

# EXERCÍCIO AERÓBICO AGUDO RESTAURA A CONCENTRAÇÃO DE TRIPTOFANO EM CÉREBRO DE RATOS COM HIPERFENILALANINEMIA



ACUTE AEROBIC EXERCISE RESTORES TRYPTOPHAN CONCENTRATION IN THE BRAIN OF RATS WITH HYPERPHENYLALANINEMIA

Priscila Nicolao Mazzola<sup>1</sup>  
Tarsila Barros Moraes<sup>1</sup>  
Carolina Didonet Pederzolli<sup>1</sup>  
Andrea Rosa<sup>1</sup>  
Fernanda Rech Zanin<sup>1</sup>  
Juliana Coelho<sup>1</sup>  
Carlos Severo Dutra-Filho<sup>1</sup>

1. Departamento de Bioquímica,  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde,  
Universidade Federal do Rio Grande  
do Sul – Porto Alegre, RS.

## Correspondência:

UFRGS – Instituto de Ciências  
Básicas da Saúde, Departamento de  
Bioquímica.  
Rua Ramiro Barcelos, 2.600 anexo,  
Santana - 90035-003 - Porto Alegre, RS  
E-mail: priscila.mazzola@ufrgs.br

## RESUMO

**Introdução:** A fenilcetonúria (PKU) é caracterizada pela deficiência da enzima fenilalanina hidroxilase, causando acúmulo de fenilalanina. O diagnóstico precoce e a subordinação à dieta pobre em fenilalanina são importantes para prevenir os efeitos prejudiciais da hiperfenilalaninemia. Não aderir estritamente à dieta provoca, entre outros efeitos, um desequilíbrio entre os aminoácidos neutros que usam o mesmo transportador da fenilalanina na barreira hematoencefálica, causando, então, a diminuição da entrada de triptofano, o precursor de serotonina no cérebro. Esse neurotransmissor tem sido implicado na regulação dos estados de humor, sendo sua alta produção ligada à fadiga central em indivíduos submetidos a exercício prolongado. O exercício físico aumenta os níveis de triptofano livre no sangue, o que facilita seu influxo no cérebro, podendo, portanto, ser útil nos estados hiperfenilalaninêmicos. **Objetivo:** Avaliar se o exercício aeróbico é capaz de normalizar as concentrações de triptofano no cérebro de ratos com hiperfenilalaninemia. **Métodos:** Trinta e dois ratos foram separados nos grupos sedentário (Sed) e exercício (Exe), e cada um deles subdividido em controle (SAL) e hiperfenilalaninemia (PKU). A hiperfenilalaninemia foi induzida pela administração de alfa-metilfenilalanina e fenilalanina durante três dias, enquanto os grupos SAL receberam salina. Os grupos Exe realizaram uma sessão de exercício aeróbico com duração de 60min e velocidade de 12m.min<sup>-1</sup>. **Resultados:** A concentração de triptofano no cérebro nos grupos PKU foi significativamente menor que nos grupos SAL, tanto Sed como Exe, compatível com a condição hiperfenilalaninêmica. O exercício aumentou a concentração cerebral de triptofano comparada aos animais sedentários. O achado mais interessante foi que a concentração cerebral de triptofano no grupo ExePKU não foi diferente do SedSAL. **Conclusão:** Os resultados indicam um importante papel do exercício aeróbico para restaurar a concentração de triptofano no cérebro em ratos hiperfenilalaninêmicos.

