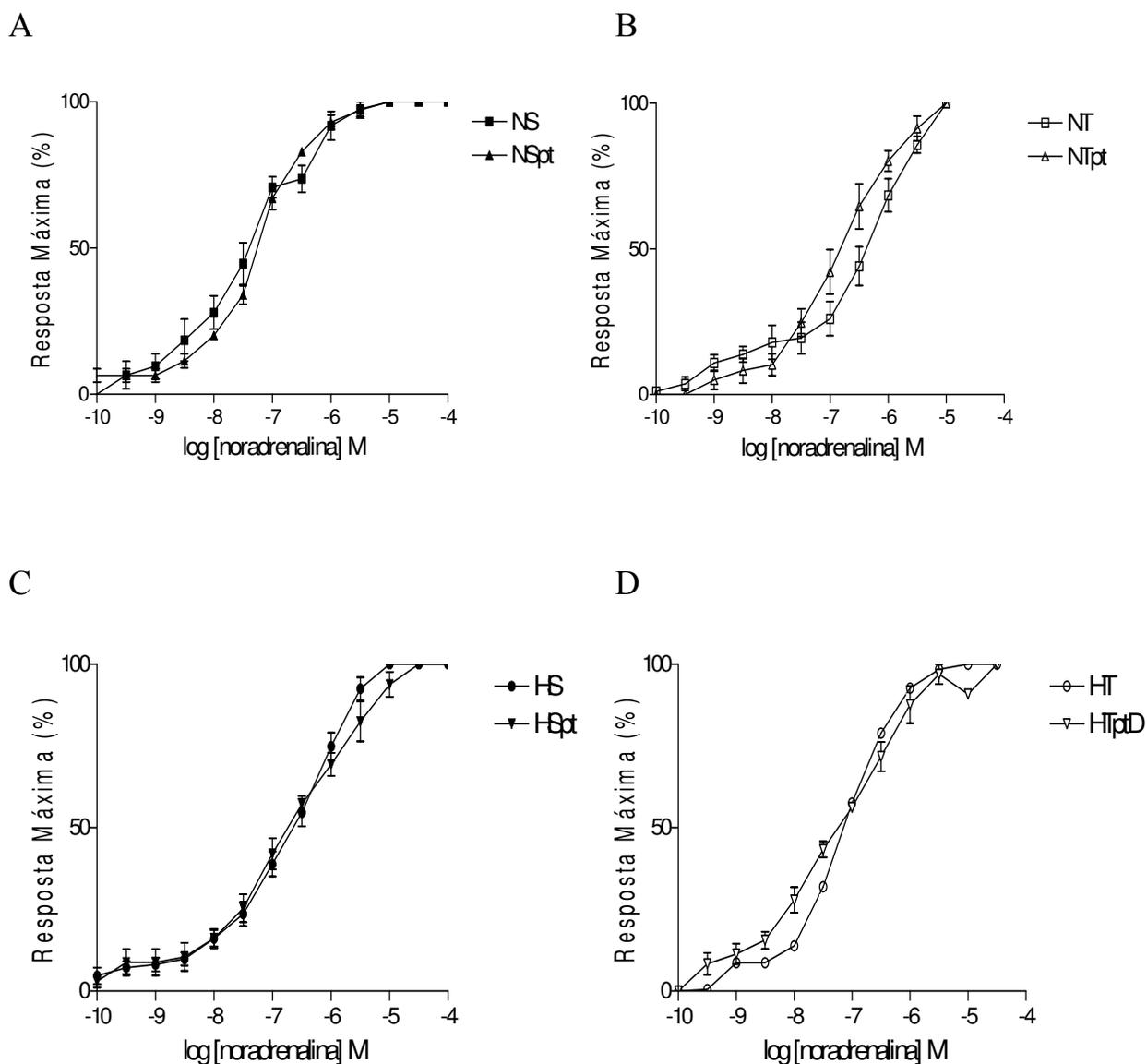
A



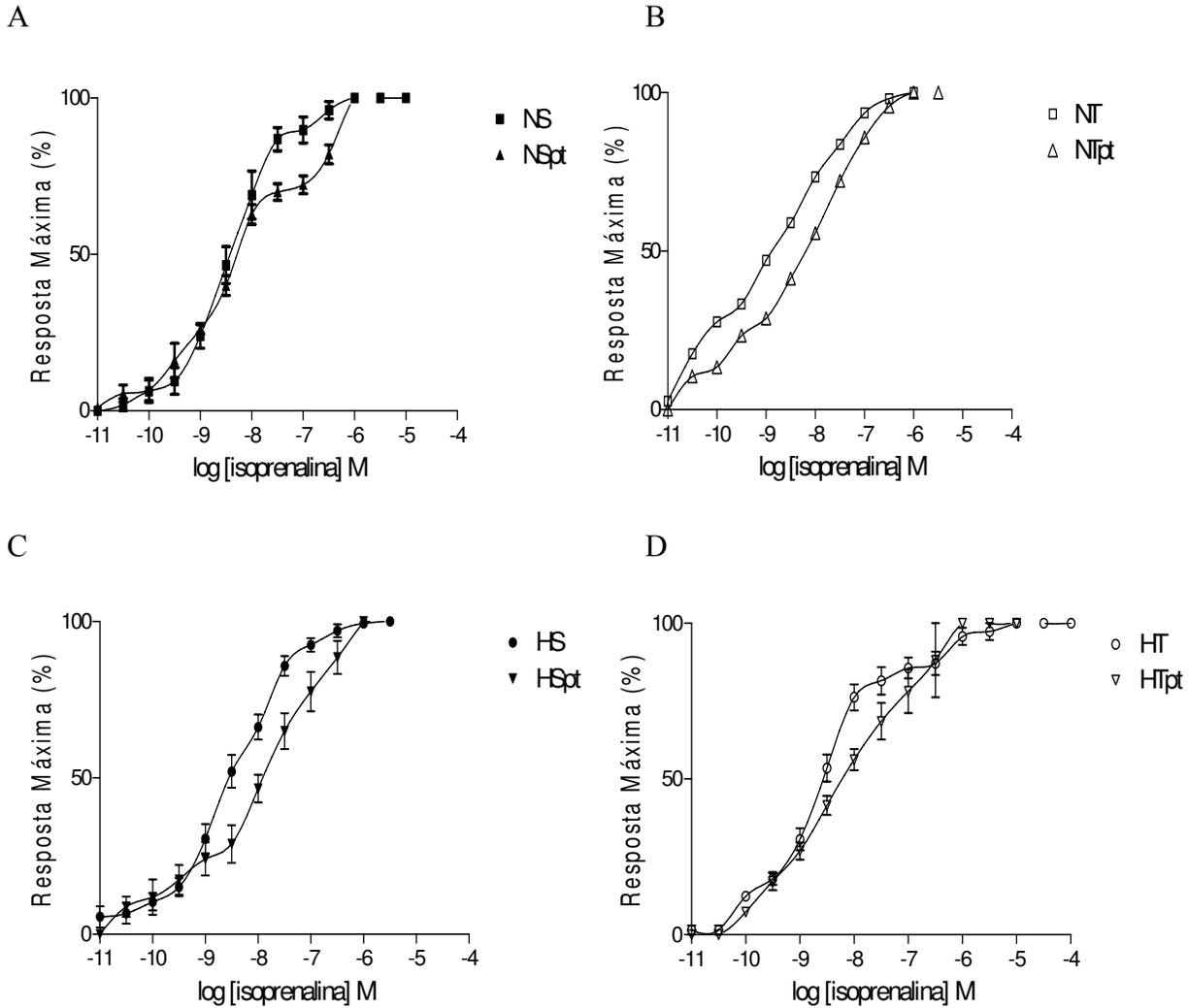
B



**Figura 2:** Curva dose-resposta para efeitos cronotrópicos da isoprenalina sem pré tratamento (A) e com pré tratamento (B) em átrios direitos isolados de ratos após quatro semanas de tratamento com dieta padrão (normolipidêmico-N) ou dieta hiperlipídica (hiperlipidêmico-H) sedentários (S) ou submetidos à natação (T). O protocolo de natação constou de sessões diárias de natação de 50 min em tanque de vidro com água a  $34 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 20 dias sendo 5 dias por semana. As diferenças estatísticas estão na tabela 2.



