

**Luiz Carlos Marques Vanderlei**

**INFLUÊNCIA DO CICLO ESTRAL E DO ESTRESSE  
SOBRE A SENSIBILIDADE ÀS CATECOLAMINAS EM  
ÁTRIOS DE RATAS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de  
Piracicaba da Universidade Estadual de  
Campinas, para obtenção do título de Doutor em  
Ciências, área de concentração Farmacologia.

**Piracicaba**

**1996**

**Luiz Carlos Marques, Vanderlei †**

**INFLUÊNCIA DO CICLO ESTRAL E DO ESTRESSE  
SOBRE A SENSIBILIDADE ÀS CATECOLAMINAS EM  
ÁTRIOS DE RATAS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Célia Spadari-Bratfisch - IB/UNICAMP. †

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga - FOP/UNICAMP. †

**Piracicaba**

**1996**

*Este exemplar foi  
devidamente corrigido  
conforme resolução  
CCPG 036/83.  
Piracicaba, 11 de dezembro  
de 1996*

**MARIA BRATFISCH**

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	Unicamp
V. 284	
V. E.	
TOMBO BC/	29524
PROC.	281/97
C	<input type="checkbox"/>
O	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	07/02/97
N.º OPD	

CM-00097246-9

Ficha Catalográfica Elaborada pela Biblioteca da FOP/UNICAMP

V284i	<p>Vanderlei, Luiz Carlos Marques.          Influência do ciclo estral e do estresse sobre a sensibilidade às catecolaminas em átrios de ratas / Luiz Carlos Marques Vanderlei.          Piracicaba : [s.n.], 1996.          97f. : il.          Orientador : Regina Célia Spadari-Bratfisch, Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga.          Tese (Doutoramento) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.          1. Stress (Fisiologia). 2. Estro. 3. Adrenalina. 4. Receptores de substâncias endógenas. I. Spadari-Bratfisch, Regina Célia. II. Veiga, Maria Cecília Ferraz de Arruda. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">19.CDD - 612.17          - 615.364          - 150.1943</p>
-------	---

Índices para o Catálogo Sistemático

1. Stress (Fisiologia)	150.1943
2. Estro	612.17
3. Adrenalina	615.364
4. Receptores de substâncias endógenas	615.364



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de **Doutorado**, em sessão pública realizada em 06/12/96, considerou o candidato aprovado.

1. Regina Célia Spadari Bratfisch Regi C

2. Thales Rocha de Mattos Filho Thales Mattos

3. José Ranali José Ranali

4. Mary Luci de Souza Queiroz Mary Luci

5. Ernesto José Dottaviano Ernesto José

## **DEDICO**

**A meus pais, Luiz e Diva, à minha  
esposa Derci e aos meus filhos  
Talita, Franciele e Rafael.**

**com os quais compartilho os méritos desta  
conquista, porque ela lhes pertence  
igualmente.**

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

**Dra. Regina Célia Spadari-Bratfisch**

**Dra. Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga**

**A vocês, que dedicaram seu tempo e  
experiência para que minha formação  
também fosse um aprendizado de vida.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização desse trabalho, em especial:

- Aos professores do Curso de Farmacologia: Dr. Eduardo Dias de Andrade, Dr. José Ranalli, Dra. Maria Cristina Volpato, Dra. Maria de Lourdes G. da Gama e Dr. Pedro Luiz Rosalem, pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade sincera com que me brindaram.
- Ao professor Dr. Thales Rocha de Mattos Filho, pelas orientações, incentivo e conhecimentos transmitidos.
- À Vandi, pelo inestimável auxílio durante a execução do trabalho experimental.
- Aos amigos Bruno, Eduardo Tonani, Eduardo Marinho, Elisângela, Alexandre, Zeze e Iraídes, pelo exemplo de amizade.
- À secretária Maria Elisa dos Santos, que sempre se mostrou pronta para auxiliar-me.
- À Fernanda, pelo auxílio, paciência e amizade durante a execução do trabalho.
- À Angelina, que ensinou-me grande parte do que aprendi no laboratório.
- À bibliotecária Sueli Duarte de Oliveira Soliani, pelas orientações e elaboração da ficha catalográfica deste trabalho.
- À CAPES, pelo apoio financeiro oferecido durante a realização deste trabalho.
- Ao Departamento de Fisioterapia e a Universidade Estadual Paulista, pela confiança e afastamentos concedidos.
- Ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do IB / UNICAMP, que permitiu o desenvolvimento desse trabalho em suas instalações.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	1.
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	2.
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	6.
<b>RESUMO</b> .....	7.
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	9.
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	22.
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23.
3.1. Animais .....	23.
3.2. Determinação das Fases do Ciclo Estral .....	23.
3.3. Grupos .....	23.
3.4. Protocolo de Estresse .....	24.
3.5. Átrio Direito Isolado .....	24.
3.6. Curvas Concentração/Efeito .....	25.
3.7. Tratamento Farmacológico "in vitro" .....	26.
3.8. Curva Concentração/Efeito na Presença de Antagonista $\beta_2$ .....	28.
3.9. Determinação do Valor $pA_2$ do Metoprolol .....	28.
3.10. Fármacos e Reagentes .....	29.
3.11. Análise Estatística .....	29.
<b>4. RESULTADOS</b> .....	31.
4.1. Frequência Espontânea de Batimentos .....	31.
4.2. Sensibilidade à Adrenalina .....	35.
4.3. Sensibilidade à Noradrenalina .....	42.
4.4. Sensibilidade ao Soterenol .....	50.
4.5. Constante de Dissociação do Metoprolol .....	53.
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	64.
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	80.
<b>ABSTRACT</b> .....	81.
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	83.

## LISTA DE TABELAS.

Tabela 1. Grupos utilizados durante os experimentos .....	24.
Tabela 2. Valores de frequência de batimentos espontâneos de átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas e sacrificadas no <b>diestro</b> ou no <b>estro</b> .....	34.
Tabela 3. Valores de resposta máxima à adrenalina de átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas e sacrificadas no <b>diestro</b> ou no <b>estro</b> .....	37.
Tabela 4. Valores $pD_2$ da adrenalina em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas e sacrificadas no <b>diestro</b> ou no <b>estro</b> .....	38.
Tabela 5. Valores de resposta máxima à noradrenalina de átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas e sacrificadas no <b>diestro</b> ou no <b>estro</b> .....	44.
Tabela 6. Valores $pD_2$ da noradrenalina de átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas e sacrificadas no <b>diestro</b> ou no <b>estro</b> .....	45.
Tabela 7. Valores de frequência inicial (FI), $pD_2$ e resposta máxima (RM) ao soterenol em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas e sacrificadas no <b>diestro</b> ou no <b>estro</b> .....	51.
Tabela 8. Valores $pA_2$ e coeficientes angulares dos gráficos de Schild, para o metoprolol, em átrios direitos de ratas controles e submetidas a choques nas patas sacrificadas no <b>diestro</b> ou no <b>estro</b> .....	63.

## LISTA DE FIGURAS.

- Figura 1. Curva concentração/efeito da adrenalina, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no estro e sacrifício em **diestro** ..... 39.
- Figura 2. Curva concentração/efeito da adrenalina, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no diestro e sacrifício em **estro** ..... 39.
- Figura 3. Curva concentração/efeito da adrenalina, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no estro e sacrifício em **diestro**, antes e após tratamento farmacológico "*in vitro*" ..... 40.
- Figura 4. Curva concentração/efeito da adrenalina, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no diestro e sacrifício em **estro**, antes e após tratamento farmacológico "*in vitro*" ..... 40.
- Figura 5. Curva concentração/efeito da adrenalina, em átrios direitos isolados e pré-tratados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no estro e sacrifício em **diestro**, antes e após a adição de butoxamina ..... 41.
- Figura 6. Curva concentração/efeito da adrenalina, em átrios direitos isolados e pré-tratados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no diestro e sacrifício em **estro**, antes e após a adição de butoxamina ..... 41.
- Figura 7. Curva concentração/efeito da noradrenalina, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no estro e sacrifício em **diestro** ..... 46.

Figura 8. Curva concentração/efeito da noradrenalina, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no diestro e sacrifício em <b>estro</b> .....	46.
Figura 9. Curva concentração/efeito da noradrenalina, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no estro e sacrifício em <b>diestro</b> , antes e após desnervação adrenérgica e inibição do sistema de recaptação neuronal .....	47.
Figura 10. Curva concentração/efeito da noradrenalina, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no diestro e sacrifício em <b>estro</b> , antes e após desnervação adrenérgica e inibição do sistema de recaptação neuronal .....	47.
Figura 11. Curva concentração/efeito da noradrenalina, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no estro e sacrifício em <b>diestro</b> , antes e após tratamento farmacológico " <i>in vitro</i> " .....	48.
Figura 12. Curva concentração/efeito da noradrenalina, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no diestro e sacrifício em <b>estro</b> , antes e após tratamento farmacológico " <i>in vitro</i> " .....	48.
Figura 13. Curva concentração/efeito da noradrenalina, em átrios direitos isolados e pré-tratados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no estro e sacrifício em <b>diestro</b> , antes e após a adição de butoxamina .....	49.
Figura 14. Curva concentração/efeito da noradrenalina, em átrios direitos isolados e pré-tratados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no diestro e sacrifício em <b>estro</b> , antes e após a adição de butoxamina .....	49.

Figura 15. Curva concentração/efeito ao soterenol, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no estro e sacrifício em <b>diestro</b> .....	52.
Figura 16. Curva concentração/efeito ao soterenol, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no diestro e sacrifício em <b>estro</b> .....	52.
Figura 17. Curva concentração/efeito da adrenalina, na presença de quatro concentrações diferentes de metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas controles sacrificadas no <b>diestro</b> .....	55.
Figura 18. Gráfico de Schild, para o antagonismo do efeito cronotrópico da adrenalina pelo metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas controles sacrificadas no <b>diestro</b> .....	55.
Figura 19. Curva concentração/efeito da adrenalina, na presença de três concentrações diferentes de metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a choques nas patas, com início no estro e sacrifício em <b>diestro</b> ....	56.
Figura 20. Gráfico de Schild, para o antagonismo do efeito cronotrópico da adrenalina pelo metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a choques nas patas, com início no estro e sacrifício em <b>diestro</b> .....	56.
Figura 21. Curva concentração/efeito da adrenalina, na presença de quatro concentrações diferentes de metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas controles sacrificadas no <b>estro</b> .....	57.
Figura 22. Gráfico de Schild, para o antagonismo do efeito cronotrópico da adrenalina pelo metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas controles sacrificadas no <b>estro</b> .....	57.
Figura 23. Curva concentração/efeito da adrenalina, na presença de três concentrações diferentes de metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a choques nas patas, com início no diestro e sacrifício em <b>estro</b> ....	58.

Figura 24. Gráfico de Schild, para o antagonismo do efeito cronotrópico da adrenalina pelo metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a choques nas patas, com início no diestro e sacrifício em <b>estro</b> .....	58.
Figura 25. Curva concentração/efeito da noradrenalina, na presença de três concentrações diferentes de metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas controles sacrificadas no <b>diestro</b> .....	59.
Figura 26. Gráfico de Schild, para o antagonismo do efeito cronotrópico da noradrenalina pelo metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas controles sacrificadas no <b>diestro</b> .....	59.
Figura 27. Curva concentração/efeito da noradrenalina, na presença de três concentrações diferentes de metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a choques nas patas, com início no estro e sacrifício em <b>diestro</b> ....	60.
Figura 28. Gráfico de Schild, para o antagonismo do efeito cronotrópico da noradrenalina pelo metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a choques nas patas, com início no estro e sacrifício em <b>diestro</b> ....	60.
Figura 29. Curva concentração/efeito da noradrenalina, na presença de quatro concentrações diferentes de metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas controles sacrificadas no <b>estro</b> .....	61.
Figura 30. Gráfico de Schild, para o antagonismo do efeito cronotrópico da noradrenalina pelo metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas controles sacrificadas no <b>estro</b> .....	61.
Figura 31. Curva concentração/efeito da noradrenalina, na presença de quatro concentrações diferentes de metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a choques nas patas, com início no diestro e sacrifício em <b>estro</b> .....	62.
Figura 32. Gráfico de Schild, para o antagonismo do efeito cronotrópico da noradrenalina pelo metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a choques nas patas, com início no diestro e sacrifício em <b>estro</b> ....	62.

## LISTA DE ABREVIATURAS.

- ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico.
- AD - Átrios direitos isolados.
- ADR - Adrenalina.
- AMP - Monofosfato de adenosina.
- Asp - Aspartato.
- bpm - Batimentos por minuto.
- cDNA - Ácido desoxirribonucléico complementar.
- Chem. - Chemical.
- Co. - Company.
- COMT - Catecol-orto-metil transferase.
- EC<sub>50</sub> - Concentração equiefetiva a 50%.
- G<sub>i</sub> - Proteína G inibitória.
- G<sub>s</sub> - Proteína G estimulatória.
- GREs - Elementos de resposta aos glicocorticóides.
- MAO - Monoamino oxidase.
- mg - Miligrama.
- min. - Minutos.
- NA - Noradrenalina.
- ng - Nanograma.
- nM - Nanomolar.
- PKA - Proteína quinase A.
- PKC - Proteína quinase C.
- Ser - Serina.
- SO - Soterenol.
- α - Alfa.
- β - Beta.
- βARK - Proteína quinase específica do adrenoceptor beta.
- μM - Micromolar.
- 6-OHDA - 6-Hidroxidopamina.

## RESUMO.

O objetivo desse trabalho foi analisar as alterações de sensibilidade às catecolaminas em átrios direitos isolados (AD) de ratas submetidas a estresse por choques nas patas e sacrificadas no estro ou diestro.

Foram utilizadas ratas Wistar adultas, com ciclo estral regular de 4 dias, submetidas a 3 sessões de choques nas patas no estro, metaestro e diestro ou no diestro, proestro e estro. Cada rata recebeu, durante 30 minutos, 120 choques nas patas (1,0 mA, 1,0 s), a intervalos variáveis de 5 a 25 segundos. Após a última sessão de choques, os animais foram sacrificados e o AD preparado para registro isométrico das contrações espontâneas. Curvas concentração/efeito para noradrenalina (NA), adrenalina (ADR) e soterenol (SO) foram obtidas sem tratamento farmacológico. Para analisar os mecanismos envolvidos com as alterações de sensibilidade observadas, foram utilizados um ou mais dos seguintes tratamentos farmacológicos: desnervação adrenérgica, inibição dos sistemas de captação extraneuronal e de recaptação neuronal, bem como, bloqueio dos adrenoreceptores  $\alpha$  e muscarínicos. Os dados foram comparados através de análise de variância seguida da aplicação do teste de Scheffé, e pelo teste t de Student. Diferenças foram consideradas significantes ao nível de 5%.

AD de ratas, submetidas a choques nas patas e sacrificadas no diestro, apresentaram subsensibilidade à ADR ( $pD_2 = 7,38 \pm 0,09$  vs.  $6,63 \pm 0,08$ ), NA ( $pD_2 = 7,67 \pm 0,11$  vs.  $6,95 \pm 0,13$ ) e SO ( $pD_2 = 6,80 \pm 0,13$  vs.  $6,36 \pm 0,07$ ), quando comparados com os respectivos controles. A inibição do processo de recaptação neuronal cancelou a subsensibilidade à NA ( $pD_2 = 7,88 \pm 0,06$  vs.  $7,73 \pm 0,08$ ). Após a realização de tratamento farmacológico completo, AD desses animais continuaram a apresentar subsensibilidade à NA ( $pD_2 = 8,10 \pm 0,11$  vs.  $7,68 \pm 0,14$ ), enquanto que a subsensibilidade para a ADR foi cancelada ( $pD_2 = 7,67 \pm 0,13$  vs.  $7,49 \pm 0,08$ ). Adição de butoxamina tornou novamente evidente a subsensibilidade à ADR ( $pD_2 = 7,51 \pm 0,05$  vs.  $7,15 \pm 0,13$ ). Em AD de ratas estressadas e sacrificadas no estro, somente foi observada

subsensibilidade aos efeitos cronotrópicos da adrenalina, após a adição de butoxamina ( $pD_2 = 7,59 \pm 0,05$  vs.  $7,17 \pm 0,07$ ).