**Palavras-chave:** fenilcetonúria, fenilalanina, serotonina.

## ABSTRACT

**Introduction:** Phenylketonuria (PKU) is characterized by deficiency of the enzyme phenylalanine hydroxylase, leading to accumulation of phenylalanine. Early diagnosis and subordination to low-phenylalanine diet are important to prevent the harmful effects of hyperphenylalaninemia. In case the diet is not strictly followed, some possible effects are imbalance in the neutral amino acids that use the same carrier of phenylalanine to cross the blood-brain barrier, causing hence reduction in tryptophan entry, the precursor of serotonin in the brain. This neurotransmitter has been implicated in the regulation of mood states, and its high production is linked to central fatigue in individuals subjected to prolonged exercise. Physical exercise increases free tryptophan levels in the blood, which facilitates its influx in the brain, and therefore, may be useful in hyperphenylalaninemia states. **Objective:** To assess whether aerobic exercise is able to normalize the concentrations of tryptophan in the brain of rats with hyperphenylalaninemia. **Methods:** 32 rats were randomly assigned to sedentary (Sed) and exercise (Exe) groups, and then divided into control (HEA) and hyperphenylalaninemia (PKU). Hyperphenylalaninemia was induced by administration of alpha-methylphenylalanine and phenylalanine for three days, while the HEA groups received saline. Exe groups held a session of aerobic exercise lasting 60 minutes and speed of 12 m.min<sup>-1</sup>. **Results:** The concentration of tryptophan in the brain of PKU groups was significantly lower than HEA groups (both in Sed and Exe groups), compatible with the condition of hyperphenylalaninemia. The exercise increased brain tryptophan levels comparing to sedentary animals. The most interesting finding was that the brain tryptophan levels of ExePKU group were not different from SedHEA group. **Conclusion:** The results indicate an important role of aerobic exercise to restore the concentration of tryptophan in the brain in hyperphenylalaninemic rats.

**Keywords:** phenylketonuria, phenylalanine, serotonin.

## INTRODUÇÃO

A fenilcetonúria (PKU) é o erro inato mais comum dentre os distúrbios do metabolismo dos aminoácidos, ocorrendo com a frequência de 1:14.000 nascimentos<sup>1</sup>. A forma clássica desta doença é causada por mutações no gene da enzima hepática fenilalanina hidroxilase,

localizado no cromossomo 12<sup>2</sup>, impossibilitando a ação dessa enzima que é responsável pela transformação do aminoácido essencial fenilalanina em tirosina. Com essa rota inativada, a fenilalanina acumula-se e segue rotas alternativas, causando distúrbios principalmente no sistema nervoso central. Quando não tratada precocemente, a criança porta-

dora de fenilcetonúria apresenta um quadro clínico caracterizado por importante acometimento do sistema nervoso central, apresentando retardo mental severo, microcefalia, convulsões, alterações motoras, entre outros sintomas neurológicos<sup>3</sup>.

A fim de evitar essas consequências, os fenilcetonúricos adotam uma dieta hipoproteica especialmente pobre em fenilalanina para a manutenção dos níveis sanguíneos desse aminoácido dentro da normalidade. Porém, as necessidades proteicas não permitem sua total eliminação da dieta, causando oscilações na concentração da fenilalanina plasmática mesmo naqueles indivíduos submetidos precocemente e continuamente a dieta especial. A fenilalanina segue rotas alternativas de metabolização e o aumento de fenilalanina e de seus metabólitos provoca os efeitos tóxicos ao organismo cujos mecanismos ainda não são completamente conhecidos<sup>3,4</sup>.

Essas substâncias inibem importantes enzimas necessárias para a síntese de neurotransmissores, como a 5-hidroxitriptofano descarboxilase, que dá origem à serotonina<sup>5</sup>. A concentração elevada de fenilalanina causa diminuição na concentração dos outros aminoácidos neutros, prejudicando, assim, a passagem desses pela barreira hematoencefálica<sup>3,6,7</sup>. Além disso, os carreadores ali presentes têm maior afinidade por fenilalanina<sup>8</sup>, causando, desse modo, a diminuição da disponibilidade de triptofano no cérebro e, conseqüentemente, a menor produção de serotonina. Em indivíduos fenilcetonúricos tratados precocemente, mas que não seguem rigorosamente a dieta, são encontradas menores concentrações de triptofano e serotonina no plasma<sup>9</sup> e diminuída excreção de serotonina na urina<sup>10</sup>. Esta situação é muito comum entre os pacientes, vista a grande dificuldade de respeitar rigorosamente a restrição dietética, o que pode levar ao prejuízo cognitivo<sup>10,11</sup>. A menor produção desse neurotransmissor é ainda mais pronunciada em pacientes não tratados, sendo observada *post mortem* uma redução de 30-40% na concentração de serotonina e de 40-50% nos níveis de triptofano no cérebro<sup>12</sup>.

A serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) é um importante neurotransmissor monoaminérgico do sistema nervoso central, e é derivada do aminoácido aromático essencial triptofano, que é carreado pela proteína albumina na corrente sanguínea. O triptofano livre é captado pelo encéfalo, após atravessar a barreira hematoencefálica, e transformado em 5-hidroxitriptofano, sendo, posteriormente, descarboxilado para a forma do neurotransmissor ativo, a serotonina<sup>13</sup>. Devido à sua ação em diversos receptores, a serotonina tem sido implicada na regulação dos estados de humor, incluindo depressão, ansiedade, ingestão alimentar e violência compulsiva<sup>14</sup>. Assim como a baixa produção de serotonina causa distúrbios na saúde mental do indivíduo, a sua alta produção está relacionada com a fadiga central, como demonstram diversos estudos com exercício aeróbico em modelo animal<sup>15,16</sup> e humano<sup>17-19</sup>.

O exercício físico é capaz de promover um aumento na produção de serotonina, devido à maior disponibilidade do seu aminoácido precursor. Em condições aeróbicas de baixa intensidade e longa duração, o tecido adiposo é mobilizado pelo sistema hormonal, liberando ácidos graxos para produção de energia. Esses lipídios serão carreados pela albumina na circulação sanguínea, até atingirem a musculatura ativa<sup>13</sup>. A necessidade de disponibilizar ácidos graxos livres para oxidação acaba por liberar triptofano, pois ambos utilizam a mesma proteína carreadora. Deste modo, a concentração de triptofano livre na barreira hematoencefálica é aumentada<sup>20,21</sup>.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de uma sessão de exercício aeróbico na concentração de triptofano em cérebro de ratos com hiperfenilalaninemia.

## MÉTODOS

### Animais

Todos os experimentos com os animais foram realizados de acordo com as resoluções brasileiras específicas sob a Bioética em Experimentos com Animais (Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979 e Decreto nº 24.645, de 10 julho de 1934). Neste estudo, foram utilizados 32 ratos Wistar machos, com idade aproximada de 30 dias. Os animais foram

mantidos em gaiolas coletivas de polietileno, mantidos em salas com temperatura controlada e expostos a ciclos claro-escuro de 12:12 horas, com livre acesso à água e ao alimento.

### Grupos experimentais

Aos 28 dias de vida, os animais foram separados aleatoriamente em quatro grupos:

1) sedentário controle (SedSAL) – ratos saudáveis; 2) sedentário PKU (SedPKU) – ratos com hiperfenilalaninemia; 3) exercício controle (ExeSAL) – ratos saudáveis que fizeram exercício; e 4) exercício PKU (ExePKU) – ratos com hiperfenilalaninemia que fizeram exercício.

### Modelo PKU

Os grupos PKU receberam, durante três dias, às 9h, uma injeção de  $\alpha$ -metil-fenilalanina (inibidor da fenilalanina hidroxilase) e de fenilalanina nas concentrações de  $1,6\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  e  $2,1\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectivamente, e, às 18h, receberam a mesma dose de fenilalanina<sup>22</sup>. Os grupos SAL receberam solução salina nas mesmas condições.