**Figura 3:** Curvas dose-resposta para efeitos cronotrópicos da noradrenalina em átrios direitos isolados de ratos após quatro semanas de tratamento com dieta padrão, normolipidêmicos sedentários (NS) e normolipidêmicos sedentários pré-tratados (NSpt) (A) ou submetidos à natação (NT) e submetidos à natação pré-tratados (NTpt) (B). Após quatro semanas de tratamento com dieta hiperlipídica, hiperlipidêmicos sedentários (HS) e hiperlipidêmicos sedentários pré-tratados (HSpt) (C) ou submetidos à natação (HT) e submetidos à natação pré-tratados (HTpt) (D). O protocolo de natação constou de sessões diárias de natação de 50 min em tanque de vidro com água a  $34 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 20 dias sendo 5 dias por semana. As diferenças estatísticas estão na tabela 2.



**Figura 4:** Curvas dose-resposta para efeitos cronotrópicos da isoprenalina em átrios direitos isolados de ratos após quatro semanas de tratamento com dieta padrão, normolipidêmicos sedentários (NS) e normolipidêmicos sedentários pré-tratados (NSpt) (A) ou submetidos à natação (NT) e submetidos à natação pré-tratados (NTpt) (B). Após quatro semanas de tratamento com dieta hiperlipídica, hiperlipidêmicos sedentários (HS) e hiperlipidêmicos sedentários pré-tratados (HSpt) (C) ou submetidos à natação (HT) e submetidos à natação pré-tratados (HTpt) (D). O protocolo de natação constou de sessões diárias de natação de 50 min em tanque de vidro com água a  $34 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 20 dias sendo 5 dias por semana. As diferenças estatísticas estão na tabela 2.

## V - Discussão

Resultados prévios obtidos em nosso laboratório demonstraram que a administração de dieta rica em gordura e colesterol, durante seis semanas, induz um quadro de hiperlipidemia em ratos quando, a dieta contendo 15% de gordura; 1,25% de colesterol e 0,5% de ácido fólico é oferecida aos animais a partir da (WOLF-NUNES *et al.*, 2000; MIOTTO, 2001).

Neste trabalho demonstramos que ratos que ingerem dieta hiperlipídica durante quatro semanas já apresentam dislipidemia, com aumento significativo nas concentrações séricas de colesterol total, LDL, VLDL, triacilgliceróis e de glicose quando comparados aos valores de ratos que ingeriram dieta padrão contendo 4% de gordura e sem colesterol sérico. Nenhuma alteração na fração HDL de colesterol foi observada com este período de tratamento. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Ghatta & Ramarao (2004) que demonstraram elevações significativas nas concentrações séricas de glicose, colesterol total e triacilgliceróis em ratos que ingeriram dieta rica em lipídios durante quatro semanas. Por outro lado, este grupo também demonstrou um aumento significativo de peso nos ratos. Neste trabalho, não apresentamos as alterações de peso corporal dos animais, porém resultados prévios de nosso laboratório demonstraram que, a ingestão da dieta hiperlipídica durante seis semanas não levou a qualquer alteração no peso corporal dos ratos e que os ratos que ingeriram dieta hiperlipídica apresentaram ingestão alimentar e calórica significativamente inferior àquela apresentada pelo grupo de ratos que ingeriu dieta padrão (WOLF-NUNES, 2004). Estes resultados estão de acordo com trabalhos clássicos da literatura que demonstraram diminuição na ingestão alimentar quando lipídios são administrados intraduodenalmente (NOVIN *et al.*, 1979; REIDELBERGER *et al.*, 1983; GREENBERG *et al.*, 1990). Os autores sugerem que existem receptores de nutrientes no duodeno que enviam para o cérebro sinais nervosos que desencadeiam a

sensação de saciedade e que este efeito acontece ainda no período pré-absortivo (GREENBERG *et al.*, 1990).

Ghatta & Ramarao (2004) também relataram que após o período de administração da dieta em ratos, os mesmos apresentam um quadro de resistência à insulina, acompanhando o aumento de peso e a dislipidemia. Nossos resultados mostram que houve um aumento significativo na concentração sérica de glicose nos ratos que ingeriram dieta hiperlipídica, durante quatro semanas. Estudos prévios demonstraram que esta elevação é devido à resistência à insulina causada pelo aumento da concentração de ácidos graxos livres que uma vez captados e metabolizados pelas ilhotas pancreáticas levam a ativação da enzima piruvato desidrogenase quinase (PDH). A ativação desta enzima, por sua vez, inibe o complexo PDH, inibindo assim a oxidação da glicose e, conseqüentemente, a secreção de insulina dependente de glicose. Estes autores também demonstraram a reversão deste efeito utilizando bloqueadores da oxidação de ácidos graxos, comprovando assim a relação entre ácidos graxos e resistência à insulina (BERNE, 1975; SAKO & GRILL, 1990, ZHOU, 1994; RANDLE 1998; QVIGSTAD *et al.*, 2003).

Em nosso trabalho não avaliamos a concentração sérica de insulina ou testamos a sensibilidade à insulina nos ratos que ingeriam dieta hiperlipídica, porém resultados prévios de nosso laboratório demonstraram que quando a dieta hiperlipídica foi administrada no período de seis semanas, os ratos apresentaram concentrações séricas de insulina aumentados, glicemia normal e não havia qualquer alteração na sensibilidade à insulina em adipócitos isolados destes ratos (WOLF-NUNES, 2004). Estes resultados permitem concluir que a hiperinsulinemia apresentada por aqueles ratos hiperlipidêmicos normaliza a glicemia já que os mesmos não apresentam resistência à insulina. Os ratos que ingeriram dieta hiperlipídica, por quatro semanas apresentam hiperglicemia, nós não avaliamos a insulinemia destes animais portanto a medida dos valores séricos de insulina de ratos após quatro semanas de tratamento deve ser realizada para entendimento do fato científico.

As diferenças encontradas entre os resultados obtidos por Ghatta & Ramarao (2004) e os nossos, principalmente relacionando o aumento de peso e a sensibilidade à insulina, podem ser explicadas pelas diferenças nas linhagens de ratos utilizadas (Wistar, nosso grupo e Sprague-Dawley, GHATTA & RAMARAO, 2004). Vários relatos na literatura apontam importantes diferenças de respostas aos mesmos protocolos experimentais ou protocolos semelhantes entre as linhagens citadas e/ou outras linhagens de ratos (PERRIN *et al.*, 2003; IMAMURA & SHIMADA, 2005; ZAMUDIO *et al.*, 2005).

A prática da atividade física regular é adotada e recomendada pela maioria dos médicos, como uma estratégia terapêutica importante para normalização da dislipidemia e para redução de patologias cardiovasculares. Estudos em humanos já vêm sendo feitos há muitos anos mas existem muitas diferenças quanto à intensidade e frequência das atividades físicas propostas e a relação das mesmas com a melhora do perfil lipídico dos voluntários. Além disto é questionado se o índice de melhora no perfil lipídico estaria mais relacionado à perda de peso que o exercício proporciona do que com alterações enzimáticas relacionadas ao aumento na degradação dos triacilgliceróis, colesterol total e suas frações (HUTTUNEN *et al.*, 1979; GRANDJEAN *et al.*, 2000; NIEMAN *et al.*, 2002). É consenso que o exercício físico praticado por humanos, em diferentes intensidades, eleva a fração HDL de colesterol, sendo, por isso, uma prática extremamente saudável (KING *et al.*, 1995; FERGUSON, 1998).

Em nossos estudos o protocolo de treinamento proposto não alterou o perfil lipídico de ratos normolipidêmicos.