Estes resultados sugerem que, após estresse por choques nas patas, AD de ratas sacrificadas no diestro apresentaram aumento da eficiência do processo de recaptação neuronal, dessensibilização dos adrenoceptores  $\beta_1$  e participação dos adrenoceptores  $\beta_2$  na resposta cronotrópica às catecolaminas. Durante o estro, os mecanismos adaptativos do controle cronotrópico dos AD pelas catecolaminas não ocorrem, com exceção da participação dos adrenoceptores  $\beta_2$  na mediação da resposta cronotrópica.

## 1. INTRODUÇÃO.

Sob efeito de fatores agressivos externos e/ou internos, os quais denominamos agentes estressores, a integridade ou o equilíbrio orgânico podem ser ameaçados. Para se defender, o organismo produz uma série de alterações metabólicas e fisiológicas que permitem, inicialmente, resistir ao agente agressor e, posteriormente, adaptar-se à sua presença, quando a agressão é contínua ou repetida.

Essa resposta, que tem por objetivo manter a homeostase, está intimamente relacionada com o eixo hipotálamo/hipófise/adrenal e foi denominada por SELYE<sup>177</sup> (1936) "Síndrome Geral de Adaptação".

Esse conceito foi elaborado através de experimentos que tinham por objetivo a caracterização do efeito de hormônios ovarianos. SELYE observou, em ratos, que a aplicação de doses sucessivas de extratos impuros de hormônios ovarianos, produzia hipertrofia da glândula supra-renal, involução ou atrofia dos órgãos linfáticos e ulcerações da mucosa digestiva. Contudo, quando hormônios purificados foram injetados nesses animais, essas alterações anatomopatológicas não eram observadas (SELYE<sup>177</sup>, 1936 ; DUARTE<sup>51</sup>, 1986 ; SAPOLSKY<sup>173</sup>, 1990).

Os estudos de SELYE passaram então a ser realizados com as substâncias que estavam associadas aos extratos hormonais. O formol, um desses produtos, quando injetado nos animais, produziu alterações semelhantes às observadas anteriormente. A utilização de outros agentes estressores, como calor, frio, agentes biológicos, irradiações e exercícios, produziram os mesmos efeitos iniciais (DUARTE<sup>51</sup>, 1986).

Baseando-se nessas experiências SELYE<sup>177</sup> (1936) descreveu a "Síndrome Geral de Adaptação", que se desenvolveria em três estágios. O primeiro estágio, denominado "reação de alarme", representaria a resposta inicial do organismo frente ao agente estressor, e ocorreria quando o organismo fosse exposto a um estímulo ao qual não estaria adaptado. Esse estágio seria seguido pela fase de resistência, se o estímulo fosse mantido, e caracterizar-se-ia

pelo desenvolvimento de mecanismos adaptativos. Se essa adaptação não ocorresse, desenvolver-se-ia o estágio de exaustão e o organismo torna-se-ia susceptível a vários distúrbios (SELYE<sup>177</sup>, 1936 ; VAN de KAR et al.<sup>203</sup>, 1991).

Inicialmente a Síndrome Geral de Adaptação foi descrita como uma reação geral e inespecífica (SELYE<sup>177</sup>, 1936). Contudo, a evolução dos estudos sobre estresse evidenciou seu caráter específico (MASON<sup>140</sup>, 1968a ; MASON<sup>141</sup>, 1968b ; KRULICH et al.<sup>112</sup>, 1974 ; HENNESSY et al.<sup>83</sup>, 1979 ; HERD<sup>84</sup>, 1991) e a influência de características genéticas (MARPLES et al.<sup>139</sup>, 1972), do sexo (LESCOAT et al.<sup>119</sup>, 1970 ; ANISCHENKO & GUDKOVA<sup>3</sup>, 1992 ; PARÉ & REDEI<sup>156</sup>, 1993), da idade (RIEGLE<sup>163</sup>, 1973) e, principalmente, da percepção individual do agente como estressor, o que depende de experiências vividas anteriormente e da novidade ou previsibilidade do estímulo (VOGEL & JENSH<sup>206</sup>, 1988 ; GRIFFIN<sup>69</sup>, 1989).

As respostas do organismo, frente a agentes estressores, envolvem várias reações fisiológicas. Inicialmente, o sistema límbico-mesencefálico, em associação com áreas corticais do cérebro, identifica a informação sensorial e, por transmissão neural, emite sinais ativadores ou inibidores para o eixo hipotálamo-hipófise (ELIOT<sup>53</sup>, 1992), promovendo alterações na resposta de vários hormônios, tais como o hormônio do crescimento (KRULICH et al.<sup>112</sup>, 1974 ; SEGGIE & BROWN<sup>176</sup>, 1975 ; LUGER et al.<sup>128</sup>, 1988), hormônio luteinizante (KRULICH et al.<sup>112</sup>, 1974 ; EUKER et al.<sup>56</sup>, 1975), hormônio folículo-estimulante (KRULICH et al.<sup>112</sup>, 1974), prolactina (SEGGIE & BROWN<sup>176</sup>, 1975 ; EUKER et al.<sup>56</sup>, 1975 ; KANT et al.<sup>102</sup>, 1983 ; BÁNKY et al.<sup>8</sup>, 1994) e tireotropina (MILLS & CHIR<sup>143</sup>, 1985).

Associados a essas alterações hormonais, os níveis plasmáticos aumentados de ACTH produzem síntese e liberação de glicocorticóides pelo córtex da adrenal (AXELROD & REISINE<sup>6</sup>, 1984). A ativação do sistema nervoso autônomo simpático e da medula adrenal produzem aumento nos níveis plasmáticos de catecolaminas (NATELSON et al.<sup>149</sup>, 1981 ; AXELROD & REISINE<sup>6</sup>, 1984).

As catecolaminas exercem sua ação por meio de interação com receptores específicos, localizados na membrana plasmática da célula dos diferentes tecidos do organismo, modulando um grande número de respostas fisiológicas. AHLQUIST<sup>2</sup> (1948) classificou esses receptores em  $\alpha$  e  $\beta$ , com base na potência de vários agonistas. Os adrenoceptores  $\alpha$  foram caracterizados pela série de potência a seguir: adrenalina > noradrenalina  $\geq$  isoprenalina, enquanto a série de potência definida para os adrenoceptores  $\beta$  foi: isoprenalina > adrenalina > noradrenalina (STILES et al.<sup>187</sup>, 1984).

Esses receptores diferem entre si quanto à estrutura, afinidade para agonistas e antagonistas e quanto aos sistemas de segundos mensageiros ao qual estão acoplados (BYLUND et al.<sup>30</sup>, 1994 ; STROSBERG<sup>192</sup>, 1995).

Foram identificados quatro subtipos de adrenoceptores  $\alpha$  (BOYAJIAN & LESLIE<sup>24</sup>, 1987 ; HAN et al.<sup>74</sup>, 1987). Os adrenoceptores  $\alpha_{1A}$  e  $\alpha_{1B}$  atuam modulando os níveis de fosfatidil inositol e o fluxo celular de íons cálcio. Os adrenoceptores  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2B}$ , através da ativação de uma proteína  $G_i$ , produzem inibição da adenilil ciclase, com conseqüente redução nos níveis intracelulares de AMP cíclico (FAIN & GARCIA-SÁINZ<sup>57</sup>, 1980 ; LIMBIRD<sup>123</sup>, 1984 ; HOMCY & GRAHAM<sup>88</sup>, 1985).

Os adrenoceptores  $\beta$  foram classificados em três subtipos (LANDS et al.<sup>113</sup>, 1967a ; LANDS et al.<sup>114</sup>, 1967b ; SANO et al.<sup>172</sup>, 1993). Os estudos de biologia molecular permitiram a clonagem do cDNA dos adrenoceptores  $\beta_1$  (FRIELLE et al.<sup>65</sup>, 1987),  $\beta_2$  (DIXON et al.<sup>46</sup>, 1986) e  $\beta_3$  (EMORINE et al.<sup>55</sup>, 1989). Esses receptores atuam através do acúmulo de AMP cíclico, como resultado da ativação da enzima adenilil ciclase por uma proteína  $G_s$  (LEFKOWITZ et al.<sup>117</sup>, 1982 ; LIMBIRD<sup>123</sup>, 1984 ; STILES & LEFKOWITZ<sup>188</sup>, 1984 ; STILES et al.<sup>187</sup>, 1984). O aumento na concentração de AMP cíclico estimula enzimas do tipo quinase A, as quais desencadeiam as respostas fisiológicas subsequentes (BERRIDGE<sup>18</sup>, 1985).

Os adrenoceptores  $\beta$  são constituídos de uma única cadeia polipeptídica que atravessa a membrana plasmática sete vezes, formando hélices dentro da membrana. Essas hélices transmembrana têm característica hidrofóbica

e ligam-se umas as outras por meio de alças hidrofílicas extra e intracelulares. A porção terminal extracelular está conectada a uma amina glicosilada e a intracelular, a uma carboxila (DIXON et al.<sup>48</sup>, 1988 ; STRADER et al.<sup>191</sup>, 1989 ; JASPER & INSEL<sup>95</sup>, 1992 ; COLLINS<sup>40</sup>, 1993).

De especial interesse na estrutura dos adrenoceptores, são os locais envolvidos na ligação com agonistas, antagonistas e com a proteína G. As regiões hidrofílicas, que compõem as alças extra e intracelulares, não são utilizadas para a ligação de substâncias, o que indica que a ligação de agonistas e antagonistas aos receptores, é realizada na região transmembrana, hidrofóbica (DIXON et al.<sup>47</sup>, 1987).

Os locais identificados como fundamentais para essa ligação são dois resíduos de aspartato e dois resíduos de serina localizados na região transmembrana. Os resíduos de aspartato estão localizados na segunda (Asp<sup>79</sup>) e terceira (Asp<sup>113</sup>) hélices, enquanto que os dois resíduos de serina estão localizados na quinta hélice (Ser<sup>204</sup> e Ser<sup>207</sup>) (STRADER et al.<sup>191</sup>, 1989 ; TOTA et al.<sup>196</sup>, 1991 ; JASPER & INSEL<sup>95</sup>, 1992 ; COLLINS<sup>40</sup>, 1993).

A ligação do agonista ao receptor produz alterações conformacionais neste último, promovendo a sua interação com a proteína G (COLLINS<sup>40</sup>, 1993).

KOBILKA et al.<sup>110</sup> (1988), usando quimeras de adrenoceptores  $\alpha_2$  e  $\beta_2$ , determinaram que a quinta e a sexta hélices da região transmembrana, juntamente com a terceira alça citoplasmática, são as regiões responsáveis pelo acoplamento à proteína G. Além disso, HAUSDORFF et al.<sup>81</sup> (1990b) demonstraram que a porção carboxila terminal da terceira alça citoplasmática no adrenoceptor  $\beta_2$  é também importante no acoplamento do receptor à proteína G.

As regiões citoplasmáticas dos receptores possuem grande importância funcional, pois além do acoplamento do receptor com a proteína G ocorrer nessa região, é nela que ocorrem as reações de fosforilação do receptor que constituem um dos mecanismos responsáveis pela sua dessensibilização (HAUSDORFF et al.<sup>80</sup>, 1990a ; LEFKOWITZ et al.<sup>118</sup>, 1990).

A dessensibilização é um estado de diminuição da resposta celular que ocorre após a exposição a agonistas, hormônios ou drogas (STILES et al.<sup>187</sup>, 1984), visando finalizar ou atenuar a resposta (LOHSE<sup>124</sup>, 1993).

O processo de dessensibilização pode ocorrer devido ao desacoplamento entre o receptor e a proteína G, sequestro do receptor ou diminuição no número de receptores, também denominado de "down-regulation" (HARDEN<sup>76</sup>, 1983 ; SIBLEY & LEFKOWITZ<sup>180</sup>, 1985 ; LOHSE<sup>124</sup>, 1993).

O desacoplamento entre o receptor e a proteína G é um mecanismo que ocorre rapidamente como consequência da fosforilação do receptor (LOHSE<sup>124</sup>, 1993).

Os receptores podem sofrer fosforilação através da ação das proteínas quinases A (PKA) e C (PKC) (HAUSDORFF et al.<sup>80</sup>, 1990a ; ZHOU & FISHMAN<sup>214</sup>, 1991 ; LOHSE<sup>124</sup>, 1993) e pela ação de uma proteína quinase específica do adrenoceptor  $\beta$  ( $\beta$ ARK), que produz fosforilação do receptor, somente quando ele está ocupado pelo agonista (BENOVIC et al.<sup>16</sup>, 1989 ; BENOVIC et al.<sup>17</sup>, 1991).

A fosforilação do receptor pela  $\beta$ ARK não produz alterações na capacidade do receptor em ativar a proteína G, contudo a indução desse processo aumenta a afinidade do receptor por uma proteína denominada  $\beta$ -arrestina, que ao ligar-se ao receptor, impede a sua interação com a proteína G, produzindo o fenômeno de dessensibilização (LOHSE et al.<sup>126</sup>, 1990b ; LOHSE et al.<sup>127</sup>, 1992).

Os locais de fosforilação do receptor pela  $\beta$ ARK são os resíduos de serina e treonina, localizados no terminal carboxila intracelular. As proteínas quinases A e C fosforilam o receptor na terceira hélice intracelular e na porção proximal do terminal carboxila (DOHLMAN et al.<sup>49</sup>, 1987 ; HAUSDORFF et al.<sup>80</sup>, 1990a ; LEFKOWITZ et al.<sup>118</sup>, 1990).

A dessensibilização por sequestro do receptor é um processo de desacoplamento físico, no qual o receptor é deslocado da superfície celular para um local intracelular, onde não pode interagir com agonistas hidrofílicos ou com a proteína G (HARDEN<sup>76</sup>, 1983 ; LOHSE<sup>124</sup>, 1993).

O sequestro do receptor e a sua fosforilação pela PKA ou  $\beta$ ARK são mecanismos independentes, pois o bloqueio de um desses mecanismos, não afeta os outros dois, indicando que a fosforilação do receptor não é necessária para que ocorra sequestro (LOHSE et al.<sup>125</sup>, 1990a).

A dessensibilização, derivada do desacoplamento, é um processo rápido, que ocorre dentro de segundos a minutos, após a exposição do tecido a um agonista, contudo o sequestro do receptor, parece exigir um período mais longo que a fosforilação (HAUSDORFF et al.<sup>79</sup>, 1989 ; LOHSE et al.<sup>125</sup>, 1990a ; LOHSE<sup>124</sup>, 1993).

Além dos mecanismos de fosforilação e sequestro, a dessensibilização pode ser produzida pela redução no número de receptores. Este é um processo lento, que dura horas, e que pode não se completar antes de vinte e quatro horas de exposição contínua do receptor a um agonista (LOHSE<sup>124</sup>, 1993 ; COLLINS et al.<sup>42</sup>, 1991). A redução no número de receptores pode ser consequência de aumento na sua degradação e/ou de diminuição de sua síntese (LOHSE<sup>124</sup>, 1993 ; BOUVIER et al.<sup>23</sup>, 1989).