### Exercício e mensuração de triptofano

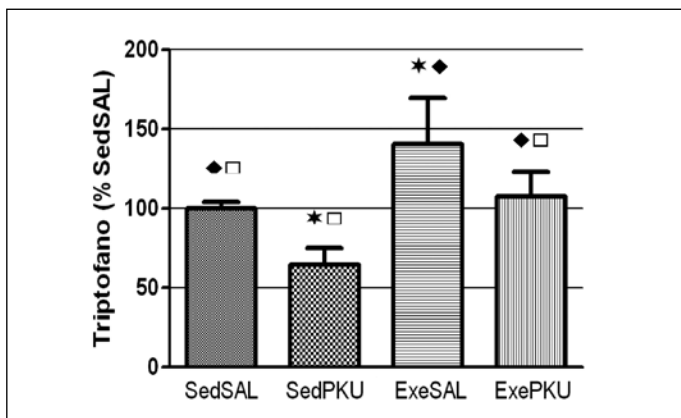
No quarto dia, os grupos Sed permaneceram em suas gaiolas, enquanto os grupos Exe realizaram corrida em esteira específica para roedores (Insight EP 131) durante 60 minutos e velocidade de  $12\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ <sup>23</sup>. Imediatamente após, os animais foram sacrificados por decapitação sem anestesia, sendo os cérebros removidos rapidamente, limpos (retirada do cerebelo, bulbo olfatório, ponte e vasos sanguíneos superficiais) e mantidos no gelo. Foram mensuradas as massas dos cérebros e, então, homogeneizados com a solução tampão fosfato de sódio ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$  – 20mM) com cloreto de potássio (KCl – 140mM), na diluição de 1:5. O produto foi colocado em *eppendorfs* para centrifugação durante 10min à velocidade de 1.000g e temperatura de 4°C (Eppendorf Centrifuge 5417R). O sobrenadante foi utilizado para a mensuração do triptofano por espectrofotofluorimetria (Molecular Devices – Spectra Max Gemini XPS), com excitação de 280nm e emissão de 360nm<sup>24</sup>. Também foram mensuradas as proteínas totais das amostras pela técnica de Lowry *et al.*<sup>25</sup>, utilizando albumina bovina como padrão. Os resultados foram normalizados ( $\mu\text{M}\cdot\text{mg}_{\text{proteína}}^{-1}$ ) e, então, calculados em % do controle (grupo SedSAL) e expressos como média e desvio padrão. A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk, e as diferenças entre os grupos foram examinadas por ANOVA de duas vias, seguida do teste de Bonferroni, utilizando o pacote estatístico SPSS versão 12.0 para Windows. O índice de significância empregado foi de 0,05.

## RESULTADOS

Na análise da concentração de triptofano no cérebro, foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos salina e hiperfenilalaninemia [ $F_{(1,28)} = 83,53$   $p < 0,001$ ], e também entre as condições sedentário e exercício [ $F_{(1,28)} = 102,06$   $p < 0,001$ ], figura 1. Não foi observado efeito de interação entre os fatores estudados [ $F_{(1,28)} = 3,58$   $p = 0,069$ ].

Nos grupos sedentários, o modelo de hiperfenilalaninemia utilizado (grupo SedPKU) diminuiu significativamente a concentração de triptofano no cérebro em relação ao grupo controle (SedSAL) ( $p < 0,001$ ). O mesmo ocorreu com os grupos que realizaram exercício, nos quais a concentração de triptofano foi menor no grupo ExePKU quando comparado ao grupo ExeSAL ( $p < 0,001$ ).

Em relação ao efeito do exercício, o triptofano no cérebro dos animais exercitados foi significativamente maior em relação aos seus controles, com valores maiores para o grupo ExeSAL em relação ao SedSAL ( $p < 0,001$ ), e maior para o grupo ExePKU em comparação ao SedPKU ( $p < 0,001$ ). Não foram encontradas diferenças significativas entre os animais hiperfenilalaninêmicos exercitados (ExePKU) e os controles que não realizaram exercício físico (SedSAL) ( $p = 0,903$ ).



**Figura 1.** Concentração relativa de triptofano no cérebro (%SedSAL). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. \* indica diferença de SedSAL; ♦ indica diferença de SedPKU; □ indica diferença de ExeSAL, para  $p < 0,05$ .

## DISCUSSÃO

O modelo hiperfenilalaninêmico utilizado neste estudo<sup>22</sup> foi efetivo na diminuição significativa da concentração de triptofano no cérebro decorrente do aumento da fenilalanina. A maior quantidade de fenilalanina no plasma, e consequentemente na barreira hematoencefálica, prejudica a passagem ao cérebro dos outros aminoácidos que utilizam o mesmo sistema de transporte, diminuindo o influxo de triptofano de maneira importante<sup>3,6,7,26,27</sup>. A fenilalanina é capaz de saturar as proteínas de membrana, que garantem a permeabilidade da barreira hematoencefálica, dificultando ainda mais a entrada de triptofano e de outros aminoácidos no cérebro<sup>9</sup>, provavelmente devido a sua maior afinidade com esse sistema de transporte<sup>8</sup>.