Em relação aos ratos que receberam dieta hiperlipídica associada ao treinamento físico observamos que o protocolo de exercício proposto evitou que houvesse aumento significativo nas concentrações séricas de glicose, triacilgliceróis e na fração VLDL de colesterol. Foi observado anteriormente que ocorre aumento da captação de glicose resultante da maior sensibilidade à insulina

em músculos esqueléticos perfundidos de ratos treinados (BERGER *et al.*, 1979; ZAVARONI *et al.*, 1980). O aumento da eficiência da captação glicolítica causada pelo exercício, leva à redução nas concentrações plasmáticas de insulina. Como o aumento na concentração sérica de insulina está associada a maior secreção hepática de VLDL-TG, uma diminuição na concentração de insulina resulta na diminuição da secreção de VLDL-TG (BERGER *et al.*, 1979; ZAVARONI *et al.*, 1980).

Por outro lado, o exercício físico não evitou o aumento significativo nas concentrações séricas de colesterol total e da fração LDL de colesterol. Entretanto, estes aumentos foram significativamente inferiores àqueles obtidos em ratos que ingeriram a ração rica em lipídeos e que se mantiveram sedentários. Wood *et al.* (1991), num estudo com humanos, demonstraram que o exercício físico causa apenas pequena alteração nos valores de LDL. Buck *et al.* (1989), demonstraram haver apenas uma ligeira alteração nas concentrações plasmáticas de colesterol total em ratos hiperlipidêmicos treinados com natação até exaustão com sobrecarga de 5% do peso corporal, 5 vezes por semana durante 7 semanas. A lipoproteína LDL é composta de 40 a 45% de colesterol e a lipoproteína VLDL de 10 a 15% de colesterol. Como o exercício pouco altera as concentrações plasmáticas de LDL, as concentrações de colesterol total também permanecem altas, independente do exercício evitar significativamente o aumento nas concentrações plasmáticas de VLDL, visto que esta lipoproteína é composta de uma quantidade bem menor de colesterol. Estes resultados refletem nos valores do índice aterogênico dos ratos treinados que ingeriram a dieta hiperlipídica, que foi significativamente menor que dos ratos hiperlipidêmicos sedentários e não diferentes daqueles dos ratos normolipidêmicos sedentários.

Em qualquer tecido, a sensibilidade às catecolaminas é determinada pelo tipo e/ou subtipo de adrenoceptor que medeia sua ação, associada com a eficiência dos sistemas de metabolização das catecolaminas, os quais limitam a meia vida destes hormônios/neurotransmissores na biofase. A

resposta cronotrópica cardíaca às catecolaminas de átrios de ratos machos é mediada principalmente pelos adrenoceptores  $\beta_1$  ( $\beta_1$ -ARs) (BRYAN *et al.*, 1981; O'DONNELL & WANSTALL 1985; JUBERG *et al.*, 1985). Embora não estando relacionado à resposta cronotrópica à noradrenalina em átrios direitos de ratos (MINNEMAN *et al.*, 1979; MINNEMAN & MOLINOFF, 1980; MOLINOFF *et al.*, 1981) os adrenoceptores  $\beta_2$  ( $\beta_2$ -ARs) participam juntamente com os  $\beta_1$ -ARs da resposta cronotrópica positiva a altas concentrações de (-)-adrenalina (KAUMANN, 1986).

Nos resultados apresentados nesta tese observamos que após terem se alimentado com dieta hiperlipídica durante quatro semanas, os ratos apresentaram subsensibilidade dos átrios direitos isolados à noradrenalina, agonista seletivo  $\beta_1$ -AR, sem, alteração na sensibilidade atrial à isoprenalina, agonista não seletivo  $\beta_1$ -AR e  $\beta_2$ -AR. Subsensibilidade aos efeitos de agonistas pode ser causada por vários fatores como, por exemplo, aumento da atividade dos sistemas de metabolização das catecolaminas, diminuição do número de  $\beta$ -AR, decorrentes da contínua presença de catecolaminas na fenda sináptica ou (GANGULY, 1991; CATELLANO & BÖHN, 1997; ZANESCO *et al.*, 1997; COMMUNAL *et al.*, 1998), diminuição da afinidade entre o agonista e o receptor, causada por alteração na estrutura do receptor (COLLINS *et al.*, 1990; HEIN & KOBILKA, 1995; GUDBJARNASON & BENEDIKTSDÓTTIR, 1995), ou ainda por alterações do ambiente lipídico da membrana (BRODERICK *et al.*, 1989; HAENEN *et al.*, 1990; GUDBJARNASON & BENEDIKTSDÓTTIR, 1996; BREHM *et al.*, 1998), e/ou por alteração das vias intracelulares de sinalização que conduzem ao efeito (LURIE *et al.*, 1985; GUDBJARNASON & BENEDIKTSDÓTTIR, 1995).

Lewis *et al.* (1982), estudando tecido cardíaco de coelhos hipercolesterolêmicos e Lurie *et al.*, (1985) estudando hemácias de codornas alimentadas com dieta rica em colesterol, demonstraram diminuição de sensibilidade para a estimulação  $\beta$  adrenérgica sem, contudo, haver alteração no

número de receptores. Além disso, Mokler *et al.* (1985) já haviam demonstrado que a interação dos  $\beta$ -AR cardíacos com o agonista isoprenalina e com o antagonista metoprolol não havia sido alterada em coelhos alimentados com dieta rica em colesterol.

Utilizando uma dieta a base de óleo de peixe, rico em ácido eicosapentaenóico, Patten *et al.* (1989) mostraram que esta dieta era rapidamente incorporada nas membranas cardíacas de macacos e alterava significativamente as propriedades de ligação de agonistas/antagonistas nos  $\beta$ -ARs. Estes autores sugeriram que as mudanças na afinidade dos  $\beta$ -ARs poderiam ser consequência de alterações na composição de ácidos graxos dos fosfolipídios da membrana ao invés de mudanças no colesterol da membrana.

Em nossos experimentos, a subsensibilidade do tecido cardíaco à noradrenalina não foi acompanhada de alteração na resposta máxima a este agonista. Miotto (2001) também demonstrou que em átrios direitos de ratos alimentados com a mesma dieta por seis semanas não houve alteração da resposta máxima à noradrenalina e ao soterenol, um agonista parcial de  $\beta$ -ARs, sugerindo não haver *downregulation* dos adrenoceptores, uma vez que sendo agonista parcial, o soterenol necessita ocupar todos os receptores para desencadear a resposta máxima e que, portanto, alteração do número de receptores levaria a alteração de sua resposta máxima. Sugerimos, então, que provavelmente o número de adrenoceptores não está alterado em nossos ensaios já que não há alteração na resposta máxima e que o tempo de administração da dieta é menor quando comparado àquele de Miotto (2001). Com estas informações podemos inferir que, provavelmente, o mecanismo responsável por esta subsensibilidade é semelhante àquele proposto por Lewis *et al.* (1982) e por Lurie *et al.* (1985), que observaram diminuição de sensibilidade sem alteração no número de receptores.

A possibilidade de que os sistemas de recaptção poderiam ter sido afetados pelos lipídios e/ou colesterol da dieta encontra embasamento na literatura. Vários autores já sugeriram que

pode haver inibição da recaptação extraneuronal da noradrenalina por certos esteróis, incluindo o colesterol (IVERSEN & SALT, 1970; BLOOM *et al.*, 1975; RIBEIRO *et al.*, 1998). Eildeman *et al.* (1978) observaram *in vitro* que o extrato de  $\beta$ -lipoproteína potencializava os efeitos da noradrenalina em vasos sanguíneos cerebrais por reduzir a atividade da enzima monoamino oxidase (MAO). Tais efeitos também são relatados em músculo cardíaco e, como consequência, tenderiam a potencializar os efeitos do neurotransmissor por sua exposição mais prolongada na fenda sináptica (BLOOM *et al.*, 1975). Entretanto, nossos resultados demonstraram que a inibição da recaptação neuronal e extraneuronal não alterou a subsensibilidade relacionada à dieta hiperlipídica observada entre grupos ou mesmo com o programa de atividade física proposto.