Ao contrário da "down-regulation", a ação de antagonistas (HEDBERG et al.<sup>82</sup>, 1986) ou hormônios (DAVIES & LEFKOWITZ<sup>44</sup>, 1984 ; WILLIAMS et al.<sup>209</sup>, 1977) pode produzir aumento no número de receptores ativos na membrana, também denominado de "up-regulation". A participação dos glicocorticóides, nesses processos, é um dos exemplos clássicos.

Aumento no número de receptores ativos na membrana pela ação de glicocorticóides foi demonstrado em células DDT<sub>1</sub>-MF-2 de camundongos (SCARPACE et al.<sup>174</sup>, 1985), células VA<sub>2</sub>, VA<sub>4</sub> e WI<sub>38</sub> de pulmão humano (FRASER & VENTER<sup>63</sup>, 1980), astrocitomas humanos 1321N1 (FOSTER & HARDEN<sup>61</sup>, 1980), células adiposas 3T3-F442A (FÈVE et al.<sup>58</sup>, 1990) e células DDT<sub>1</sub>-MF-2 de miosarcoma de canal deferente de hamster (NORRIS et al.<sup>152</sup>, 1987).

Os efeitos dos glicocorticóides são mediados pelos receptores para glicocorticóides encontrados no citoplasma celular em quase todas as células de mamíferos (ROSEWICZ et al.<sup>169</sup>, 1988).

Os glicocorticóides entram na célula, por um processo de difusão simples, para ligar-se ao seu receptor formando um complexo ativo. Este complexo penetra no núcleo e liga-se aos elementos de resposta aos glicocorticóides (GREs), localizados na sequência promotora do DNA, passando a aumentar ou diminuir a transcrição gênica (ROSEWICZ et al.<sup>169</sup>, 1988 ; BARNES & ADCOCK<sup>9</sup>, 1993). Alguns locais de ligação desse complexo foram detectados na sequência gênica dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos (CHUNG et al.<sup>38</sup>, 1987 ; EMORINE et al.<sup>54</sup>, 1987).

Além dos glicocorticóides, vários outros hormônios podem induzir alterações na densidade dos adrenoceptores em diferentes tecidos.

Os hormônios tireoidianos aumentaram a densidade de adrenoceptores  $\beta$  no coração de ratos (CIARALDI & MARINETTI<sup>39</sup>, 1977 ; BANERJEE & KUNG<sup>7</sup>, 1977 ; WILLIAMS et al.<sup>209</sup>, 1977).

O tratamento com estradiol produziu aumento no número de receptores  $\alpha$  no útero (ROBERTS et al.<sup>164</sup>, 1977 ; ROBERTS et al.<sup>166</sup>, 1981) e na bexiga urinária de coelhas (LEVIN et al.<sup>120</sup>, 1980), enquanto que, em plaquetas, a sua ação reduziu o número desses receptores (ROBERTS et al.<sup>165</sup>, 1979). A progesterona produziu alterações na densidade dos receptores  $\beta$  no útero (KANO<sup>101</sup>, 1982) e córtex frontal de ratas (MAGGI et al.<sup>132</sup>, 1985).

Em tecido cardíaco, a terapia substitutiva com estradiol e progesterona, em ratas ovariectomizadas, aumentou a densidade dos adrenoceptores  $\beta$  (KLANGKALYA & CHAN<sup>109</sup>, 1988).

As respostas teciduais à ação das catecolaminas são determinadas não somente pela interação dessas substâncias com os receptores, mas também pela sua modulação pelos sistemas de captação extraneuronal e de recaptção neuronal.

Estes sistemas são responsáveis pela metabolização das catecolaminas e diferenciam-se entre si pela sua localização e cinética específica (IVERSEN<sup>91</sup>, 1963 ; TRENDELENBURG<sup>197</sup>, 1963 ; BURGEM & IVERSEN<sup>28</sup>, 1965 ; CALLIGHAM & BURGEM<sup>34</sup>, 1966).

O principal substrato do sistema de captação extraneuronal é a isoprenalina, seguida pela adrenalina e noradrenalina (BONISCH<sup>20</sup>, 1978 ; BONISCH<sup>21</sup>, 1980). Nesse sistema, os substratos são transportados para o interior da célula por um processo de difusão facilitada, e metabolizados intracelularmente por orto-metilação, pela ação da enzima catecol-orto-metil transferase (COMT) (BONISCH & TRENDELENBURG<sup>22</sup>, 1974 ; TRENDELENBURG & GRAEFE<sup>202</sup>, 1975 ; BONISCH<sup>20</sup>, 1978 ; TRENDELENBURG<sup>199</sup>, 1978 ; BONISCH<sup>21</sup>, 1980).

A ordem de afinidade do sistema de recaptação neuronal pelas catecolaminas é inversa a do sistema de captação extraneuronal, sendo a noradrenalina o seu principal substrato (IVERSEN<sup>91</sup>, 1963 ; CALLIGHAM & BURGEM<sup>34</sup>, 1966).

Na recaptação neuronal, as catecolaminas são metabolizadas por oxidação, pela ação da enzima monoamino oxidase (MAO), após a sua recaptação pelas terminações nervosas (SHORE<sup>179</sup>, 1972 ; SLOTKIN & BAREIS<sup>181</sup>, 1980 ; ABELL<sup>1</sup>, 1987 ; TRENDELENBURG<sup>201</sup>, 1991).

A eficiência dos sistemas de captação extraneuronal e de recaptação neuronal pode ser alterada pela ação de diversas substâncias.

A captação extraneuronal é inibida pela ação da corticosterona e do estradiol (IVERSEN & SALT<sup>93</sup>, 1970), enquanto que a eficiência do sistema de recaptação neuronal pode ser alterada pela modulação na atividade da MAO.

Em células de linhagem SK-ER3 de neuroblastoma humano, a atividade da MAO foi diminuída após tratamento com estradiol (MA et al.<sup>129</sup>, 1993). Em placenta humana, após tratamento com estriol e ou progesterona, a atividade da MAO e da COMT foi também reduzida (SAARIKOSKI<sup>170</sup>, 1988).

O átrio direito isolado de ratos vem sendo amplamente utilizado para estudar os adrenoceptores e a modulação da resposta cronotrópica às catecolaminas pelos sistemas de metabolização.

Em condições normais o átrio direito de ratos recebe inervação do sistema nervoso autônomo simpático, e a resposta cronotrópica às catecolaminas é mediada por uma população homogênea de adrenoceptores do subtipo  $\beta_1$

(IMMS et al.<sup>90</sup>, 1979 ; MINNEMAN & MOLINOFF<sup>145</sup>, 1980 ; BRYAN et al.<sup>26</sup>, 1981 ; CALLIA & DE MORAES<sup>33</sup>, 1984). Contudo, a utilização de radioligantes demonstrou que, no tecido atrial direito de ratos, existe uma população heterogênea de adrenoceptores  $\beta$ . MINNEMAN et al.<sup>146</sup> (1979) observaram a presença de 83% de adrenoceptores  $\beta_1$  e 17% de adrenoceptores  $\beta_2$  no coração do ratos, enquanto que JUBERG et al.<sup>98</sup> (1985) detectaram, no átrio direito, 67% de adrenoceptores  $\beta_1$  e 33% de adrenoceptores  $\beta_2$ . Apesar de eficaz, a utilização desse recurso não demonstra evidências da participação funcional dos adrenoceptores  $\beta_2$  mediando respostas cronotrópicas neste tecido.

JUBERG et al.<sup>98</sup> (1985) sugeriram que, no coração de ratos, os adrenoceptores  $\beta_1$  estariam relacionados à mediação dos efeitos cronotrópicos e inotrópicos das catecolaminas, enquanto os adrenoceptores  $\beta_2$  poderiam estar relacionados às respostas metabólicas.

O'DONNELL & WANSTALL<sup>154</sup> (1985) foram as primeiras a sugerir que os adrenoceptores  $\beta_2$  poderiam participar da resposta cronotrópica às catecolaminas no tecido atrial de ratos, demonstrando que o efeito cronotrópico positivo do procatérol, que é um agonista seletivo de adrenoceptores  $\beta_2$ , foi bloqueado pelo ICI 118,551, um antagonista também seletivo  $\beta_2$ .

KAUMANN<sup>104</sup> (1986) propôs que o efeito cronotrópico das catecolaminas seria mediado principalmente por adrenoceptores  $\beta_1$ , mas que adrenoceptores  $\beta_2$  poderiam participar da resposta cronotrópica a altas concentrações de (-)-adrenalina.

A participação dos adrenoceptores  $\beta_2$ , na resposta cronotrópica às catecolaminas, foi também demonstrada em átrios direitos isolados de ratos submetidos a choques nas patas (BASSANI & DE MORAES<sup>14</sup>, 1988) ou baixas temperaturas (CALLIA & DE MORAES<sup>33</sup>, 1984), levando a alterações na sensibilidade do tecido às catecolaminas.

A sensibilidade do tecido atrial aos efeitos cronotrópicos das catecolaminas é determinada pela ação dos sistemas de metabolização, que limitam a meia vida do agonista na biofase, pelo número ou afinidade dos

receptores aos agonistas ou pelo acoplamento entre os receptores e os sistemas de segundos mensageiros.

Essa sensibilidade pode ser alterada por diversos fatores, entre eles os mecanismos adaptativos associados à reação de estresse, como tem sido exaustivamente demonstrado em átrios direitos isolados de ratos machos submetidos a diferentes agentes estressores (CALLIA & DE MORAES<sup>33</sup>, 1984 ; BASSANI & DE MORAES<sup>13</sup>, 1987 ; BASSANI & DE MORAES<sup>14</sup>, 1988 ; SPADARI & DE MORAES<sup>185</sup>, 1988 ; SPADARI et al.<sup>186</sup>, 1988 ; CAPAZ & DE MORAES<sup>35</sup>, 1988).

Essas alterações de sensibilidade do tecido atrial estariam relacionadas, em parte, ao aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona (SPADARI & DE MORAES<sup>185</sup>, 1988), uma vez que a subsensibilidade aos efeitos cronotrópicos da noradrenalina e/ou isoprenalina, em átrios direitos de ratos submetidos à imobilização ou natação, foi cancelada após adrenalectomia bilateral ou inibição da síntese de corticosterona e não foi obtida após a infusão de catecolaminas em ratos adrenalectomizados (CAPAZ & DE MORAES<sup>35</sup>, 1988 ; SPADARI & DE MORAES<sup>185</sup>, 1988).

Além disso, a administração do composto RU-28362, que é um agonista dos receptores de glicocorticóides, durante três dias consecutivos, a ratos normais não submetidos a estresse, produziu supersensibilidade do tecido atrial aos efeitos cronotrópicos da isoprenalina. Por outro lado, a administração do antagonista RU-38486 (MOQUILESWSKY & PHILIBERT<sup>147</sup>, 1984), antes da aplicação de choques nas patas, impediu as alterações de sensibilidade do átrio direito isolado de ratos submetidos a este agente estressor (NOURANI et al.<sup>153</sup>, 1992).

Em átrios direitos isolados de ratas, os estudos da influência do estresse nas alterações de sensibilidade do tecido atrial são escassos.

Utilizando a natação como modelo experimental, MARCONDES<sup>136</sup> (1995) observou, em ratas, que a aplicação de uma sessão de 50 minutos de natação, induziu subsensibilidade à isoprenalina, quando o animal foi sacrificado no estro e, subsensibilidade aos efeitos cronotrópicos da noradrenalina e

adrenalina, quando o sacrifício ocorreu no diestro. Quando os animais foram submetidos a três sessões de natação e sacrificados no estro, não foram observadas alterações de sensibilidade do tecido atrial às catecolaminas. Contudo, quando o sacrifício ocorreu no diestro, o tecido atrial apresentou subsensibilidade aos efeitos cronotrópicos da noradrenalina e da adrenalina.

A autora concluiu, em seu trabalho, que as alterações de sensibilidade do tecido atrial, observadas em ratas submetidas a estresse por natação, são dependentes das fases do ciclo estral e dos níveis plasmáticos de corticosterona, e sugeriu que os esteróides sexuais também participariam na mediação dessas alterações (MARCONDES<sup>136</sup>, 1995).

O ciclo estral, em ratas, pode durar de 4 a 5 dias, o qual é caracterizado por apresentar quatro fases distintas, denominadas de proestro, estro, metaestro e diestro (HOUSSAY<sup>89</sup>, 1980 ; FREEMAN<sup>64</sup>, 1988), nas quais ocorrem variações dos níveis plasmáticos de corticosterona e de esteróides sexuais.

Em relação aos esteróides sexuais, os menores níveis plasmáticos de estradiol são encontrados durante o estro, aumentando no metaestro, para atingir um pico no proestro (BROWN-GRANT et al.<sup>25</sup>, 1970 ; NAFTOLIN et al.<sup>148</sup>, 1972 ; DUPON & KIM<sup>52</sup>, 1973 ; BUTCHER et al.<sup>29</sup>, 1974 ; SHAIKH & SHAIKH<sup>178</sup>, 1975 ; FREEMAN<sup>64</sup>, 1988). Os níveis plasmáticos de progesterona apresentam um pico durante o metaestro e outro durante o proestro, sendo os menores níveis encontrados durante o diestro (BUTCHER et al.<sup>29</sup>, 1974 ; NEQUIN et al.<sup>150</sup>, 1979 ; FREEMAN<sup>64</sup>, 1988). Um pico na secreção de testosterona foi detectado durante a fase de proestro (DUPON & KIM<sup>52</sup>, 1973).

Os níveis plasmáticos de corticosterona apresentam grandes variações que estão relacionadas com o ritmo circadiano, sendo altos no início do período noturno e baixos no início do período diurno (TORRELLAS et al.<sup>195</sup>, 1981). Variam também com as fases do ciclo estral (RAPS et al.<sup>162</sup>, 1971). Os maiores níveis plasmáticos de corticosterona foram detectados durante a fase de proestro, em comparação com as demais fases do ciclo estral (RAPS et al.<sup>162</sup>, 1971 ; PHYLLIPS & POOLSANGUAN<sup>158</sup>, 1978 ; BARON & BRUSH<sup>11</sup>, 1979).

Níveis plasmáticos de corticosterona mais elevados no diestro (BARON & BRUSH<sup>11</sup>, 1979 ; RODRIGUES et al.<sup>168</sup>, 1992), em relação ao estro, foram também detectados.

Ratos e ratas apresentam grandes diferenças quanto ao ritmo circadiano da secreção de fator liberador de corticotrofina pelo hipotálamo (HIROSHIGE et al.<sup>85</sup>, 1973). Quanto a liberação de ACTH pela hipófise e, de corticosterona pelas adrenais (MALENDOWICZ<sup>134</sup>, 1976) o ritmo é semelhante, contudo os níveis plasmáticos são diferentes.

As glândulas adrenais, de machos e fêmeas, diferem com relação à sua estrutura. Nas fêmeas, essas glândulas são maiores do que em machos, mas o número de células parenquimais, é similar entre os sexos (KASPRZAK et al.<sup>103</sup>, 1986). Essa alteração estrutural parece estar relacionada a diferenças funcionais, pois a secreção de corticosterona é mais elevada nas fêmeas (MALENDOWICZ<sup>134</sup>, 1976).

A secreção de corticosterona, em resposta ao estresse, também varia entre ratos e ratas.