A diminuição de triptofano significa menor aporte de substrato para produção de serotonina pelo sistema hipotalâmico, tornando o indivíduo mais suscetível a desordens do humor<sup>14</sup>. Ardis *et al.*<sup>28</sup> encontraram mudanças negativas no comportamento e na cognição de ratos, decorrentes da dieta pobre em triptofano ao qual foram submetidos. Os animais apresentaram menor concentração de triptofano no plasma e menor concentração de serotonina no cérebro, evidenciando a importância do sistema serotoninérgico em variáveis cognitivas. A influência prejudicial na síntese de amins no cérebro foi observada em modelo animal de hiper-

fenilalaninemia crônica, que causou déficit cognitivo em ratos adultos<sup>29</sup>.

O exercício físico proposto<sup>23</sup> foi significativo no aumento da concentração de triptofano no cérebro, tanto nos animais controles como nos hiperfenilalaninêmicos. Nossos resultados vão ao encontro de diversos estudos com animais saudáveis<sup>15,16,23,30</sup>, que encontraram aumento da concentração de triptofano livre no plasma e no cérebro e, consequentemente, maior produção de serotonina. O acréscimo na produção de serotonina é causado pelo aumento da atividade do sistema simpatoadrenérgico, característico do estresse físico. Com o estímulo da lipólise, a maior disponibilidade de ácidos graxos liberados na corrente sanguínea aumenta a necessidade de a albumina levá-los à musculatura em exercício, fazendo com que o triptofano ligado à albumina seja liberado. O triptofano em forma livre em concentração aumentada alcança a barreira hematoencefálica em vantagem em relação aos outros aminoácidos, resultando no seu maior influxo no cérebro e, consequentemente, na maior produção de serotonina.

O achado mais interessante deste estudo foi que o valor de triptofano no cérebro do grupo ExePKU não apresentou diferença estatística do grupo SedSAL. Portanto, o exercício aeróbico foi capaz de reverter a diminuição da concentração de triptofano encontrada nos ratos hiperfenilalaninêmicos que não se exercitaram, atingindo valores semelhantes aos dos animais controles. Com o maior aporte de substrato, é esperado que a produção de serotonina encontre-se aumentada, uma vez que a suplementação de triptofano apresenta esse efeito em pacientes hiperfenilalaninêmicos<sup>34</sup>.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o exercício físico aeróbico pode ser uma estratégia interessante para restaurar a concentração de triptofano no cérebro no estado hiperfenilalaninêmico. Na literatura científica, não foram encontrados estudos que relacionassem exercício aeróbico com indivíduos hiperfenilalaninêmicos. Assim, mais pesquisas deverão ser realizadas para a comprovação da utilização de exercício físico aeróbico na condição de hiperfenilalaninemia, característica do indivíduo com PKU, como estratégia na elevação nos níveis de triptofano no cérebro. Conhecer respostas agudas ao exercício físico como as apresentadas neste trabalho é extremamente importante para a realização de futuros trabalhos que avaliem os efeitos do treinamento físico na hiperfenilalaninemia.