Considerando então que, provavelmente, o número de adrenoceptores não está alterado e que os processos de metabolização dos agonistas também não estão alterados em átrios isolados de ratos hiperlipidêmicos, a subsensibilidade atrial aos efeitos cronotrópicos da noradrenalina poderia ser atribuída à diminuição de afinidade entre o agonista e a população de receptores e/ou à alteração dos mecanismos celulares de transdução de sinal (KENAKIN, 1993).

Alterações na composição de ácidos graxos da bicamada lipídica da membrana do músculo cardíaco, induzida por dietas gordurosas (CRANDAL *et al.*, 1983; PATTEN *et al.*, 1989), associada a alterações na concentração plasmática de lipídios e de catecolaminas podem ter importantes implicações na função dos  $\beta$ -AR (HAENEN *et al.*, 1990; GANGULY, 1991; GUDBJARNASON & BENEDIKTSDÓTTIR, 1996). Logo, a interação de um agonista ou antagonista com um receptor não dependeria apenas das propriedades estruturais destes compostos ou dos próprios receptores, mas poderia ser também influenciada pelo ambiente lipídico da membrana (GUDBJARNASON & BENEDIKTSDÓTTIR, 1996). De acordo com esta hipótese, os lipídios que circundam as moléculas do receptor poderiam modular sua atividade ao interferirem em sua estrutura tridimensional e,

conseqüentemente, modificar a afinidade aos ligantes. Além disso, o estado físico do domínio lipídico onde se insere o receptor poderia regular sua mobilidade lateral na membrana, e a interação do complexo ligante receptor com a molécula transdutora da proteína G a qual, por sua vez, modificaria a atividade das moléculas efetoras que geram sinais intracelulares (LURIE *et al.*, 1985; GUDBJARNASON & BENEDIKTSDÓTTIR, 1995).

Além disto, as funções intracelulares podem ser inativadas pelo estresse oxidativo tanto diretamente, pela produção de radicais livres como indiretamente, por meio da perturbação da membrana lipídica (HAENEN *et al.*, 1990; PETERS *et al.*, 1997). BREHM *et al.* (1998) propuseram que existiria um complexo *cross-talk* entre receptores  $\beta$  adrenérgicos e receptores de LDL, visto que um aumento na concentração de AMPc resulta em elevada expressão de receptores de LDL. Estes autores demonstraram que valores moderadamente elevados de LDL resultaram em diminuição na densidade de  $\beta$ -AR acoplados funcionalmente sem, contudo, haver alterações na relação  $\beta_1$ -/ $\beta_2$ -AR em artérias coronárias. HAENEN *et al.* (1990) observaram que em membranas cardíacas isoladas, a função dos  $\beta$ -AR era reduzida por estresse oxidativo, sugerindo que o acoplamento entre a enzima adenilil ciclase e o receptor estaria enfraquecida pois os autores observaram que havia um aumento no número de  $\beta$ -AR enquanto a formação de AMPc estava reduzida, em membranas de ventrículos. Em átrio esquerdo e fatias de ventrículo direito a eficácia de agonistas  $\beta$ -AR foi reduzida em 30%, enquanto a resposta máxima mediada por  $\beta$ -AR foi reduzida para 50%. Membranas de átrio esquerdo expostas ao estresse oxidativo não apresentaram alteração na densidade de  $\beta$ -AR, nem na afinidade à isoprenalina. Aparentemente, o efeito que o estresse oxidativo tem sobre a fluidez da membrana, via indução de peroxidação de lipídios, pode explicar a redução na formação de AMPc pelo estresse oxidativo em átrio esquerdo. Contudo, não se pode excluir que os radicais livres produzidos durante o estresse oxidativo inibam diretamente a formação de AMPc, por exemplo, por inativar a proteína G.

PETERS *et al.* (1997) sugerem ainda que é provável que ocorram lesões de outros componentes subcelulares que podem ter importante papel na transdução dos estímulos  $\beta$ -adrenérgicos, abrindo desta forma sua resposta.

O colesterol é um importante componente lipídico de membranas plasmáticas de células de mamíferos (BRODERICK *et al.*, 1989) e é também crescente o interesse do papel desempenhado pelos ácidos graxos insaturados e pelo colesterol na função da membrana celular de cardiomiócitos, no que se refere ao desenvolvimento de fibrilação ventricular e morte cardíaca súbita. A ingestão de gorduras polinsaturadas altera a composição de ácidos graxos e aumenta a fluidez da membrana celular (LURIE *et al.*, 1985; MARINETTI, 1990). Por sua vez, uma elevada ingestão de gorduras saturadas pode ter efeito contrário. Aumento da fluidez da bicamada lipídica da membrana de hepatócitos e de eritrócitos aumenta a atividade estimulada da adenilil ciclase, e a síntese de AMPc, provavelmente por favorecer a estimulação do complexo  $\beta$ -AR-proteína G-subunidades catalíticas da adenilil ciclase. Por outro lado, o enrijecimento da bicamada lipídica da membrana celular, como foi observado em eritrócitos de codornas alimentadas com dieta rica em colesterol, causa efeitos opostos, tais como a perda de até 50% na sensibilidade à estimulação adrenérgica, avaliada por meio da quantidade de AMPc formado em resposta à estimulação pela isoprenalina (LURIE *et al.*, 1985). Mudanças significativas nos fosfolípidios de membrana podem também servir para regular as propriedades de *binding* dos receptores de membrana, sua afinidade ou o número de sítios de *binding* (GUDBJARNASON & BENEDIKTSDÓTTIR, 1995).

Interessante que resultados prévios de nosso laboratório demonstraram que não houve apenas subsensibilidade à noradrenalina, mas também que houve subsensibilidade à isoprenalina e ao soterenol em átrios direitos isolados de ratos machos hiperlipidêmicos, aos quais a dieta rica em colesterol foi administrada durante seis semanas. Como já mencionado acima, em átrios direitos

isolados destes ratos a resposta máxima ao soterenol não foi alterada, o que sugere que não houve alterações no número de adrenoceptores estimulados por este agonista. Também não foram observadas alterações decorrentes dos sistemas de metabolização dos agonistas. Finalmente, não foram observadas alterações nos valores  $pK_{\beta}$  do CGP20701A, indicando que não houve mudanças na afinidade deste antagonista para o  $\beta_1$ -AR e conseqüentemente, alterações na estrutura do receptor promovidas pela dieta (Miotto, 2001). O autor sugeriu que alterações nos mecanismos intracelulares de transdução de sinal (pós-receptor) poderiam justificar às alterações de sensibilidade aos agonistas adrenérgicos dos átrios direitos isolados de ratos hiperlipidêmicos (MIOTTO, 2001). O fato de diminuição de sensibilidade, em átrios direitos isolados de ratos hiperlipidêmicos, em quatro semanas de administração de dieta, ser observada apenas à noradrenalina e após mais duas semanas de tratamento a sensibilidade ser observada também à isoprenalina nos sugere que os mecanismos envolvidos com a resposta celular ao estímulo do adrenoceptor  $\beta_1$  já estão alterados na quarta semana de tratamento e que neste mesmo tempo existe uma compensação na resposta à isoprenalina o que não permite a visualização de tal fenômeno para este agonista, já que não é seletivo para os subtipos de adrenoceptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$ . O tempo adicional de duas semanas de tratamento com a dieta iguala a sensibilidade do tecido aos dois agonistas. Os fatores envolvidos nestes efeitos devem ser melhor investigados.