As fêmeas apresentam aumento mais rápido, nas concentrações de corticosterona plasmática, do que a observada em machos, em resposta ao estresse por imobilização (HALEEM et al.<sup>73</sup>, 1988), exposição a um ambiente desconhecido (LESCOAT et al.<sup>119</sup>, 1970) ou ao éter (KITAY<sup>108</sup>, 1961).

Além disso, em fêmeas, as alterações nos níveis plasmáticos de corticosterona, frente a um agente estressor, também estão relacionadas com as fases do ciclo estral e dependem do tipo de estresse aplicado.

POLLARD et al.<sup>161</sup> (1975) observaram que, a administração de choques nas patas, produziu aumentos maiores nos níveis plasmáticos de corticosterona durante o proestro em comparação com o estro e/ou diestro.

BARON & BRUSH<sup>11</sup> (1979) detectaram aumentos significativos dos níveis plasmáticos de corticosterona, apenas durante o estro, em ratas submetidas a estresse por imobilização. Por outro lado, VIAU & MEANEY<sup>205</sup> (1991), com esse mesmo tipo de estresse, observaram maiores níveis plasmáticos

de corticosterona, em fêmeas, durante o proestro, em comparação ao estro ou diestro.

Em ratas submetidas a 50 minutos de natação, RODRIGUES et al.<sup>168</sup> (1992) observaram um aumento de 5 vezes nos níveis plasmáticos de corticosterona, quando a aplicação do estresse ocorreu no diestro e, de 2 vezes, durante o estro.

MARCONDES & SPADARI<sup>137</sup> (1993) avaliando os níveis plasmáticos de corticosterona em ratas submetidas a três sessões consecutivas de natação, com início no estro ou no diestro, observaram um aumento de 5 e 6 vezes, respectivamente, na concentração plasmática de corticosterona, após a 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> sessões de natação, sendo que, o aumento foi menor após a 3<sup>a</sup> sessão.

Como podemos observar, as fêmeas possuem um perfil hormonal que varia com as fases do ciclo estral e com o estresse, e que difere do perfil apresentado por machos. Esse perfil hormonal influencia as alterações de sensibilidade do tecido atrial aos efeitos cronotrópicos das catecolaminas (SPADARI & DE MORAES<sup>185</sup>, 1988 ; MARCONDES<sup>136</sup>, 1995) e adiciona um certo grau de complexidade ao sistema adaptativo, em fêmeas, frente a um agente estressor.

Em ratos, a aplicação de choques nas patas, produz alterações de sensibilidade do tecido atrial, que são bem estabelecidas (BASSANI & DE MORAES<sup>12</sup>, 1986 ; BASSANI & DE MORAES<sup>13</sup>, 1987 ; BASSANI & DE MORAES<sup>14</sup>, 1988), enquanto que em fêmeas submetidas a esse agente estressor, essas alterações não foram ainda investigadas.

Portanto, diante destes fatos, algumas questões apareceram. Quais as alterações de sensibilidade do tecido atrial, em fêmeas submetidas a estresse por choques nas patas e sacrificadas durante o estro ou o diestro? O perfil hormonal, diferente durante as fases do ciclo estral e em resposta ao estresse, interferiria nas alterações de sensibilidade? Quais os mecanismos envolvidos com essas alterações? Esses mecanismos são diferentes entre machos e fêmeas? O delineamento desse trabalho buscou responder a estas questões.

## **2. OBJETIVOS.**

1 - Descrever as alterações de sensibilidade aos efeitos cronotrópicos da adrenalina, noradrenalina e do soterenol, do tecido atrial direito de ratas submetidas a estresse por choques nas patas e sacrificadas durante o estro ou diestro.

2 - Verificar se a fase do ciclo estral em que o animal foi sacrificado, interfere com as alterações de sensibilidade do tecido atrial.

3 - Descrever os mecanismos desencadeados pela reação de estresse, para a modulação da sensibilidade às catecolaminas, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a estresse por choques nas patas e sacrificadas durante o estro ou diestro.

4 - Comparar as alterações de sensibilidade do tecido atrial de fêmeas submetidas a choques nas patas, com as descritas na literatura para machos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS.

#### 3.1. Animais.

Utilizamos ratas da linhagem Wistar S.P.F. (*Rattus norvegicus*, var. albina, Rodentia, Mammalia), com idade entre 100 e 180 dias, pesando entre 175 e 250 gramas, as quais foram fornecidas pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP, em gaiolas plásticas (30 x 16 x 19 cm) coletivas, com no máximo cinco animais em cada gaiola. Esses animais permaneceram no biotério pelo menos por uma semana antes de serem utilizados, onde a temperatura média era de  $22 \pm 2$  °C e o ciclo claro/escuro de 12 horas, com o ciclo claro iniciando-se às 6:30 horas, sendo alimentados com ração padrão (Purina) e água de torneira fornecidas *ad libitum*.

#### 3.2. Determinação das Fases do Ciclo Estral.

As fases do ciclo estral foram determinadas diariamente, entre 7:30 e 9:30 horas, por meio de esfregaço vaginal, durante oito dias consecutivos (dois ciclos), no mínimo. As ratas que apresentaram ciclo estral regular de 4 dias (proestro, estro, metaestro e diestro) foram utilizadas (SMITH et al.<sup>182</sup>, 1973). Foram descartadas ratas que apresentaram ciclos mais longos ou irregulares, caracterizados por ausência ou permanência além do período médio normal, em uma das fases do ciclo (DRICKAMER<sup>50</sup>, 1987).

#### 3.3. Grupos.

Os animais foram distribuídos em quatro grupos. Os animais dos grupos experimentais foram submetidos a três sessões de choques nas patas, com início no estro e sacrifício no diestro (Grupo Diestro) ou, com início no diestro e sacrifício no estro (Grupo Estro). Os animais dos grupos controles foram sacrificados na mesma fase em que foram sacrificados os animais dos grupos experimentais e sofreram os mesmos procedimentos que os dos grupos

experimentais, com exceção da aplicação de choques nas patas. Esses grupos podem ser melhor visualizados na tabela 1.

Tabela 1 - Grupos utilizados durante os experimentos.

<b>GRUPOS</b>	<b>EXPERIMENTAL</b>	<b>CONTROLE</b>
<b>DIESTRO</b>	E,M,D <sup>a</sup>	D
<b>ESTRO</b>	D,P,E	E

<sup>a</sup>Fases do ciclo estral : Proestro (P), Estro (E), Metaestro (M) e Diestro (D).

#### *3.4. Protocolo de Estresse.*

Os animais dos grupos experimentais foram submetidos a três sessões, em dias consecutivos, de choques nas patas não sinalizados e inescapáveis, durante aproximadamente 30 minutos, entre 8:00 e 11:00 horas. Os choques foram aplicados em uma câmara de acrílico (26 x 21 x 26 cm), com piso constituído de barras cilíndricas de aço inoxidável, com 0,3 cm de diâmetro, espaçadas entre si por 1,0 cm.

A aplicação dos choques obedeceu aos princípios descritos por HOFFMAN & FLESHLER<sup>86</sup> (1962), utilizando-se um microprocessador construído no Departamento de Engenharia Biomédica da Faculdade de Engenharia Elétrica da Universidade Estadual de Campinas. A intensidade da corrente foi de 1,0 mA e a duração de 1,0 segundo. Cada rata recebeu 120 choques, distribuídos a intervalos randômicos de 5 a 25 segundos, com um intervalo médio de 15 segundos. Ao final de cada sessão, o animal retornou a sua gaiola moradia e, imediatamente após a última sessão de choques, foi sacrificado.

#### *3.5. Átrio Direito Isolado.*

Para o estudo da sensibilidade às catecolaminas em átrio direito isolado, os animais foram sacrificados por um golpe na cabeça e imediata secção dos vasos cervicais. O tórax foi aberto, o coração rapidamente removido e o átrio

direito foi isolado, assegurando-se a integridade do nódulo sino-atrial. O átrio direito foi preparado para registro isométrico de suas contrações espontâneas, sob tensão diastólica de 0,5 gf, em uma cuba para órgão isolado, contendo 20 ml de solução de Krebs-Henseleit, 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 (BASSANI & DE MORAES<sup>14</sup>, 1988). O ácido ascórbico foi adicionado para reduzir a oxidação das catecolaminas, durante a obtenção das curvas concentração/efeito.

O líquido de incubação foi mantido a  $36,5 \pm 0,1$  °C com auxílio de uma bomba de perfusão Haake (modelo FEN) e saturado com carbogênio (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>).

Para o registro das contrações espontâneas foi utilizado um transdutor isométrico de tensão Narco Bio-System (modelo F-60) conectado a um polígrafo Narco Bio-System (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 um intervalo 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 sua frequência após 60 minutos de incubação, foram descartados.

### **3.6. Curvas Concentração/Efeito.**

Curvas concentração/efeito para noradrenalina, adrenalina e soterenol foram obtidas após a estabilização da preparação, sem tratamento farmacológico "*in vitro*". De acordo com experimentos anteriores, realizados no laboratório, a obtenção de até três curvas concentração/efeito, em um mesmo átrio, não provoca dessensibilização da preparação. Portanto, sempre que possível, foi obtida mais de uma curva em cada preparação. Após o término de uma curva, a preparação era lavada várias vezes, até que a frequência retornasse próxima ao valor obtido antes da realização da curva. Os átrios que não recuperaram sua frequência foram descartados. Aqueles que o faziam, eram

utilizados para obtenção de outra curva concentração/efeito, com outro protocolo experimental.

As curvas concentração/efeito foram obtidas utilizando-se o método cumulativo, com incrementos sucessivos de 0,5 unidade logarítmica na concentração molar do agonista (VAN ROSSUM<sup>204</sup>, 1963). A resposta máxima foi determinada quando três concentrações sucessivas e crescentes do agonista não causaram alterações da resposta obtida com a concentração imediatamente anterior.

A sensibilidade do átrio direito foi avaliada pela determinação do valor  $pD_2$ , que corresponde ao logaritmo negativo da concentração molar do agonista que determina uma resposta igual a 50% da resposta máxima, em cada experimento ( $EC_{50}$ ).

### ***3.7. Tratamento Farmacológico "in vitro".***

Em alguns experimentos, a preparação foi submetida a tratamento farmacológico antes da obtenção das curvas concentração/efeito para adrenalina ou noradrenalina. Esse tratamento farmacológico tem por objetivo produzir desnervação adrenérgica, para evitar a liberação de noradrenalina endógena, bloqueio dos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos e muscarínicos, bem como inibição dos mecanismos de recaptção neuronal e captação extraneuronal. A realização de um ou mais desses procedimentos ficou na dependência do objetivo a ser atingido.

#### **a. Desnervação Adrenérgica.**

A desnervação adrenérgica (APRIGLIANO & HERMSMEYER<sup>4</sup>, 1976) foi feita através da exposição da preparação a 6-hidroxiopamina (38  $\mu$ M) por 16 minutos, divididos em dois tempos de 8 minutos cada. Para evitar a oxidação da 6-hidroxiopamina, ela foi adicionada a uma solução de Krebs-Henseleit modificada, onde foram omitidos o  $NaHCO_3$  e o  $KH_2PO_4$  e adicionado o antioxidante glutation (31  $\mu$ M). O pH da solução foi reduzido a 4,9 pela

remoção do  $\text{NaHCO}_3$  e a adição de glutathione. Entretanto apesar da acidificação temporária do meio, não ocorre deterioração do tecido.

Após o período de 16 minutos, o líquido de incubação foi substituído pela solução original de Krebs-Henseleit, trocada aos 15 e 30 minutos.

#### **b. Inibição do Sistema de Captação Extraneuronal.**

A inibição do sistema de captação extra-neuronal foi realizada pela adição de fenoxibenzamina ( $10 \mu\text{M}$ ) ao líquido de incubação. A fenoxibenzamina promove a inibição do sistema de captação extra-neuronal e recaptção neuronal (IVERSEN et al.<sup>94</sup>, 1972), bloqueio dos adrenoreceptores  $\alpha$  (BESSE & FURCHGOTT<sup>19</sup>, 1976) e dos receptores colinérgicos muscarínicos (FURCHGOTT & BURSZTYN<sup>66</sup>, 1967).

A fenoxibenzamina ficou em contato com a preparação por 15 minutos e, após esse período, o líquido de incubação foi substituído por solução de Krebs-Henseleit, trocada a cada 10 minutos, até o retorno de uma frequência próxima a inicial.

Quando a curva concentração/efeito para a adrenalina foi realizada, para garantir o bloqueio do processo de captação extraneuronal, após a estabilização da frequência de batimentos, corticosterona foi adicionada à preparação, na concentração de  $30 \mu\text{M}$ . A corticosterona permaneceu em contato com o líquido de incubação por um período mínimo de 15 minutos antes e durante a referida curva concentração/efeito.

A corticosterona é um potente inibidor do mecanismo do processo de captação extraneuronal (IVERSEN & SALT<sup>93</sup>, 1970 ; BONISCH & TRENDELENBURG<sup>22</sup>, 1974).

#### **c. Inibição do Sistema de Recaptção Neuronal.**

O sistema de recaptção neuronal foi inibido pela adição de desipramina ( $0,1 \mu\text{M}$ ) ao líquido de incubação (SALT<sup>171</sup>, 1972), no mínimo 15 minutos antes do início da curva concentração/efeito, sendo que esta permaneceu

em contato com a preparação durante a realização da curva. A inibição desse sistema foi realizada quando os agonistas utilizados foram a noradrenalina e a adrenalina.

### **3.8. Curva Concentração/Efeito na Presença de Antagonista $\beta_2$**

Para avaliar a participação dos adrenoceptores  $\beta_2$  na resposta cronotrópica às catecolaminas, curvas concentração/efeito à noradrenalina e à adrenalina foram obtidas na presença de butoxamina, que é um antagonista seletivo dos adrenoceptores  $\beta_2$  (LEVY<sup>121</sup>, 1966).

A butoxamina na concentração de 1  $\mu$ M foi adicionada após a realização do pré-tratamento completo, no mínimo 60 minutos antes da obtenção da curva concentração/efeito.

### **3.9. Determinação do valor $pA_2$ do Metoprolol.**

A determinação do valor  $pA_2$  do metoprolol foi realizada utilizando-se o método de SCHILD (SCHILD<sup>175</sup>, 1947 ; ARUNLAKSHANA & SCHILD<sup>5</sup>, 1959). Após a realização do tratamento farmacológico completo, foram obtidas curvas concentração/efeito para a noradrenalina e adrenalina, na presença e ausência de concentrações diferentes de metoprolol. O antagonista permaneceu em contato com a preparação durante 60 min antes do início da curva concentração/efeito.

Após a obtenção das curvas, foram calculadas as razões das concentrações equiefetivas (DR), a partir da  $EC_{50}$  ( $pD_2 = - \log EC_{50}$ ) do agonista, na presença e na ausência do antagonista. A partir desses resultados, os gráficos de Schild foram construídos, comparando-se os logaritmos de (DR - 1) com os logaritmos negativos das concentrações molares do antagonista.

O procedimento experimental foi considerado aceitável, para cálculo do valor  $pA_2$ , quando a reta de regressão do gráfico de Schild apresentou coeficiente angular não diferente estatisticamente de 1.0, e o valor  $pA_2$  foi independente das concentrações do antagonista (MACKAY<sup>130</sup>, 1978), em experimentos controle.

Quando isso ocorreu o valor  $K_B$  ( $pA_2 = -\log K_B$ ) foi determinado através do método de BESSE & FURCHGOTT<sup>19</sup> (1976) como:

$$K_B = [B] / (DR - 1)$$

Onde [B] indica a concentração molar do antagonista. Esse valor foi apresentado como logaritmo negativo, ou  $pA_2$ .