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

## REFERÊNCIAS

- Walter JH, White FJ, Hall SK, MacDonald A, Rylance G, Boneh A, et al. How practical are recommendations for dietary control in phenylketonuria? *Lancet* 2002;360:55-7.
- Kohl S, Saxena R, Thomas E, Rao P, Verma IC. *Indian J Med Res* 2005;122:400-3.
- Surtees R, Blau N. The Neurochemistry of Phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 2000;251:109-13.
- Güttler F, Lou H. Dietary problems of phenylketonuria: effect on CNS transmitters and their possible role in behaviour and neuropsychological function. *J Inher Metab Dis* 1986;9:169-77.
- Nyhan WL. Abnormalities in amino acid metabolism in clinical medicine. Appleton-century crofts. Norwalk, USA, 1984.
- Milovanović DD, Milovanović L, Vranjesević D. Serum tryptophan to large neutral amino acid ratio and urinary tryptophan in three patients with phenylketonuria in a family. A clinical and biochemical study. *Adv Exp Med Biol* 1999;467:289-95.
- Herrero E, Aragon MC, Gimenez C, Valdivieso F. Inhibition by L-phenylalanine of tryptophan transport by synaptosomal plasma membrane vesicles: implications in the pathogenesis of phenylketonuria. *J Inher Metab Dis* 1983;6:32-5.
- Malloy-Diniz LF, Martins CC, Carneiro KC, Cerqueira MMM, Ferreira APA, Aguiar MJB, et al. Funções Executivas em Crianças Fenilcetonúricas: Variações em Relação ao Nível de Fenilalanina. *Arquivos de Neuro-psiquiatria* 2004;62:473-9.
- Schulpis KH, Papassotiropi I, Vounatsou M, Karikas GA, Tsakiris S, Chrousos GP. Morning preprandial plasma ghrelin and catecholamine concentrations in patients with phenylketonuria and normal controls: evidence for catecholamine-mediated ghrelin regulation. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3983-7.
- Krause W, Halminski M, McDonald L, Dembure P, Salvo R, Freides D, Elsas L. Biochemical and neuropsychological effects of elevated plasma phenylalanine in patients with early-treated PKU. *J Clin Invest* 1985;75:40-8.
- Park SB, Coull JT, McShane RH, Young AH, Sahakian BJ, Robbins TW, et al. Tryptophan depletion in normal volunteers produces selective impairments in learning and memory. *Neuropharmacology* 1994;33:575-88.
- McKean CM. The effects of high phenylalanine concentrations on serotonin and catecholamine metabolism in the human brain. *Brain Res* 1972;47:469-76.
- McArdle WD, Katch FI, Katch VL. Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano. 5a ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, Brasil, 2003.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Principios da Neurociência. 4a ed. Manole. São Paulo, Brasil, 2003.
- Soares DD, Lima NR, Coimbra CC, Marubayashi U. Evidence that tryptophan reduces mechanical efficiency and running performance in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2003;74:357-62.
- Blomstrand E, Perrett D, Parry-Billings M, Newsholme EA. Effect of sustained exercise on plasma amino acid concentrations and on 5-hydroxytryptamine metabolism in six different brain regions in the rat. *Acta Physiol Scand* 1989;136:473-81.
- Rossi L, Tirapegui J. Implicações do Sistema Serotoninérgico no Exercício Físico. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 2004;48:227-33.
- Nybo L, Nielsen B, Blomstrand E, Moller K, Secher N. Neurohumoral Responses During Prolonged Exercise in Humans. *J Appl Physiol* 2003;95:1125-31.
- Davis JM, Alderson NL, Welsh RS. Serotonin and central nervous system fatigue: nutritional considerations. *Am J Clin Nutr* 2000;72:573S-8S.
- Chaouloff F. Effects of acute physical exercise on central serotonergic systems. *Med Sci Sports Exerc* 1997;29:58-62.
- McMenamy RH. Binding of indole analogues to human serum albumin. Effects of fatty acids. *J Biol Chem* 1965;240:4235-43.
- Kienzle Hagen ME, Pederzoli CD, Sgaravatti AM, Bridi R, Wajner M, Wannmacher CM, et al. Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. *Biochim Biophys Acta* 2002;1586:344-52.
- Meeusen R, Thorré K, Chaouloff F, Sarre S, De Meirleir K, Ebinger G, et al. Effects of tryptophan and/or acute running on extracellular 5-HT and 5-HIAA levels in the hippocampus of food-deprived rats. *Brain Res* 1996;740:245-52.
- Hsia DY, Inouye T. Inborn Errors of Metabolism. Part 2 Laboratory Methods: Year Book Medical Publishers Inc. Chicago, EUA 1966.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
- Dunlop DS, Yang XR, Lajtha A. The effect of elevated plasma phenylalanine levels on the protein synthesis rates in adult rat brain. *Biochem J* 1994;302:601-10.
- Feoli AM, Siqueira IR, Almeida L, Tramontina AC, Vanzella C, Sbaraini S, et al. Effects of protein malnutrition on oxidative status in rat brain. *Nutrition* 2006;22:160-5.
- Ardis TC, Cahir M, Elliott JJ, Bell R, Reynolds GP, Cooper SJ. Effect of acute tryptophan depletion on noradrenaline and dopamine in the rat brain. *J Psychopharmacol* 2009;23:51-5.
- Diamond A. Phenylalanine levels of 6-10 mg/dL may not be as benign as once thought. *Acta Paediatr Suppl* 1994;407:89-91.
- Caperuto EC, dos Santos RV, Mello MT, Costa Rosa LF. Effect of endurance training on hypothalamic serotonin concentration and performance. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009;36:189-91.