As concentrações de noradrenalina aumentam durante o exercício mais do que adrenalina. Como os  $\beta_1$ -AR são mais sensíveis à noradrenalina do que à adrenalina (KAUMANN, 1997), este subtipo pode ser seletivamente down-regulado depois de exercício crônico. E, como os  $\beta_2$ -AR são menos sensíveis à noradrenalina do que à adrenalina, este subtipo de  $\beta$ -AR pode não ser afetado pelo treinamento físico (BARBIER *et al.*, 2004). Já que a isoprenalina também tem maior afinidade por  $\beta_2$ -AR talvez por este fato, a sensibilidade a ela não tenha diminuído, porém nossos resultados

demonstraram supersensibilidade á isoprenalina, corroborando os de Takeda *et al.* (1984) que verificaram aumento na sensibilidade á isoprenalina, devido ao aumento da afinidade do receptor pela catecolamina. Resultados semelhantes aos nossos demonstrando redução da sensibilidade a noradrenalina e aumento da sensibilidade à isoprenalina foram previamente relatados em estudos com adipócitos FARIAS-SILVA *et al.* 1999) e com átrios direitos isolados de ratos submetidos ao estresse por choque nas patas (VANDERLEI *et al.*, 1996, MARCONDES *et al.*, 1996, BASSANI *et al.*, 1988, NOURANI *et al.*, 1992).

Em ratos alimentados com dieta hiperlipídica, o treinamento evitou as alterações de sensibilidade à noradrenalina e isoprenalina causadas pela hiperlipidemia, visto que, a curva dose-resposta à noradrenalina em átrios direitos de ratos hiperlipidêmicos treinados (grupo HT) não difere significativamente da obtida em átrios direitos isolados de ratos normolipidêmicos sedentários (Figuras 1A e 2A). A ausência de efeitos na sensibilidade atrial quando associamos a dieta ao programa de treinamento, provavelmente indica que o programa de treinamento impediu os efeitos deletérios da dieta hiperlipídica, através da prevenção do aumento das concentrações séricas de colesterol total, triacilgliceróis, VLDL e LDL (Tabela 1). Dados da literatura (BREHM *et al.*, 1998) demonstram que o aumento nos níveis plasmáticos de LDL reduzem a sensibilidade atrial aos agonistas noradrenalina e isoprenalina, portanto, redução nos níveis plasmáticos de LDL restauram a sensibilidade atrial a estes agonistas. Porém, não podemos deixar de ressaltar que esta associação fez com que não observássemos os efeitos benéficos do exercício físico na resposta atrial. Este fenômeno deve ser melhor investigado.

O pré-tratamento com bloqueadores do sistema de recaptação neuronal e extraneuronal não alterou a sensibilidade dos átrios direitos isolados dos animais controle ao agonista noradrenalina nem dos animais que ingeriram a dieta hiperlipídica (Tabela 3). Este resultado indica que a dieta não afeta os sistemas de metabolização da noradrenalina, portanto, a subsensibilidade à noradrenalina observada antes do pré-tratamento, está sendo induzida apenas por dessensibilização

de  $\beta_1$ -AR, diferentemente do resultado observado em átrios direitos isolados de ratos submetidos à estresse por choque nas patas, que apresentaram aumento da eficiência da recaptação neuronal e extraneuronal (MARCONDES *et al*, 1996).

A dieta hiperlipídica não altera a sensibilidade do tecido atrial à isoprenalina, porém, com o pré-tratamento há uma diminuição na sensibilidade do tecido a este agonista. A isoprenalina ativa os  $\beta_2$ -ARs pré-sinápticos que induzem à liberação nervosa de noradrenalina (MIAN *et al*, 1991). Assim, antes do pré-tratamento, agem no tecido tanto isoprenalina como noradrenalina. Quando é feito o pré-tratamento, esta liberação de noradrenalina é suprimida e há apenas o efeito da isoprenalina sobre os  $\beta_1$ -ARs, que estão dessensibilizados.

A atividade física proposta promove subsensibilidade à noradrenalina. o pré-tratamento com bloqueadores do sistema de recaptação neuronal e extraneuronal dos átrios direitos isolados deste grupo de animais não abole esta subsensibilidade, entretanto, reduz o desvio da curva-dose-resposta para este agonista. O fato do pré-tratamento não alterar a sensibilidade do tecido atrial direito do grupo controle e alterar a sensibilidade atrial do grupo submetido à atividade física indica que o exercício aumenta a atividade dos sistemas de metabolização da noradrenalina. E como, mesmo após o pré-tratamento ainda continuou a subsensibilidade, parte desta deve estar sendo promovida por dessensibilização de  $\beta_1$ -ARs.

Na ausência do pré-tratamento, a atividade física promove supersensibilidade à isoprenalina, o pré-tratamento abole esta supersensibilidade. Analisando a curva-dose-resposta à isoprenalina antes do bloqueio, há um deslocamento maior no início da curva, indicando maior sensibilidade nas doses mais baixas, esta supersensibilidade inicial é abolida após o pré-tratamento. Esta resposta indica que a supersensibilidade está sendo causada por maior liberação de noradrenalina pelo terminal pré-sináptico via ativação adrenalina- $\beta_2$ -pré-sináptico, visto que, a atividade física aumenta

as concentrações plasmáticas de noradrenalina e adrenalina e que a adrenalina ativa os  $\beta$ 2-ARs pré-sinápticos aumentando a liberação de noradrenalina (COPPES *et al*, 1995).

Os mecanismos moleculares envolvidos nas alterações de sensibilidade cardíaca observadas nesta tese devem ser investigados já que estes resultados contribuirão, em muito, para esclarecimentos dos efeitos benéficos do exercício físico e aqueles deletérios provenientes da ingestão de uma dieta rica em lipídios. Estes esclarecimentos são necessários já que fazemos parte de uma população que está a cada dia mais sedentária e apresentando patologias associadas às dislipidemias.

## VI – Referências Bibliográficas

As referências desta tese estão de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas para documentação. NBR 6023 Agosto de 2002, pág 14, item 8.1.1.1. “Quando existirem mais de três autores, indicar o primeiro, apresentando-se a expressão *et al.*”

AHLQUIST, R. P. A study of adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol.*, 153:586-600, 1948.

ALONSO, R., GRANT, G., MARZO, F. Thermal treatment improves nutritional quality of pea seeds (*Pisum sativum* L.) without reducing their hypocholesterolemic properties. *Nutr. Res.*, 21(7): 1067-1077, 2001.

BARBIER, J., *et al.* Effect of training on  $\beta_1$   $\beta_2$   $\beta_3$  adrenergic and  $M_2$  Muscarinic Receptors in rat heart. *Med. & Sci. in Sports & Exerc.*, 36(6): 949-954, 2004.

BARON, A. D. Insulin and the vasculature - Old actors, new roles. *Journal of Investigative Medicine*, 44(8): 406-412, 1996.

BASSANI, R. A., DE MORAES, S. Effects of repeated footshock stress on the chronotropic responsiveness of the isolated pacemaker of the rat: role of beta-2 adrenoceptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 246(1): 316-321, 1988.

BERGER, M., KEMMER, F. W., BECKER, K. Effect of physical training on glucose tolerance and on glucose metabolism of skeletal muscle in anesthetized normal rats. *Diabetologia*, 16: 179-84, 1979.

BERNE, C. The oxidation of fatty acids and ketone bodies in mouse pancreatic islets. *Biochem. J.*, 152: 661, 1975

- BESSE, J.C. & FURCHGOTT, R.F. Dissociation constants and relative efficacies of agonists acting on alpha adrenergic receptors in rabbit aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.197, n.1, p.66-78, 1976
- BLOOM, D., MCCALDEN, T.A. & ROSENDORFF, C. The effects of hypercholesterolemic plasma on vascular sensitivity to noradrenaline. *Br. J. Pharmac.*, 54: 421-7, 1975.
- BONORA, E., KIECHL, S., WILLEIT, J. Prevalence of insulin resistance in metabolic disorders – The Bruneck study. *Diabetes*, 47: 1643-9, 1998.
- BØNAA, K.H., ARNESEN, E. Association between heart rate and atherogenic blood lipid fractions in a population (The Tromsø Study). *Circulation*, 86: 394-405, 1992.
- BREHM, B. R., *et al.* Downregulation of  $\beta$ -adrenergic receptors by low-density lipoproteins and its prevention by  $\beta$ -adrenegic receptor antagonists. *Cardiovascular Research*, 38(2): p.522-530, 1998.
- BRODDE, O.E.  $\beta_1$  and  $\beta_2$  adrenoceptors in the human heart: properties, function and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol. Rev.*, 43: 203-242, 1991.
- BRODERICK, R., BIALECKI, R. & TULENKO, T.N. Cholesterol-induced changes in rabbit arterial smooth muscle sensitivity to adrenergic stimulation. *Am. J. Physiol. (Heart. Circ. Physiol.)*, 26: H170-H178, 1989.
- BRUMMELEN, P. V. The relevance of intrinsic sympatyhomimetic activity for  $\beta$ -blocker-induced changes in plasma lipids. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 5: S51-S55, 1983.