### *3.10. Fármacos e Reagentes.*

Para a preparação da solução de Krebs-Henseleit, foram utilizados sais de padrão analítico e água desionizada. Os fármacos utilizados foram : (-)-adrenalina base livre (Sigma Chem. Co.), cloridrato de butoxamina (Burroughs Wellcome), cloridrato de metoprolol (Burroughs Wellcome), cloridrato de soterenol (Bristol-Myers Co.), corticosterona (Sigma Chem. Co.), fenoxibenzamina base livre (SKF Labs), glutation (Fisher Sc. CO.), hidrocloreto de desipramina (Sigma Chem. Co.), noradrenalina base livre (Sigma Chem. Co.) e 6-hidroxidopamina (Sigma Chem. CO.).

As soluções estoques foram preparadas em solução aquosa de ácido ascórbico a 2%, e armazenadas a  $-20^\circ\text{C}$ , por no máximo 7 dias. A fenoxibenzamina e a corticosterona foram preparadas em etanol absoluto e armazenadas a  $-20^\circ\text{C}$ , por até 30 dias. As diluições, para a curva concentração/efeito, foram feitas em solução de Krebs-Henseleit, imediatamente antes do uso, e descartadas em seguida.

### *3.11. Análise Estatística.*

Os resultados foram analisados através de análise de variância monofatorial ou bifatorial, seguida do teste de Scheffé (ZAR<sup>213</sup>, 1984) para comparar os valores  $pA_2$ , a frequência inicial de batimentos espontâneos, a resposta máxima e os valores  $pD_2$ , nos vários protocolos experimentais dos grupos controles e estressados entre si.

Para analisar o efeito do estresse sobre a resposta às catecolaminas, na mesma fase do ciclo estral, foi utilizado o teste "t" de Student para dados não pareados, através da comparação das médias de cada grupo experimental com seu respectivo grupo controle.

Diferenças nesses testes foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de "p" foi menor que 0,05. Os valores obtidos durante os experimentos estão expressos como médias aritméticas, com seus respectivos erros padrão.

As regressões lineares foram calculadas pelo método dos quadrados mínimos (SNEDECOR & COCHRAN<sup>183</sup>, 1967).

## 4. RESULTADOS.

Os resultados obtidos serão analisados quanto à frequência espontânea de batimentos dos átrios direitos isolados, respostas máximas e valores  $pD_2$  de agonistas, considerados como indicativos da sensibilidade dos tecidos, e valores  $pA_2$  dos antagonistas.

Nas figuras representativas das curvas concentração/efeito, os erros padrão das médias não foram superiores a 10% dos valores médios calculados para cada ponto das curvas. Para evidenciar as alterações de sensibilidade que foram observadas, nas curvas concentração/efeito o eixo das ordenadas apresenta a resposta do tecido em porcentagem da resposta máxima, independente do seu significado estatístico. No eixo das abcissas estão representados os logaritmos negativos das concentrações molares dos agonistas que foram utilizados.

O número de experimentos utilizados para a elaboração de cada curva concentração/efeito está indicado na tabela correspondente de valores  $pD_2$ .

### 4.1. *Frequência Espontânea de Batimentos.*

A análise da frequência espontânea de batimentos dos átrios direitos isolados, quando curvas concentração/efeito para adrenalina e noradrenalina foram determinadas, será realizada conjuntamente, uma vez que ela independe do agonista. As frequências espontâneas de batimentos, após tratamento farmacológico, serão analisadas em conjunto.

Como podemos observar, na tabela 2, átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas e sacrificadas em diestro, não apresentaram diferenças significativas de sua frequência de batimentos espontâneos, quando comparados com os respectivos controles, antes ou após tratamento farmacológico "*in vitro*" que promoveu desnervação adrenérgica, bloqueio dos receptores muscarínicos e  $\alpha$ -adrenérgicos e, inibição dos processos de metabolização de catecolaminas, bem como, após bloqueio dos adrenoceptores  $\beta_2$ .

O tratamento farmacológico completo, induziu aumento da frequência de batimentos espontâneos dos átrios direitos isolados dos grupos experimentais e controles, quando comparados com os respectivos grupos sem tratamento farmacológico

A frequência de batimentos espontâneos dos átrios direitos de ratas submetidas a choques nas patas e sacrificadas em diestro, estabilizou-se dentro de 60 min e variou de 210 a 280 batimentos por minuto (bpm), com valor médio de  $255 \pm 04$  bpm. Após o tratamento "*in vitro*" da preparação, a frequência de batimentos espontâneos variou de 210 a 370 bpm, com valor médio de  $278 \pm 07$  bpm.

No grupo controle, sem pré-tratamento sacrificado no diestro, a frequência de batimentos espontâneos variou de 220 a 280 bpm, com valor médio de  $260 \pm 05$  bpm, e nos grupos controles submetidos a pré-tratamento, essa variação foi de 210 a 380 bpm, com valor médio de  $293 \pm 06$  bpm.

Em átrios direitos de ratas submetidas ao mesmo protocolo de estresse e sacrificadas em estro, com exceção dos animais submetidos a choques nas patas cujos átrios direitos isolados foram tratados apenas com 6-OHDA e desipramina, não observamos diferenças estatisticamente significantes na frequência de batimentos espontâneos, quando comparados com os respectivos controles, antes ou após os tratamentos farmacológicos "*in vitro*" utilizados (tabela 2).

O tratamento farmacológico induziu um aumento da frequência de batimentos espontâneos dos átrios direitos isolados de alguns grupos experimentais e controles, quando comparados com o respectivo grupo sem tratamento farmacológico.

A frequência de batimentos espontâneos dos átrios direitos de ratas submetidas a choques nas patas e sacrificadas no estro, também se estabilizou dentro de 60 minutos e variou de 220 a 270 bpm, com um valor médio de  $244 \pm 04$  bpm. A frequência de batimentos espontâneos dos átrios direitos submetidos a tratamento farmacológico "*in vitro*" variou de 250 a 390 bpm, com valor médio de  $308 \pm 08$  bpm.

No grupo controle, a variação da frequência foi de 220 a 290 bpm, com média de  $255 \pm 05$  bpm, e após tratamento farmacológico, essa variação foi de 240 a 390 bpm, com valor médio de  $302 \pm 08$  bpm.

Assim sendo, os dados da tabela 2 demonstram que a frequência de batimentos espontâneos de átrios direitos de ratas não é influenciada, de maneira significativa, nem pelas fases do ciclo estral, nem pelo protocolo de estresse por nós empregado.

Tabela 2 - Valores de frequência de batimentos espontâneos<sup>a</sup> de átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas e sacrificadas no **diestro** ou no **estro**.

<b>Grupos</b>	<b>Sem Pré- Tratamento</b>	<b>6-OHDA + Desipramina</b>	<b>Com Pré- Tratamento</b>	<b>Pré-Tratamento + Butoxamina</b>
<b>DIESTRO</b>				
<b>Controle</b>	260 ± 05 (12) <sup>b</sup>	294 ± 14 (07)	304 ± 10 <sup>c</sup> (14)	275 ± 10 (14)
<b>Experimental</b>	255 ± 04 (20)	276 ± 18 (07)	290 ± 09 <sup>c</sup> (12)	269 ± 12 (13)
<b>ESTRO</b>				
<b>Controle</b>	255 ± 05 (17)	293 ± 12 (09)	335 ± 14 <sup>c</sup> (13)	278 ± 08 <sup>c</sup> (15)
<b>Experimental</b>	244 ± 04 (11)	338 ± 14 <sup>c,*</sup> (05)	320 ± 11 <sup>c</sup> (12)	283 ± 09 <sup>c,d</sup> (11)

<sup>a</sup>Valores médios (acompanhados dos respectivos erros padrões das médias) em bpm. <sup>b</sup>Os números colocados entre parênteses, imediatamente abaixo de cada valor médio, representam o número de experimentos daquele grupo.

<sup>c</sup>Diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo sem pré-tratamento ( $p < 0,05$  ; teste de Scheffé). <sup>d</sup>Diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo tratado com 6-OHDA +

desipramina ( $p < 0,05$  ; teste de Scheffé). <sup>e</sup>Diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo com pré-tratamento ( $p < 0,05$  ; teste de Scheffé). \*Diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo controle ( $p < 0,05$  ; teste t de Student).

#### 4.2. Sensibilidade à Adrenalina.

Ocorreu aumento da resposta máxima à adrenalina em átrios direitos isolados de ratas submetidas a estresse, independente da fase do ciclo estral em que o animal foi sacrificado. Esse aumento da resposta máxima à adrenalina foi cancelado quando as curvas concentração/efeito foram obtidas após tratamento farmacológico "in vitro" (tabela 3).

A análise dos valores  $pD_2$  da adrenalina demonstra que átrios direitos de ratas controles são mais sensíveis à adrenalina durante o diestro do que durante o estro (tabela 4), bem como, o estresse por choques nas patas, determinou um desvio à direita na curva concentração/efeito à adrenalina obtida em átrios direitos de ratas sacrificadas no diestro (tabela 4 e figura 1). Este efeito do estresse não foi observado durante o estro (tabela 4 e figura 2). Como consequência, átrios direitos isolados de ratas submetidas a choques nas patas e sacrificadas no diestro, apresentaram subsensibilidade aos efeitos cronotrópicos da adrenalina, quando comparados com seus respectivos controles ( $p < 0,05$  ; tabela 4 e figura 1). Em átrios direitos isolados de ratas submetidas ao mesmo protocolo de estresse e sacrificadas no estro, não foram observadas alterações de sensibilidade do tecido atrial aos efeitos cronotrópicos da adrenalina (tabela 4 e figura 2).

Após a realização do tratamento farmacológico, que incluiu desnervação adrenérgica, bloqueio dos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos e muscarínicos, bem como, inibição dos sistemas de recaptção neuronal e captação extraneuronal, observa-se um desvio à esquerda das curvas concentração/efeito à adrenalina em átrios direitos de ratas controles sacrificadas no estro (tabela 4 e figura 4), enquanto que, para os animais controles sacrificados no diestro, o desvio para a esquerda da curva concentração/efeito não foi estatisticamente significativo ( $F = 2,51$  ;  $p > 0,05$  ; tabela 4 e figura 3), uma vez que, nesta fase do ciclo estral, as curvas concentração/efeito já estavam desviadas à esquerda, por influência do ciclo.

Já em átrios direitos de ratas submetidas ao estresse, o pré-tratamento resultou em desvio à esquerda das curvas concentração/efeito à

adrenalina em ambos os grupos: diestro e estro (tabela 4 ; figuras 3 e 4), o que cancelou a subsensibilidade, anteriormente observada, em átrios direitos isolados de ratas sacrificadas no diestro.

A adição de butoxamina não produziu alterações significativas de sensibilidade do tecido atrial nos animais dos grupos controles (tabela 4 ; figuras 5 e 6). Induziu, entretanto, um desvio à direita da curva concentração/efeito à adrenalina em átrios direitos de ratas submetidas a estresse e sacrificadas em qualquer das fases do ciclo, quando comparadas aos seus respectivos controles.

Como consequência, a subsensibilidade ao efeito cronotrópico da adrenalina, observada em ratas sacrificadas no diestro, mas que havia sido cancelada pelo tratamento farmacológico "*in vitro*", tornou-se novamente evidente (tabela 4 ; figura 5). Essa subsensibilidade foi caracterizada por um desvio à direita da curva concentração/efeito de 2,3 vezes a nível da  $EC_{50}$  ( $p < 0,05$ ).

O desvio à direita da curva concentração/efeito de 2,6 vezes em ratas submetidas a estresse e sacrificadas no estro, induzido pela adição de butoxamina, produziu também subsensibilidade do tecido atrial desses animais aos efeitos cronotrópicos da adrenalina, em relação ao grupo controle (tabela 4 e figura 6).

Tabela 3 - Valores de resposta máxima<sup>a</sup> à adrenalina de átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas e sacrificadas no **diestro** ou no **estro**.

<b>Grupos</b>	<b>Sem Pré- Tratamento</b>	<b>Com Pré- Tratamento</b>	<b>Pré-Tratamento + Butoxamina</b>
<b>DIESTRO</b>			
<b>Controle</b>	142 ± 09 (06) <sup>b</sup>	147 ± 18 (06)	129 ± 11 (07)
<b>Experimental</b>	200 ± 07* (11)	132 ± 15 <sup>c</sup> (06)	127 ± 10 <sup>c</sup> (06)
<b>ESTRO</b>			
<b>Controle</b>	165 ± 10 (10)	144 ± 17 (07)	182 ± 13 (06)
<b>Experimental</b>	215 ± 22* (06)	138 ± 16 <sup>c</sup> (06)	150 ± 19 (06)

<sup>a</sup>Valores médios (acompanhados dos respectivos erros padrões das médias) em bpm. <sup>b</sup>Os números colocados entre parênteses, imediatamente abaixo de cada valor médio, representam o número de experimentos daquele grupo. <sup>c</sup>Diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo sem pré-tratamento ( $p < 0,05$  ; teste de Scheffé). \*Diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo controle ( $p < 0,05$  ; teste t de Student).

Tabela 4 - Valores  $pD_2^a$  da adrenalina em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas e sacrificadas no **diestro** ou no **estro**.

<b>Grupos</b>	<b>Sem Pré- Tratamento</b>	<b>Com Pré- Tratamento</b>	<b>Pré-Tratamento + Butoxamina</b>
<b>DIESTRO</b>			
<b>Controle</b>	7,38 ± 0,09 (06) <sup>b</sup>	7,67 ± 0,13 (06)	7,51 ± 0,05 (07)
<b>Experimental</b>	6,63 ± 0,08* (11)	7,49 ± 0,18 <sup>c</sup> (06)	7,15 ± 0,13 <sup>c,*</sup> (06)
<b>ESTRO</b>			
<b>Controle</b>	7,01 ± 0,10 <sup>d</sup> (10)	7,58 ± 0,16 <sup>c</sup> (07)	7,59 ± 0,05 <sup>c</sup> (06)
<b>Experimental</b>	6,87 ± 0,13 (06)	7,42 ± 0,15 <sup>c</sup> (06)	7,17 ± 0,07* (06)

<sup>a</sup>Valores médios (acompanhados dos respectivos erros padrões das médias) dos logaritmos negativos da concentração molar do agonista que produz uma resposta igual a 50% da resposta máxima. <sup>b</sup>Os números colocados entre parênteses, imediatamente abaixo de cada valor médio, representam o número de experimentos daquele grupo. <sup>c</sup>Diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo sem pré-tratamento ( $p < 0,05$  ; teste de Scheffé). <sup>d</sup>Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle em diestro sem pré-tratamento ( $p < 0,05$  ; teste t de Student). \*Diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo controle ( $p < 0,05$  ; teste t de Student).