- BRYAN, L. J., *et al.* A study designed to explore the hypothesis that beta1 adrenoceptors are “innervated” receptors, and beta2 adrenoceptors are “hormonal” receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 216: 395-400, 1981.
- BUCK, E. E., FERNHALL, B., MANFREDI, T. G. Influence of exercise and cholesterol feeding on lipids and lipoproteins in rats. *J. Sports Med. Phys. Fitness*, 19(1): 71-6, 1989.
- BÜNEMANN, M., *et al.* Desensitization of G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system. *Annu. Rev. Physiol.*, 61: 169-192, 1999.
- CARLSSON, E., *et al.* Differentiated blockade of the chronotropic effects of various adrenergic stimuli in the cat heart. *Life. Sci.*, 11: 953-958, 1972.
- CASTELLANO, M. & BÖHM, M. The cardiac  $\beta$ -adrenoceptor-mediated signaling pathway and its alterations in hypertensive heart disease. *Hypertension*, 29: 715-722, 1997.
- CHIU, P., COOK, S.J., SMALL, R.C.  $\beta$ -adrenoceptor subtypes and the opening of plasmalemmal K<sup>+</sup>-channels in bovine tracheal muscle: studies of mechanical activity and ion fluxes. *Br. J. Pharmacol.*, 109: 1149-1156, 1993.
- CLAPHAM, D.E. Direct G protein activation of ion channels. *Annu. Rev. Neurosci.*, 17: 441-464, 1994.
- COLLINS, S., *et al.* Mechanisms involved in adrenergic receptor desensitization. *Biochem. Soc. Trans.*, 18: 541-544, 1980.
- COMMUNAL *et al.*, Myocardial  $\beta$ -adrenergic reactivity in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in the rat. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 12: 590-598, 1998.

- COOK, S.J., *et al.*  $\beta$ -adrenoceptor subtypes and plasmalemmal  $K^+$ -channels in tracheals muscle. *Br. J. Pharmacol.*, 109: 1140-1148, 1993.
- COOPES, R. P., *et al.* Co-released adrenaline markedly facilitates noradrenaline overflow through prejunctional  $\beta_2$ - adrenoceptors during swimming exercise. *Eur. J. Pharmacol.* 274: 33-40, 1995.
- CRANDALL, D.L., *et al.* Effects of caloric restriction on cardiac reactivity and  $\beta$ -adrenoceptor concentration. *Am. J. Physiol.* (Heart. Circ. Physiol. 13), 244: H444-H448, 1983.
- DAAKA, Y., LUTTRELL, L.M. & LEFKOWITZ, R.J. Switching of the coupling of the  $\beta$ -adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*, 390: 143-146, 1997.
- DANEV, S., *et al.* Relationship between heart rate variability and hypercholesterolaemia. *Cent. Eur. Publ. Helth.* 5: 143-146, 1997.
- DEPRÉS, J.P., POULIOT, M.C., MOORJANI, S. Loss abdominal fat and metabolic response to exercise training in obese women. *Am. J. Physiol.*, 261(24): .E159-E157, 1991.
- DURSTINE, *et al.* Effect of short-duration and long-duration exercise on lipoprotein (a). *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 9: 1511-1516, 2001.
- EILDEMAN, B.H. *et al.*, Potentiation of the cerebrovascular response to intraarterial 5-hydroxytryptamine. *Am. J. Physiol.*, 234 (Heart Circ.Physiol.3): H300-304, 1978.
- ERIKSSON, B. E., *et al.* Physical Training in Syndrome X. *Journal of the American College of Cardiology*, 36: 1619-1625, 2000.

- FARIAS-SILVA, E., GRASSI-KASSISSE, D. M., WOLF NUNES, V. Stress-induced alteration in the lipolytic response to  $\beta$ -adrenoceptor agonists in rat white adipocytes. *J. of Lipid Research*, 40: 1719-27, 1999.
- FERGUSON, M. A., *et al.* Effects of four different single exercise sessions on lipids, lipoproteins, and lipoprotein lipase. *J. Appl. Physiol.*, 85(3): 1169-1174, 1998.
- FEUERSTEIN, B. L. & WEINSTOCK, R. S. Diet and exercise in type 2 Diabetes Mellitus. *Nutrition*, 13: 95-99, 1997.
- FIELD, C. J., *et al.* Diet fat composition alters membrane phospholipids composition, insulin binding and glucose metabolism in adipocytes from control and diabetic animals. *J. Biol. Chem.*, 265(19): 11143-11150, 1990.
- FONSECA, F. A. H., *et al.* Modificações dos hábitos de vida e outras opções terapêuticas. *Revista da SOCESP*:9, 1999.
- FORJAZ, C. L. M. & NEGRÃO, C. E. Sedentarismo. In. Risco cardiovascular global. Eds: Junior, D. M., Nobre, F. São Paulo, Lemos Editorial, cap 9: 127-162, 1999.
- FRANCIS, D. P. Low-cost shuttle walk test for assessing exercise capacity in chronic heart failure. *International Journal of Cardiology*, 76: 105-106, 2000.
- FRIEDWALD, W. T, LEVY, R.I., FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.*, 18: 499-502, 1972.
- FURCHGOTT, R.F. & BURSZTYN, P. Comparison of dissociation constants an relative of efficacies of selected agonists acting on parasympathetic receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 144, 882-891, 1967

- GANGULY, P.K. Impaired inotropic response to adrenergic stimulation following aortic constriction: role of oxidation product of catecholamines. *Angiology-The Journal of Vascular Disease. Adrenergic Receptors in Cardiac Hypertrophy*, 42(2): 133-139, 1991.
- GERSH, B. L., CLEMENTES, I. P. Acute myocardial infarction. A diagnosis and prognosis. In: Giuliane ER, Gersh BJ, McGoon MD. Eds. *Clinic Practice of Cardiol.*, 3<sup>rd</sup> ed. St Louis: Mosby, 1996.
- GHATTA, S., RAMARAO, P. Increased contractile responses to 5-hydroxytryptamine and Angiotensin II in high fat diet fed rat thoracic aorta. *Lipids in Health and disease*, 3: 19-24, 2004.
- GIBBONS, L. W., *et al.* Maximal Exercise test as a predictor of risk for mortality from coronary heart disease in asymptomatic men. *The Am. J. Cardiol.*, 86: 53-58, 2000.
- GINSBERG, H. N. Nonpharmacologic management of low levels of high-density lipoprotein cholesterol. *The Am. J. Cardiol.*, 86: 41L-45L, 1990.
- GONÇALVES, A. *et al.* Saúde coletiva e urgência em educação física. Ed Papyrus: 25-41, 1997.
- GRANDJEAN, P. W., STEPHEN, F. C., ROHACK, J. Influence of cholesterol status on blood lipid and lipoprotein enzyme responses to aerobic exercise. *J. Appl. Physiol.*, 89: 472-480, 2000.
- GREENBERG, D.; SMITH, G. P.; GIBBS, J. Intraduodenal infusions of fats elicit satiety in sham-feeding rats. *Am. J. Physiol.*, 259 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 28): R110-118, 1990.
- GUDBJARNASON, S., BENEDIKTSDÓTTIR, V. E. Co-regulation of adrenoceptors and the lipid environment in heart muscle during repeated adrenergic stimulation. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 27: 243-251, 1995.

- 
- . Regulation of  $\beta$  adrenoceptor properties and the lipid milieu in heart muscle membranes during stress. *Mol. Cell. Biochem.*, 163/164: 137-143, 1996.
- HAENEN, GRMM, VEERMAN, M., BAST, A. Reduction of  $\beta$ -adrenoceptor function by oxidative stress in the heart. *Free. Rad. Biol. Med.*, 9: 279-288, 1990.
- HAGBERG, J. M. Physiologic adaptations to prolonged high – intensity training in patients with coronary artery disease. *Med. Sci. Sports Exerc.* 23(6): 661-667, 1991.
- HARDMAN, A. Exercise in the prevention of atherosclerotic, metabolic and hypertensive diseases: a review. *J. Sports Sci.*, 14: 201-218, 1996.
- HAVEL, R. J. & KANE, J. P. Introduction: structure and metabolism of plasma lipoproteins. In: The metabolic and molecular bases of inherited disease, 7<sup>th</sup> ed (Scriver CR, Beudet AL, Sly WS, Valle D eds.) McGraw – Hill, New York: 1841-51, 1999.
- HEIN, L. & KOBILKA, B. K. Adrenergic receptor signal transductional and regulation. *Neuropharmacology*, 34(4): 357-366, 1995.
- HOWARD, B. V., HANNAH, J. S. Dietary fat intake and diabetes. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes*, 2: 530-537, 1995.
- HUTTUNEN, J. K., *et al.* Effect of moderate physical exercise on serum lipoproteins. A controlled clinical trial with special reference to serum high-density lipoprotein. *Circulation.*, 60(6): 1220-9, 1979

- IMAMURA, Y. & SHIMADA, H. Differential Pharmacokinetics of Acetohexamide in Male Wistar–Imamichi and Sprague–Dawley Rats: Role of Microsomal Carbonyl Reductase. *Biol. Pharm. Bull.*, 28(1):185-187, 2005.
- IVERSEN, L. L., SALT, P. J. Inhibition of catecholamine uptake-2 by steroids in the isolated rat Heart. *Br. J. Pharmacol.*, 40: 528-530, 1970.
- IVERSEN, L.L. & WILSON, H.A. Inhibition of catecholamine uptake in isolated rat heart by haloalkylamines related to phenoxybenzamine. *Br. J. Pharmacol.*, 46: 647-657, 1972
- IRIBARREN, C. Serum total cholesterol and mortality: compound factors and risk modification in Japanese-American men. *JAMA*, 273: 1926, 1995.
- 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-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 330: 193-202, 1985.
- KANNEL, W. B., BELANGER, A., D'AGOSTINO, R. Physical activity and physical demand on job and risk of cardiovascular disease and death: the Framingham Study. *Am. Heart. J.*, 112: 820-825, 1986.
- KAUFMAN, L. N., PETERSON, M. M., SMITH, S. M. Hypertension and sympathetic hyperactivity induced in rats by high-fat or glucose diets. *Am. J. Physiol.* 260 (Endocrinol. Metab. 23): E95-E100, 1991.
- KAUMANN, A. J. The  $\beta_1$  adrenoceptor antagonist CGP 20712 A unmasks  $\beta_2$ -adrenoceptors activated by (-) adrenaline in rat sinoatrial node. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 332: 406-409, 1986.

- \_\_\_\_\_. Four  $\beta$ -adrenoceptor subtypes in the mammalian heart. *Trends Pharmacol. Sci.*, 18: 71-76, 1997.
- \_\_\_\_\_ & MOLENNAR, P. Modulation of human cardiac function through 4  $\beta$ -adrenoceptor populations. *Naunyn-Scimiedeber's Arch. Pharmacol.*, 355: 667-681, 1997.
- KENAKIN, T. *Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction*. New York: Raven Press, 2<sup>nd</sup> edition: 483, 1993.
- KIM, J., *et al.* Effect of exercise intensity and frequency on lipid levels in men with coronary heart disease: training level comparison trial. *The Am. J. Cardiol.*, 87: 942-946, 2001.
- KING, A. C., *et al.* Long-term effects of varying intensities and formats of physical activity on participation rates, fitness, and lipoproteins in men and women aged 50 to 65 years. *Circulation.*, 91: 2596-2604, 1995
- KLAG, M. J. Serum cholesterol in young men and subsequent cardiovascular disease. *N. England J. Med.*, 328: 313,1993.
- KUSHEL, M., *et al.* Gi protein-mediated functional compartmentalization of cardiac  $\beta_2$ -adrenergic signaling. *J. Biol. Chem.* 274:22048-22052, 1999.
- LANDS, A. M., *et al.* Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature*, 214: 597-598, 1967.
- LAVIE, C. J., MILANI, R. V., LITTIMAN, A. B.. Benefits of cardiac rehabilitation and exercise training in secondary prevention in the elderly. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 22: 678-683, 1993.
- LEE, R. J. Fatty change and stealohepatitis. In: Lee, RJ (ed): *Diagnostic Liver Pathology*, St Louis, Mosby- Year Book: 167-194, 1994.

- LEVY, D. Stratifying the patient at risk for coronary disease: new insights from the Framingham Heart Study. *Am. Heart. J.*, 119: 712, 1990.
- LEWIS, S., *et al.* Uncoupling of myocardial beta adrenergic receptors in cholesterol fed rabbits. *Circulation (Suppl. II)*, 66: II-207, 1982.
- LURIE, K. G., CHIN, J. H., HOFFMAN, B. B. Decreased membrane fluidity and  $\beta$ -adrenergic responsiveness in the atherosclerotic quail. *Am. J. Physiol.* 249 (Heart Circ Physiol 18): H380-H385, 1985.
- MARCONDES, F. K., *et al.* Stress-induced subsensitivity to catecholamines depends on the estrous-cycle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 74: 663-9, 1996.
- MARINETTI, G. V. Disorders of lipid metabolism. Plenum Press, New York, p. 226, 1990.
- MARTIN, M. J. Serum cholesterol, blood pressure, and mortality: implications from a cohort of 361,662 men. *Lancet*, 2: 933, 1986.
- MIAN, M. A. *et al.* An inhibitory effect of isoprenaline on stimulation-induced noradrenaline release from rat atria. *Eur. J. Pharmacol.*, 213: 47-51, 1992.
- MINNEMAN, K. P., MOLINOFF, P. B. Classification and quantification of beta-adrenergic receptor subtypes. *Biochem. Pharmacol.*, 29: 1317-1323, 1980.
- \_\_\_\_\_, HEGSTRAND, L. R. K., MOLINOFF, P. B. Simultaneous determination of  $\beta_1$  and  $\beta_2$ -adrenoceptor in tissues containing both subtypes. *Mol. Pharmacol.*, 16: 34-46, 1979.

- MION, D. JR. & NOBRE, F. Risco cardiovascular global: da teoria à prática. São Paulo, Ed. Lemos, cap 1, p. 13-22, 2000.
- MIOTTO, A. M. Perfil lipídico e sensibilidade adrenérgica em átrio direito de ratos normo e hipercolesterolêmicos tratados ou não com infuso das cascas de Croton cajucara Benth. Dissertação Mestrado (Ciências Biológicas (Fisiologia) - Universidade Estadual de Campinas, 2001.
- MOKLER, C. M., ABDEL-AZIZ, M. T., HERIC, E. Effects of hypercholesterolemia on beta adrenoceptors in the rabbit heart. *Drug-Nutrient Interactions*, 3: 165-172, 1985.
- MOLINOFF, P. B., WOLF, B. B., WEILLAND, G. A. Quantitative analysis of drug-receptor interactions. I. Determination of the properties of receptor subtypes. *Life Sci.*, 29: 71-77, 1981.
- NIEMAN, D. C., *et al.* Reducing diet and/or exercise training decreases the lipid and lipoprotein risk factors of moderately obese women. *J. Am. Coll. Nut.*, 21(4): 344-350, 2002.
- NOURANI, F. R. R., SPADARI-BRATFISCH, R. C., DE MORAES S. Foot-shock stress induced supersensitivity to isoprenaline in the isolated pacemaker of rat: effects of compounds RU-34886 and RU-28362. *Gen. pharmacol.*, 23: 787-791, 1992.
- NOVIN, F.; SANDERSON, J. D.; GONZALEZ, M. Feeding after nutrient infusion: effect of hypothalamic lesion and vagotomy. *Physiol. Behav.*, 22, 107-113, 1979.
- O'DONNELL, S. R., WANSTALL, J. C. Responses to the  $\beta$ 2-selective agonist procaterol of vascular and atria preparations with different  $\beta$ -adrenoceptors population. *Br. J. Pharmacol.*, 84: 227-235, 1985.