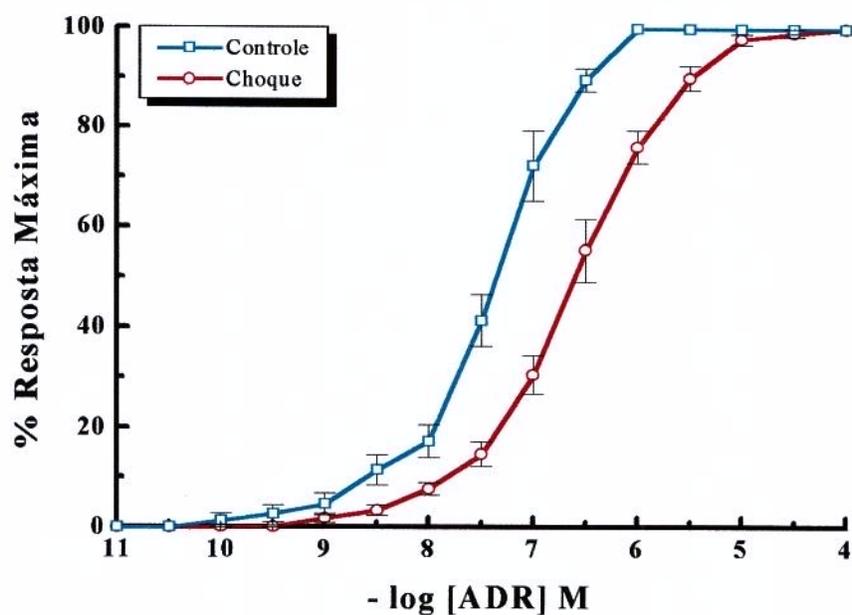


Figura 1 - Curva concentração/efeito da adrenalina, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no estro e sacrifício em **diestro**.

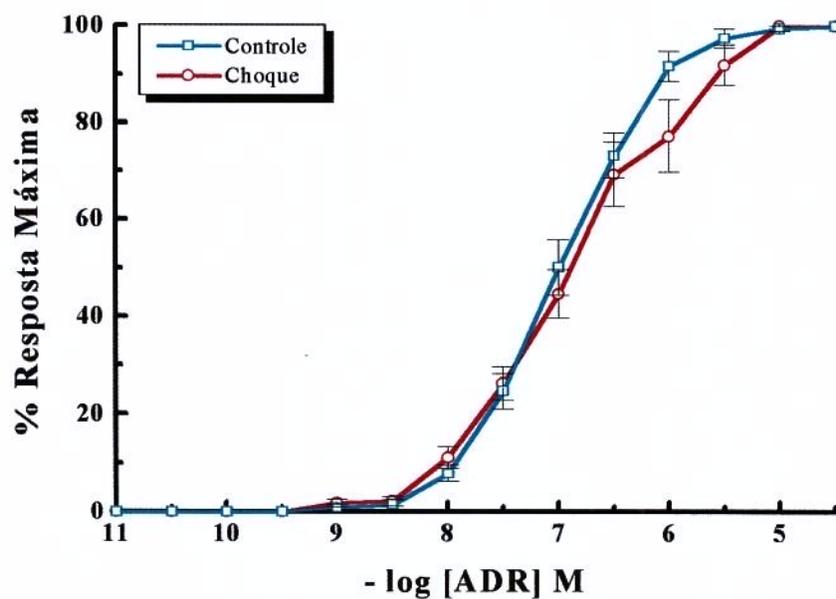


Figura 2 - Curva concentração/efeito da adrenalina, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no diestro e sacrifício em **estro**.

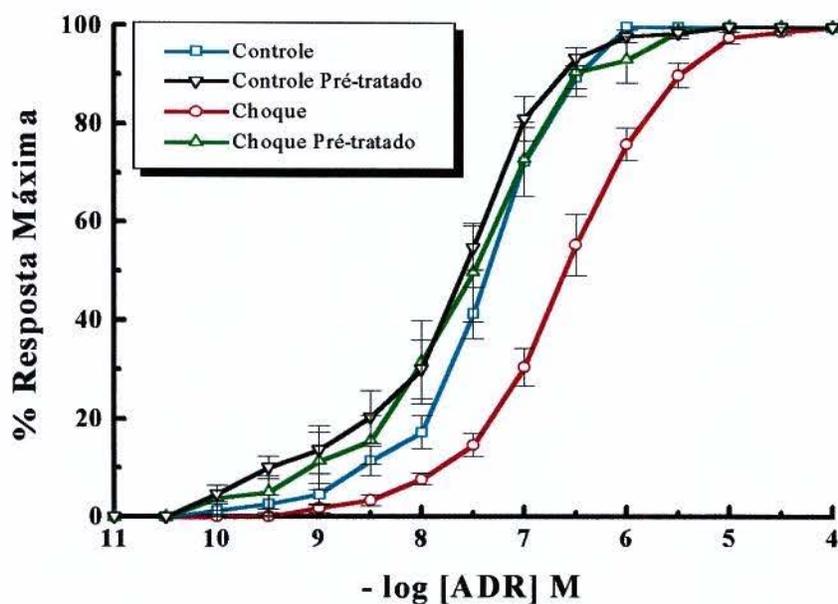


Figura 3 - Curva concentração/efeito da adrenalina, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no estro e sacrifício em **diestro**, antes e após tratamento farmacológico "*in vitro*".

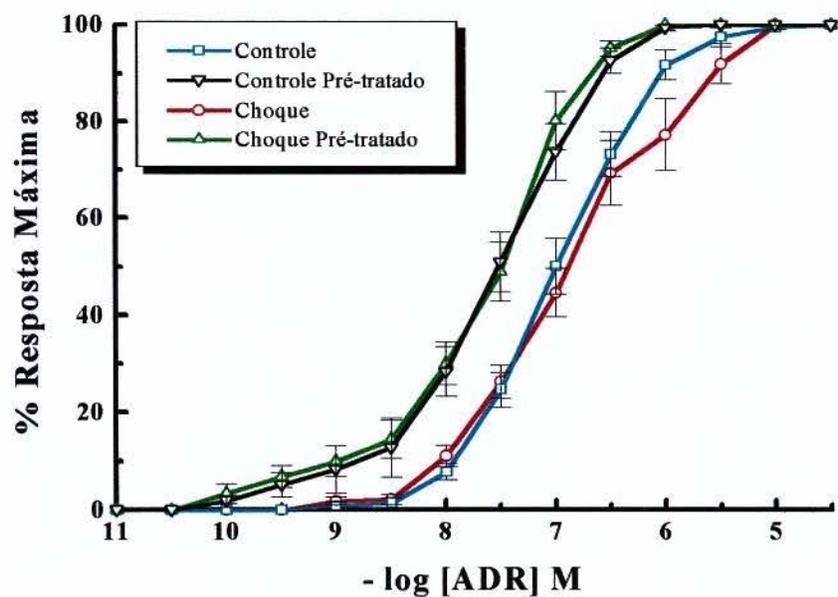


Figura 4 - Curva concentração/efeito da adrenalina, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no diestro e sacrifício em **estro**, antes e após tratamento farmacológico "*in vitro*".

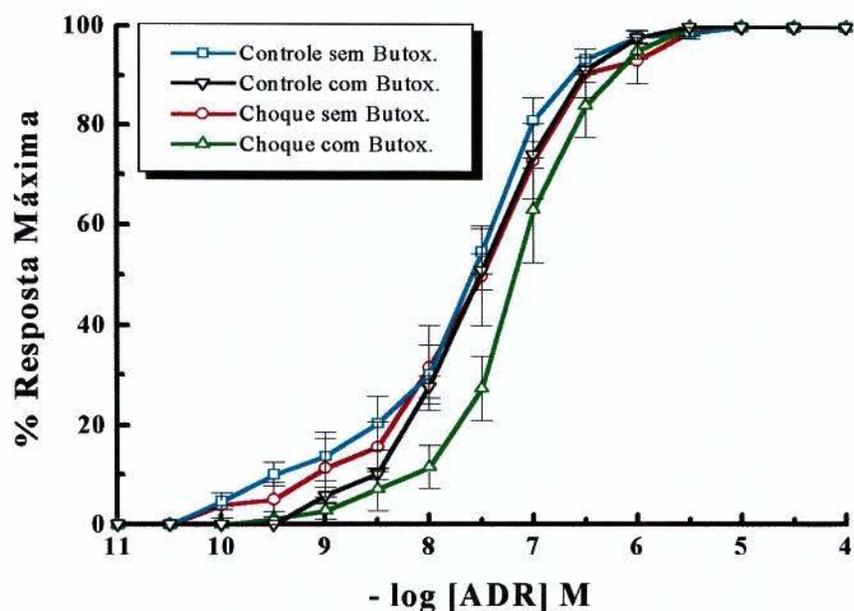


Figura 5 - Curva concentração/efeito da adrenalina, em átrios direitos isolados e pré-tratados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no estro e sacrifício em **diestro**, antes e após a adição de butoxamina.

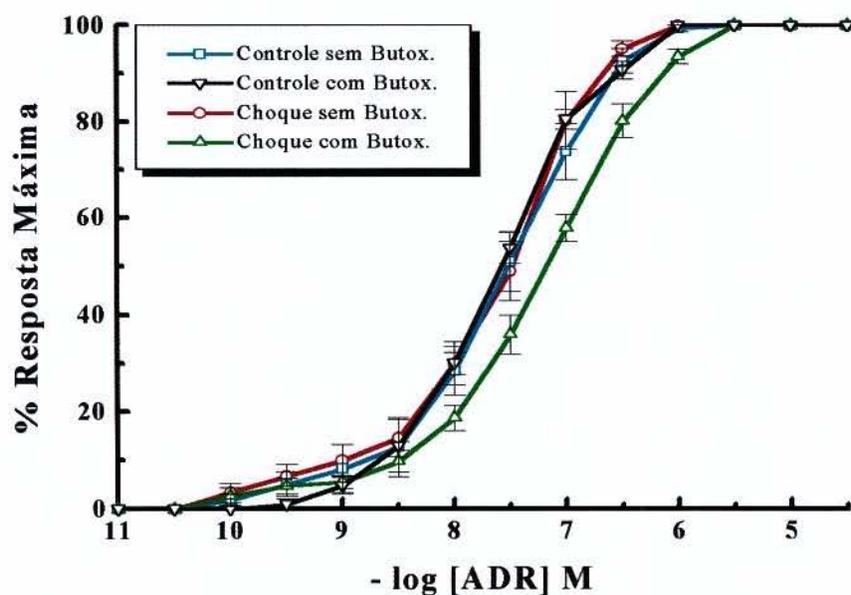


Figura 6 - Curva concentração/efeito da adrenalina, em átrios direitos isolados e pré-tratados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no diestro e sacrifício em **estro**, antes e após a adição de butoxamina.

### *4.3. Sensibilidade à Noradrenalina.*

As respostas máximas à noradrenalina, de átrios direitos isolados de ratas submetidas a estresse por choques nas patas e sacrificadas no diestro ou estro, não apresentaram alterações significativas em nenhum dos grupos experimentais, quando comparados com seus respectivos grupos controles, como pode ser visualizado na tabela 5.

Os valores  $pD_2$  da noradrenalina dos grupos experimentais e controles podem ser visualizados na tabela 6.

Diferentemente do que ocorreu para a adrenalina, a sensibilidade à noradrenalina não varia com as fases do ciclo estral em ratas controles ( $p > 0,05$  ; teste t de Student). Entretanto, após estresse, átrios direitos de ratas sacrificadas no diestro são subsensíveis também à noradrenalina, com um desvio da curva concentração/efeito para a direita, de 5,3 vezes ao nível da  $EC_{50}$  ( $p < 0,05$  ; tabela 6 e figura 7). Contudo, em ratas sacrificadas no estro, cuja primeira sessão de choques nas patas foi aplicada no diestro, os átrios direitos isolados não apresentaram alterações de sensibilidade quando comparados com os respectivos controles ( $p > 0,05$  ; tabela 6 e figura 8).

Para avaliar a participação do processo de recaptação neuronal nas alterações de sensibilidade que foram observadas, curvas concentração/efeito para a noradrenalina foram obtidas após desnervação adrenérgica e inibição do sistema de recaptação neuronal. Quando esse procedimento foi adotado, ocorreram desvios para a esquerda das curvas concentração/efeito em átrios direitos de ratas estressadas, que foram independentes da fase do ciclo em que o animal foi sacrificado (tabela 6 ; figuras 9 e 10). Com esse desvio, a subsensibilidade observada para a noradrenalina, em átrios direitos de ratas submetidas a choques nas patas e sacrificadas no diestro, foi cancelada (tabela 6 e figura 9).

Nos animais dos grupos controles, esse desvio somente foi significativo quando as ratas foram sacrificadas no estro (tabela 6 ; figuras 9 e 10).

A realização do tratamento farmacológico completo, que incluiu, além da desnervação adrenérgica e inibição do processo de recaptação neuronal, bloqueio dos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos e muscarínicos e, inibição do sistema de captação extraneuronal, evidenciou novamente a subsensibilidade à noradrenalina do tecido atrial de ratas submetidas a choques nas patas e sacrificadas durante o diestro (desvio à direita de 2,6 vezes ;  $p < 0,05$  ; tabela 6 e figura 11). Os átrios direitos de animais sacrificados no estro, cuja primeira sessão de choques nas patas ocorreu no diestro, não apresentaram alterações de sensibilidade, comparados com seus respectivos controles ( $p > 0,05$  ; tabela 6 e figura 12).

A presença de butoxamina no líquido de incubação produziu respostas similares às observadas com o tratamento farmacológico completo (tabela 6 ; figuras 13 e 14).

Assim sendo, o conjunto destes dados demonstra que átrios direitos de ratas submetidas a estresse e sacrificadas durante o diestro apresentam subsensibilidade à adrenalina e à noradrenalina. O comportamento dos tecidos frente aos diferentes tratamentos farmacológicos utilizados indica, também, que esta subsensibilidade poderia ser devida a um aumento da eficiência do processo de recaptação neuronal, a uma dessensibilização da resposta mediada por adrenoceptores  $\beta_1$  e a um aumento da participação de adrenoceptores  $\beta_2$ .

Nos animais estressados e sacrificados durante o estro, apenas a participação dos adrenoceptores  $\beta_2$  parece ter sido desencadeada pela aplicação do estresse.

Tabela 5 - Valores de resposta máxima<sup>a</sup> à noradrenalina de átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas e sacrificadas no **diestro** ou no **estro**.

<b>Grupos</b>	<b>Sem Pré- Tratamento</b>	<b>6OHDA + Desipramina</b>	<b>Com Pré- Tratamento</b>	<b>Pré-Tratamento + Butoxamina</b>
<b>DIESTRO</b>				
<b>Controle</b>	152 ± 13 (06) <sup>b</sup>	123 ± 15 (07)	143 ± 10 (08)	154 ± 14 (07)
<b>Experimental</b>	184 ± 09 (09)	166 ± 13 (07)	147 ± 18 (06)	164 ± 10 (07)
<b>ESTRO</b>				
<b>Controle</b>	181 ± 06 (07)	152 ± 13 (09)	148 ± 10 (06)	156 ± 11 (09)
<b>Experimental</b>	206 ± 21 (05)	138 ± 27 (05)	141 ± 19 (06)	198 ± 24 (05)

<sup>a</sup>Valores médios (acompanhados dos respectivos erros padrões das médias) em bpm. <sup>b</sup>Os números colocados entre parênteses, imediatamente abaixo de cada valor médio, representam o número de experimentos daquele grupo.

Tabela 6 - Valores  $pD_2^a$  da noradrenalina de átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas e sacrificadas no **diestro** ou no **estro**.