- OLFERT, E. D., CROSS, B. M., MCWILLIAM A. A. Guide to the care and use of experimental animals. Canadian Council on Animal Care, Ottawa, Ontario, 1993.
- OLIVEIRA, M. C., *et al.* Efeito da scaca-Croton Cajucara Bth sobre os níveis plasmáticos de lipídios em coelhos hipercolesterolêmicos. In: Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), X. Livro de Resumos, p. 224, 1995.
- PATTEN, G., RINALDI, J. A., MCMURCHIE, E. J. Effects of dietary eicosapentaenoate (20:5 n 3) on cardiac beta-adrenergic receptor activity in the marmoset monkey. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 162: 686-693, 1989.
- PELS, A. E., WHITE, T. P., BLOCK, W. D. Effects of exercise training on plasma lipids and lipoproteins in rats. *J. Appl. Physiol.*, 58: 612-618, 1985.
- \_\_\_\_\_, TERPSTRA, A. H. M., WHITE, T. P. Endurance training increase HDL cholesteryl ester metabolism in rats. *J. Appl. Physiol.*, 70: 1743-1747, 1991.
- PERRIN, D. *et al.*, Resistance to obesity in Lou/C rats prevents ageing-associated metabolic alterations. *Diabetologia*, 46:1489-1496, 2003.
- PESCATELLO, L. S. Exercise prescription and management for cardiometabolic health. *ACSM's Health & Fitness Journal*, 3: 15-21, 1999.
- PETERS, S. L. M., *et al.* A. The influence of oxidative stress on various inotropic responses in isolated rat left atria. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 355: 390-397, 1997.
- QVIGSTAD, E., *et al.* Acute lowering of circulating fatty acids improves insulin secretion in a subset of type 2 diabetes subjects. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 284: E129-E137, 2003.

- RANDLE, P. J. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab. Rev.*, 14: 263-283, 1998.
- REIDELBERGER, R. D. *et al.* Postgastric satiety in the sham-feeding rat. *Am. J. Physiol.* v. 244 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 13), R872-R881, 1983
- RIBEIRO, C.A.F. *et al.*, Influence of 0.1 or 0.2% cholesterol enriched diets on the induction of atherosclerosis and aorta reactivity *in vitro*. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 31(5), 690-699, 1998
- RIGLA, M., *et al.*, A. 11<sup>th</sup> International Symposium on Atherosclerosis, Paris, 1997.
- SAKO, Y., GRILL, V. E. A 48-hour lipid infusion in the rat time-dependently inhibits glucose-induced insulin secretion and B Cell Oxidation through a process likely coupled to fatty acid oxidation. *Endocrinology.*, 127: 1580-9, 1990.
- SANDYK, R. & AWERBUCH, G. I. The relationship between melatonin secretion and serum cholesterol in patients with multiple sclerosis. *Intern. J. Neuroscience*, 76: 81-86, 1994.
- SANTOS, I. N., SPADARI-BRATFISCH, R. C. Chronotropic response to ( $\pm$ ) – CGP12177 in right atria of stressed rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 79: 1-7, 2001.
- \_\_\_\_\_, *et al.* Evidence for two atypical conformations of beta-adrenoceptors and their interaction with Gi proteins. *European Journal of Pharmacology*, 513(1-2): 109-118, 2005.
- SHEPHERD, R. E., DURSTINE, J. L., DAVIS, R. A. Lipoprotein and apolipoprotein distribution in Zucker rats following and endurance running program. *Atherosclerosis*, 51(1): 107-117, 1985.
- SIMON, M. I., STRATHMANN, M.T., GAUTAM. Diversity of G protein in signal transduction. *Sci.*, 252: 802-808, 1991.

SLYPER, A. H. Low-density lipoprotein and atherosclerosis. *JAMA*, 272: 305, 1994.

STAMLER, J. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous or graded? Findings in 356, 222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *JAMA*, 256: 2823, 1986.

STEWART, R. A. H., KETTELSON, J., KAY, P. Statistical Methods to improve the precision of the treadmill exercise test. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 36: 1274-1279, 2000.

STROSBERG, A. D. Structural and functional diversity of  $\beta$ -adrenergic receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 757: 253-260, 1995.

\_\_\_\_\_ & PIETRI-ROUXEL, F. Function and regulation of the  $\beta_3$  adrenoceptor. *Trends in Pharmacological Sciences (TiPS)*, 17: 373-381, 1996.

STUBBE, I., HANSSON, P., GUTFSON, A. Plasma lipoproteins and lipolytic enzyme activities during endurance training in sedentary men: Changes in high density lipoprotein subfractions and composition. *Metabolism*, 32: 1120-1128, 1983.

TAKEDA, N., *et al.* Myocardial catecholamine responsiveness of spontaneously hypertensive rats as influenced by swimming training. *Basic. Res. Cardiol.*, 80(4): 384-391, 1985.

VANDERLEI, L. C. M., *et al.* Influence of the estrous cycle on the sensitivity to catecholamines in right atria from rats submitted to foot-shock stress. *Can. J. Physiol Pharmacol.*, 74: 670-8, 1996.

WETZTEIN, C. J., *et al.* Does acute exercise affect the susceptibility of low density lipoprotein to oxidation. *Free Rad. Biol. & Med.*, 24: 679-682, 1998.

WOOD, P. D., STEFANICK M. L., HASKELL, W. L. The effects on plasma lipoproteins of a prudent weight-reducing diet, with or without exercise, in overweight men and women. *N. Engl. J. Med.*, 325: 461-466, 1991.

WOLF-NUNES, V. Efeito do tratamento com infuso de Croton cajucara Benth em ratos wistar jovens e adultos normo- ou hiperlipidêmicos. Tese de doutorado. Biologia Funcional e Molecular, área de Fisiologia. Instituto de Biologia-UNICAMP, 2004.

\_\_\_\_\_, *et al.* Plasmatic levels of cholesterol, triglyceries and glucose of normo- and hypercholesterolemic rats treated whit Croton cajucara Benth In: XVI Latinamerican Congress of Pharmacology, XXXII Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, II Iberoamerican Congress of Pharmacology, VII Interamerican congress of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2000, São Paulo/SP. XVI Latinamericana Congress of Pharmacology, XXXII Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, II Iberoamerican Congress of Pharmacology, VII Interamerican congress of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2000.

WONG, N. D., WILSON, P. W. F., KANNEL, W. B. Serum cholesterol as a prognostic factor after myocardial infarction: the Framingham Study. *Ann. Intern. Med.*, 115: 687-693, 1991.

ZANESCO, A.; SPADARI-BRATFISCH, R.C. and BARKER, L.A. Sino-aortic denervation causes right *beta* adrenoceptor down regulation. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 280(2):677-685, 1997.

ZANUDIO, S. *et al.* Strain differences of dopamine receptor levels and dopamine related behaviors in rats. *Brain Res. Bull.* 65: 339–347, 2005

ZAVARONI, I., *et al.* Ability of exercise to inhibit carbohydrate-induced hypertriglyceridemia in rats. *Metabolism*, 30(5): 476-80, 1981.

ZHOU, Y. P., GRILL, V. E. Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle. *J. Clin. Invest.*, 93: 870-6, 1994.