<b>Grupos</b>	<b>Sem Pré- Tratamento</b>	<b>6OHDA + Desipramina</b>	<b>Com Pré- Tratamento</b>	<b>Pré-Tratamento + Butoxamina</b>
<b>DIESTRO</b>				
<b>Controle</b>	7,67 ± 0,11 (06) <sup>b</sup>	7,88 ± 0,06 (07)	8,10 ± 0,11 <sup>c</sup> (08)	7,77 ± 0,03 (07)
<b>Experimental</b>	6,95 ± 0,13* (09)	7,73 ± 0,08 <sup>c</sup> (07)	7,68 ± 0,14 <sup>c,*</sup> (06)	7,53 ± 0,09 <sup>c,*</sup> (07)
<b>ESTRO</b>				
<b>Controle</b>	7,37 ± 0,16 (07)	8,02 ± 0,08 <sup>c</sup> (09)	7,91 ± 0,10 <sup>c</sup> (06)	7,81 ± 0,05 <sup>c</sup> (09)
<b>Experimental</b>	7,02 ± 0,16 (05)	7,95 ± 0,12 <sup>c</sup> (05)	7,94 ± 0,11 <sup>c</sup> (06)	7,79 ± 0,08 <sup>c</sup> (05)

<sup>a</sup>Valores médios (acompanhados dos respectivos erros padrões das médias) dos logaritmos negativos da concentração do agonista que produz uma resposta igual a 50% da resposta máxima. <sup>b</sup>Os números colocados entre parênteses, imediatamente abaixo de cada valor médio, representam o número de experimentos daquele grupo. <sup>c</sup>Diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo sem pré-tratamento (  $p < 0,05$  ; teste de Scheffé). \*Diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo controle (  $p < 0,05$  ; teste t de Student).

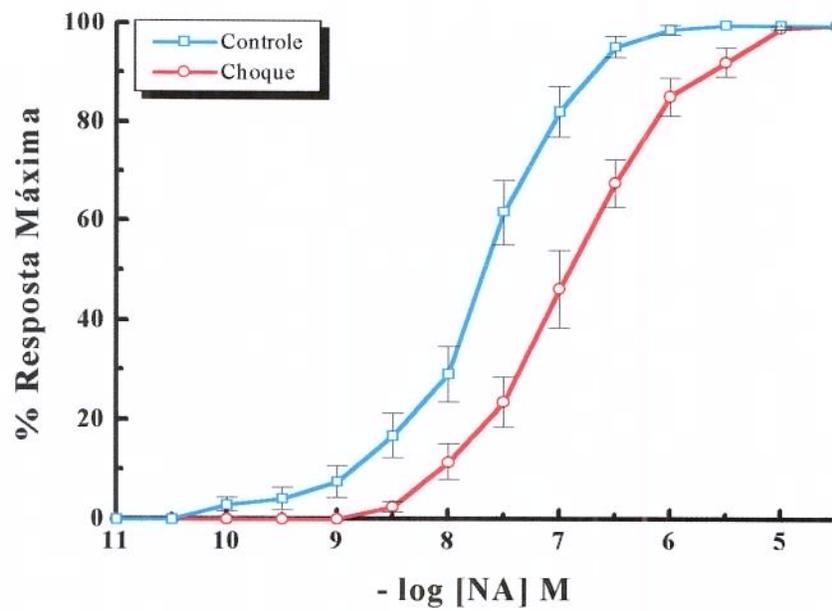


Figura 7 - Curva concentração/efeito da noradrenalina, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no estro e sacrifício em **diestro**.

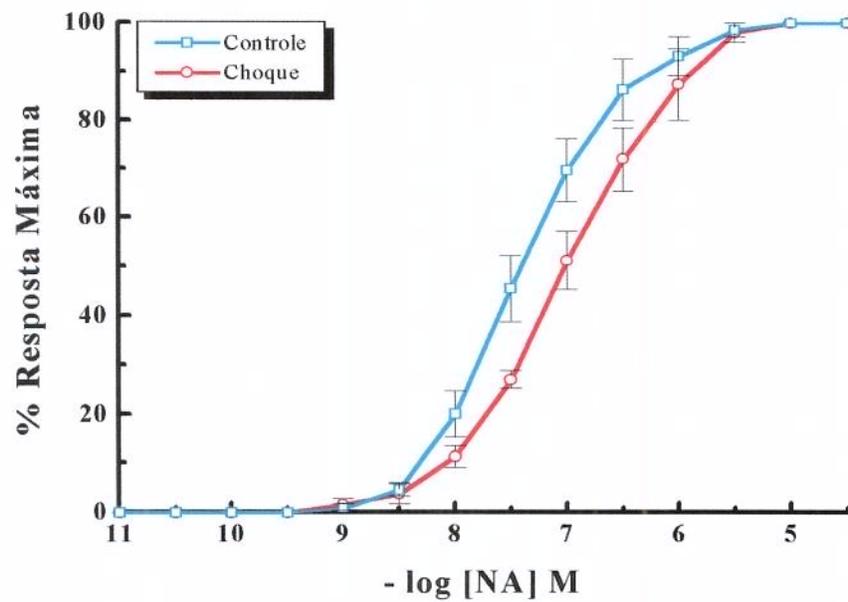


Figura 8 - Curva concentração/efeito da noradrenalina, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no diestro e sacrifício em **estro**.

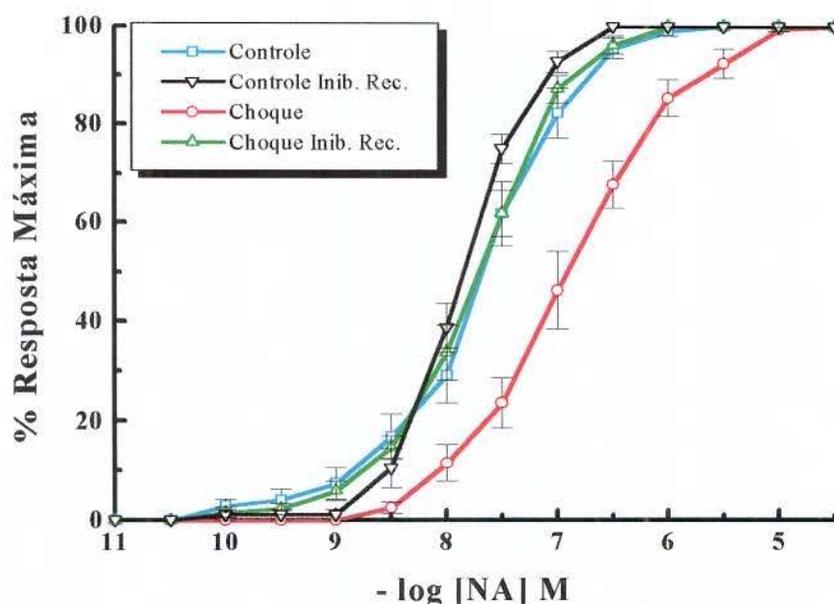


Figura 9 - Curva concentração/efeito da noradrenalina, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no estro e sacrifício em **diestro**, antes e após desnervação adrenérgica e inibição do sistema de recaptação neuronal.

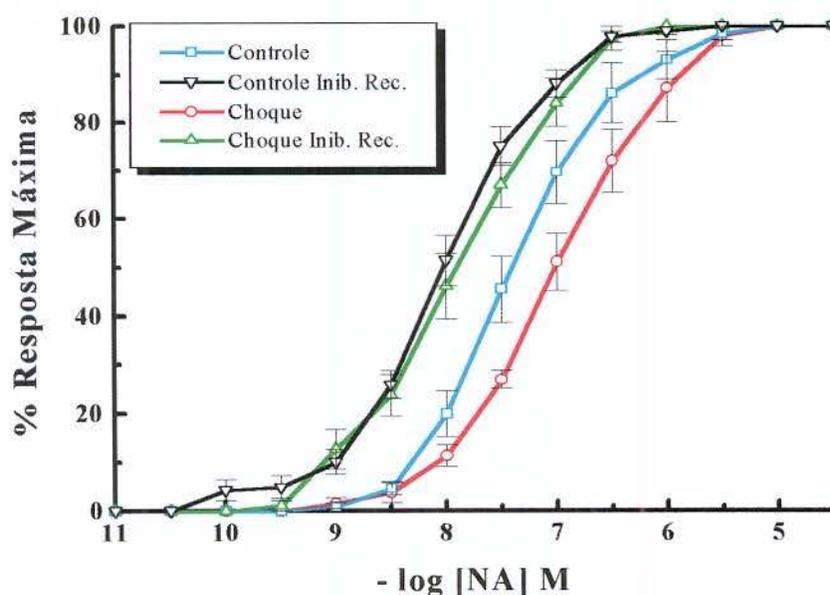


Figura 10 - Curva concentração/efeito da noradrenalina, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no diestro e sacrifício em **estro**, antes e após desnervação adrenérgica e inibição do sistema de recaptação neuronal.

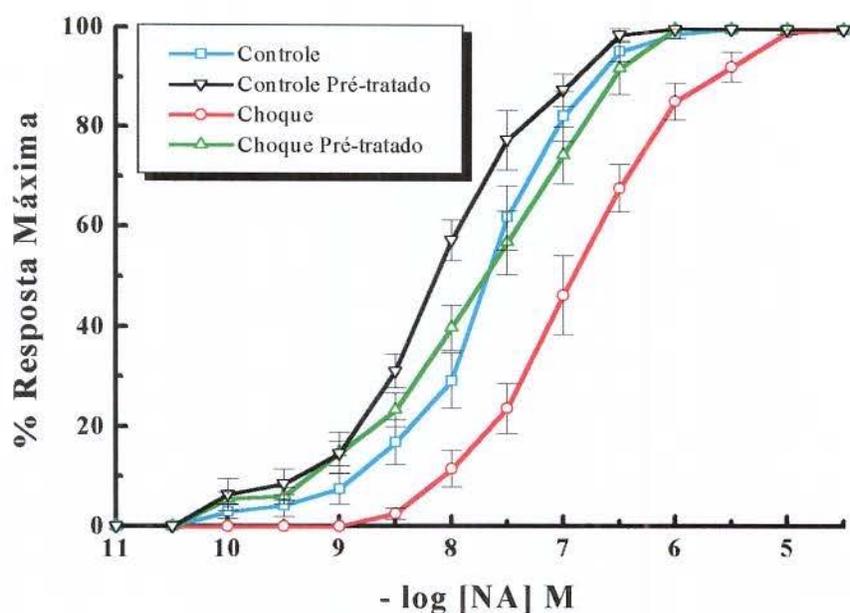


Figura 11 - Curva concentração/efeito da noradrenalina, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no estro e sacrifício em **diestro**, antes e após tratamento farmacológico "in vitro".

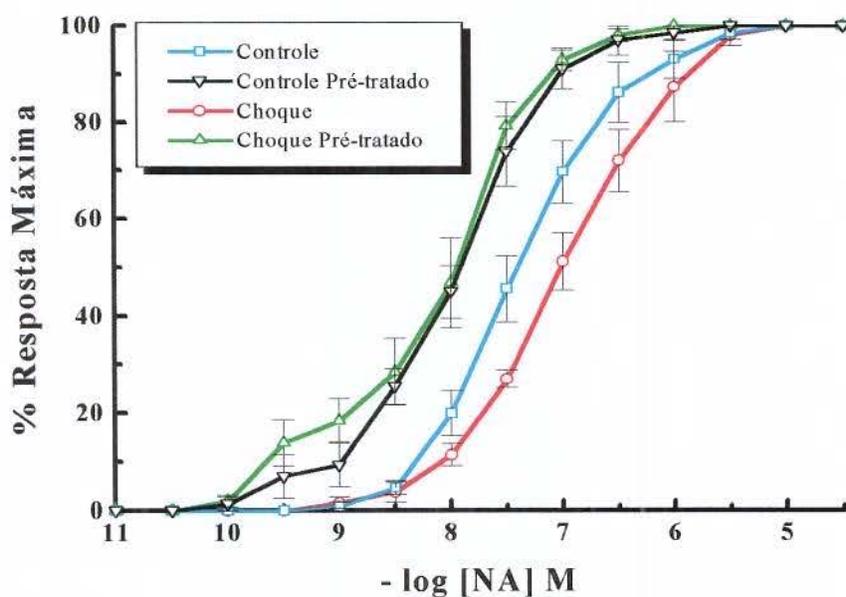


Figura 12 - Curva concentração/efeito da noradrenalina, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no diestro e sacrifício em **estro**, antes e após tratamento farmacológico "in vitro".

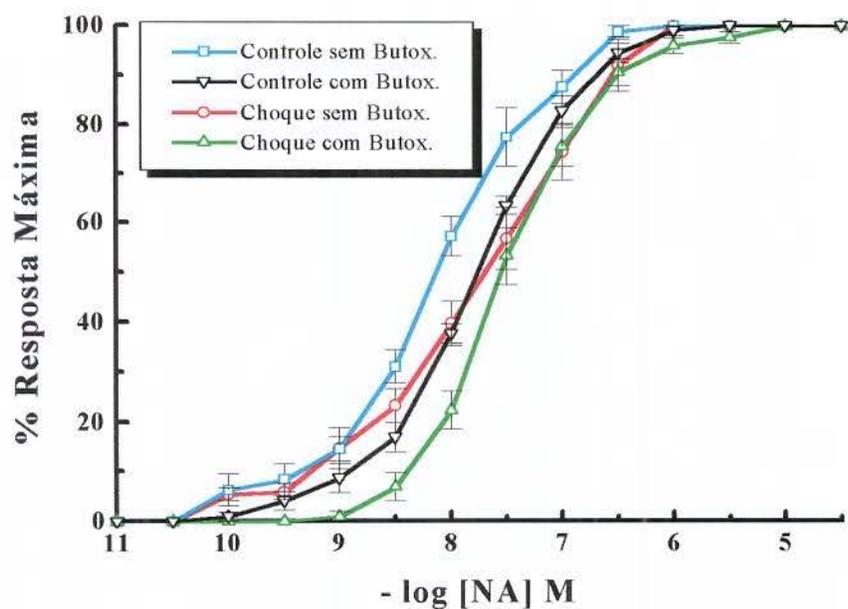


Figura 13 - Curva concentração/efeito da noradrenalina, em átrios direitos isolados e pré-tratados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no estro e sacrifício em **diestro**, antes e após a adição de butoxamina.

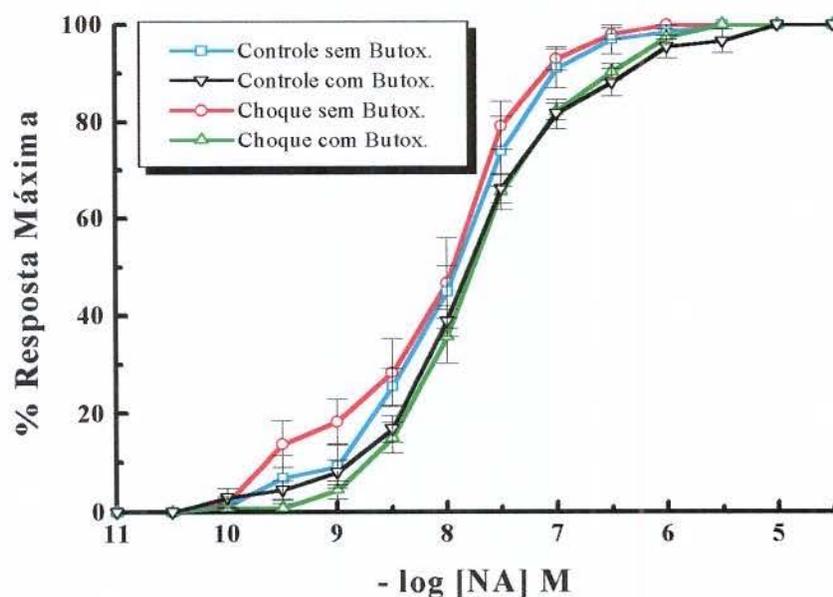


Figura 14 - Curva concentração/efeito da noradrenalina, em átrios direitos isolados e pré-tratados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no diestro e sacrifício em **estro**, antes e após a adição de butoxamina.

#### *4.4. Sensibilidade ao Soterenol.*

A tabela 7 mostra os valores de frequência inicial de batimentos espontâneos,  $pD_2$  e resposta máxima ao agonista parcial soterenol, em átrios direitos de ratas controles ou estressadas sacrificadas no diestro ou no estro. As curvas concentração/efeito podem ser observadas nas figuras 15 e 16, respectivamente.

Átrios direitos isolados de ratas estressadas e sacrificadas no diestro, apresentaram subsensibilidade aos efeitos cronotrópicos do soterenol, caracterizada por um desvio, à direita da curva concentração/efeito, de 2,8 vezes ao nível da  $EC_{50}$  ( $p < 0,05$ ), sem alterações da frequência de batimentos espontâneos ou da resposta máxima.

Em átrios direitos isolados de ratas, submetidas a choques nas patas e sacrificadas no estro, não observamos diferenças significativas na frequência de batimentos espontâneos, resposta máxima ou sensibilidade do tecido atrial, quando comparados com os respectivos controles.

Tabela 7 - Valores de frequência inicial (FI), pD<sub>2</sub> e resposta máxima (RM) ao soterenol em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas e sacrificadas no **diestro** ou no **estro**.

<b>Grupos</b>	<b>Fi<sup>a</sup></b>	<b>pD<sub>2</sub><sup>b</sup></b>	<b>RM<sup>a</sup></b>
<b>DIESTRO</b>			
<b>Controle</b>	266 ± 08 (07) <sup>c</sup>	6,80 ± 0,13 (07)	153 ± 11 (07)
<b>Experimental</b>	252 ± 08 (06)	6,36 ± 0,07* (06)	150 ± 09 (06)
<b>ESTRO</b>			
<b>Controle</b>	257 ± 13 (06)	6,58 ± 0,09 (06)	165 ± 08 (06)
<b>Experimental</b>	262 ± 03 (06)	6,35 ± 0,10 (06)	163 ± 11 (06)

<sup>a</sup>Valores médios (acompanhados dos respectivos erros padrões das médias) em bpm.

<sup>b</sup>Valores médios (acompanhados dos respectivos erros padrões das médias) dos logaritmos negativos da concentração molar do agonista que produz uma resposta igual a 50% da resposta máxima. <sup>c</sup>Os números colocados entre parênteses, imediatamente abaixo de cada valor médio, representam o número de experimentos daquele grupo. \*Diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo controle (p < 0,05 ; teste t de Student).

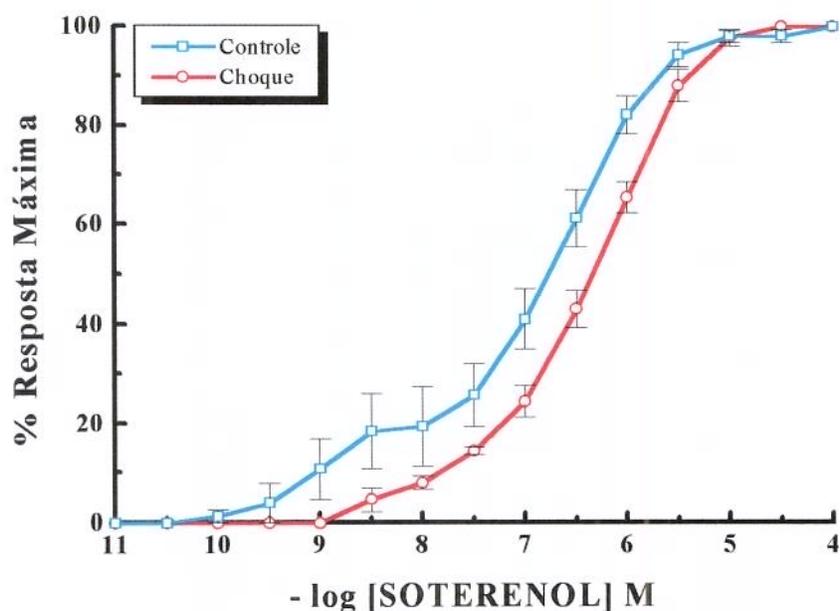


Figura 15 - Curva concentração/efeito do soterenol, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no estro e sacrifício em **diestro**.

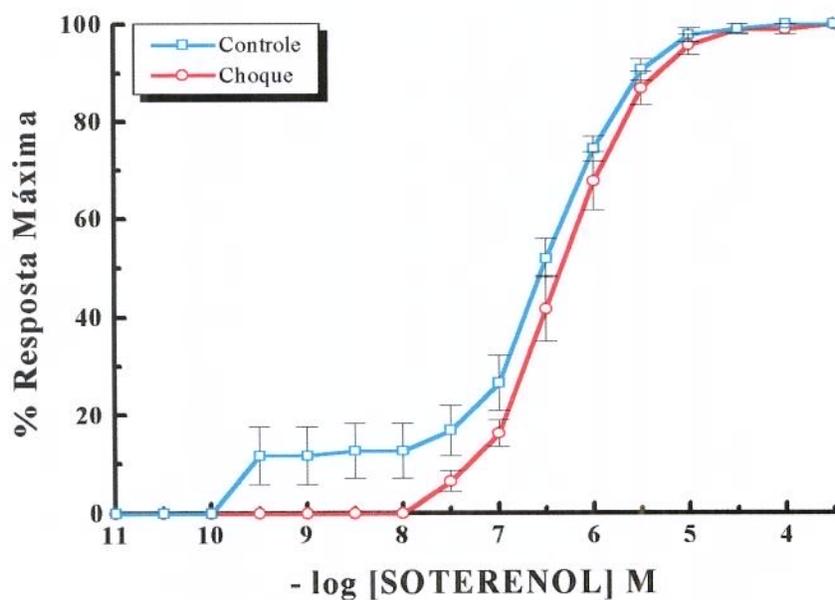


Figura 16 - Curva concentração/efeito do soterenol, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, com início no diestro e sacrifício em **estro**.

#### *4.5. Constante de Dissociação do Metoprolol.*

Para avaliar a constante de dissociação do metoprolol, tendo como agonista a adrenalina, curvas concentração/efeito foram obtidas na presença de diversas concentrações de metoprolol em átrios direitos isolados de ratas controles e submetidas a choques nas patas, sacrificadas no diestro (figuras 17 e 19) ou no estro (figuras 21 e 23). A partir dos resultados obtidos, foram confeccionados os gráficos de Schild, que podem ser visualizados nas figuras 18, 22 (ratas controles), 20 e 24 (ratas submetidas a choques nas patas).

O antagonismo do efeito cronotrópico da noradrenalina pelo metoprolol também foi obtido em átrios direitos de ratas controles e estressadas sacrificadas no diestro (figuras 25 e 27) ou no estro (figuras 29 e 31). Os respectivos gráficos de Schild podem ser visualizados nas figuras 26, 28, 30 e 32.

Em todos os grupos o antagonismo pode ser caracterizado como competitivo, dose-dependente e os coeficientes angulares das retas de regressão de Schild não diferiram estatisticamente da unidade. Satisfeita essa premissa metodológica, foi possível calcular o valor  $pA_2$ , que é uma medida da afinidade do antagonista pela população de adrenoceptores (tabela 8).

Em átrios direitos de ratas controles sacrificadas em estro ou diestro, o valor  $pA_2$  do metoprolol foi independente do agonista, o que indicaria que a população de adrenoceptores é homogênea  $\beta_1$ , em ambas as fases.

Em ratas submetidas a choques nas patas e sacrificadas no diestro, ocorreu uma redução estatisticamente significativa (2,5 vezes) no valor  $pA_2$  do metoprolol, quando a adrenalina foi utilizada como agonista. Quando a noradrenalina foi usada como agonista, o valor  $pA_2$  do metoprolol não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo controle. Desta forma, após o estresse, o valor  $pA_2$  do metoprolol passou a variar de acordo com o agonista utilizado. Considerando que a adrenalina é um agonista  $\beta$  não seletivo, enquanto que a noradrenalina é seletiva  $\beta_1$ , estes dados indicariam que a população de adrenoceptores, nesta condição, poderia ser heterogênea  $\beta_1/\beta_2$ .

Em átrios direitos de ratas estressadas e sacrificadas no estro, o valor  $pA_2$  para o metoprolol não foi dependente do agonista e não diferiu daquele obtido em átrios direitos de ratas controles sacrificadas na mesma fase do ciclo.

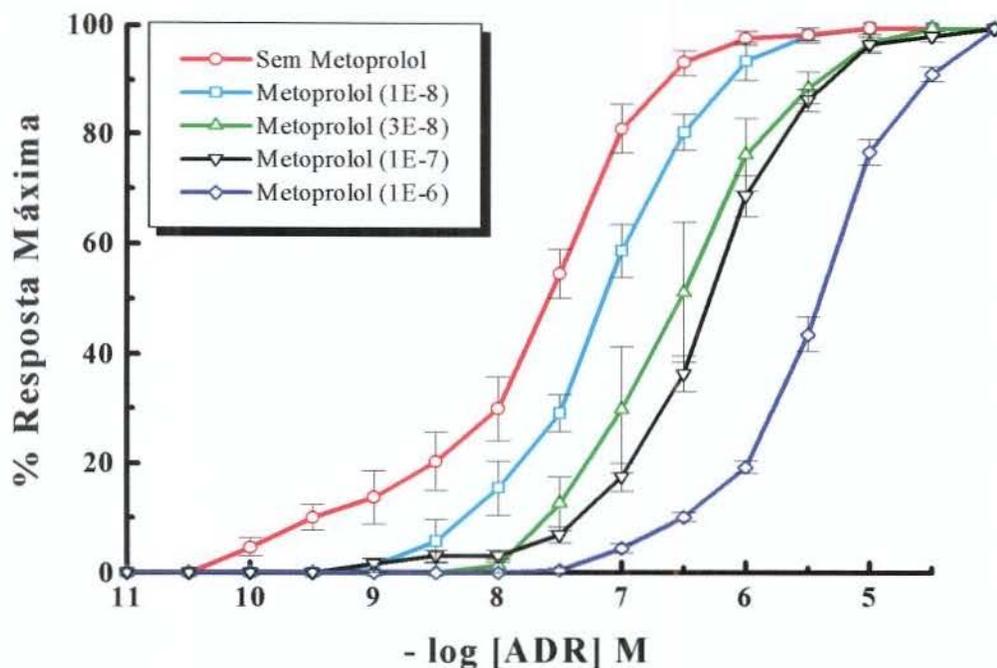


Figura 17 - Curva concentração/efeito da adrenalina, na presença de quatro concentrações diferentes de metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas controles sacrificadas no **diestro**.

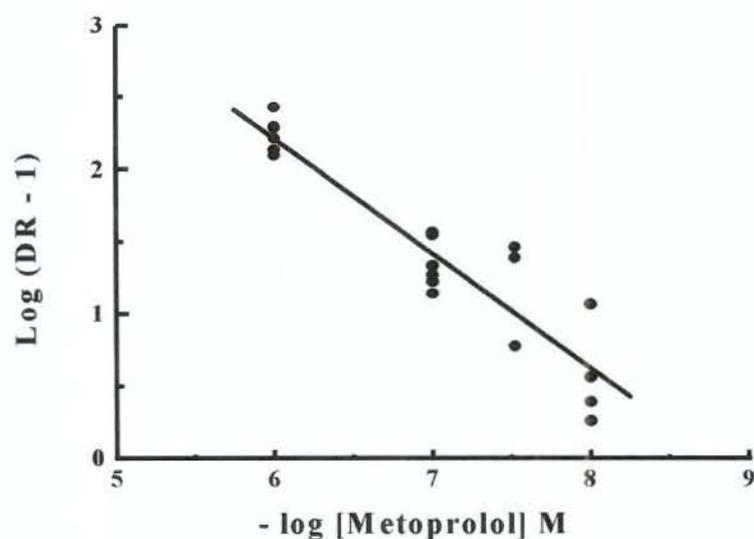


Figura 18 - Gráfico de Schild, para o antagonismo do efeito cronotrópico da adrenalina pelo metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas controles sacrificadas no **diestro**.

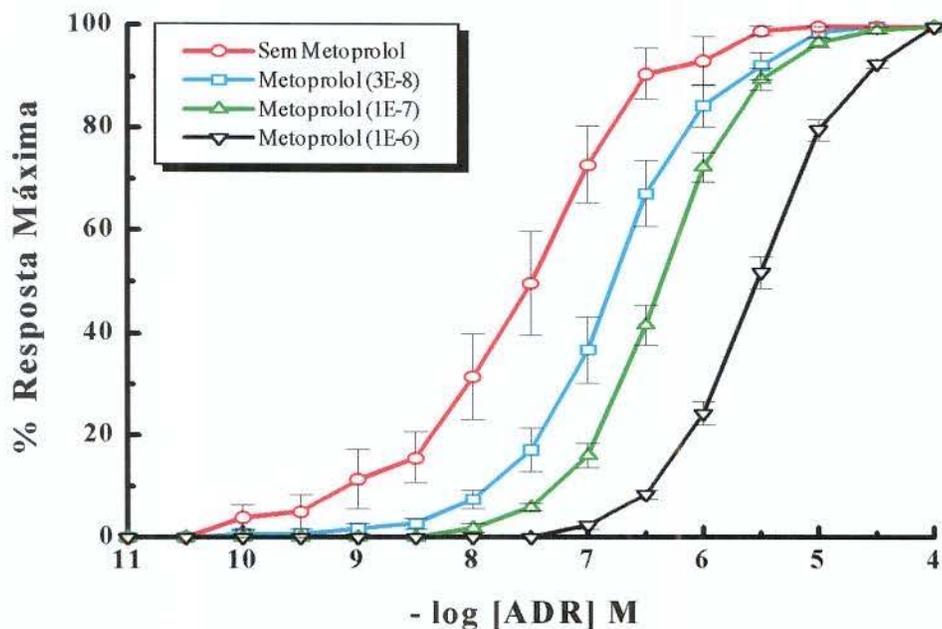


Figura 19 - Curva concentração/efeito da adrenalina, na presença de três concentrações diferentes de metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a choques nas patas, com início no estro e sacrifício em **diestro**.

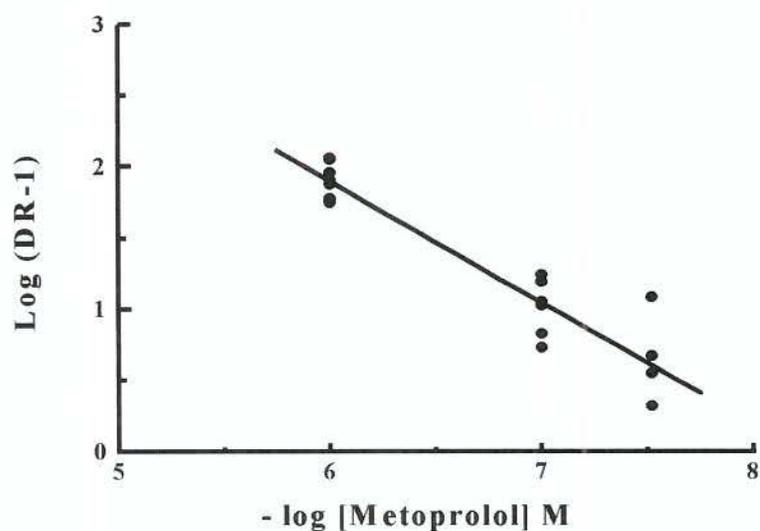


Figura 20 - Gráfico de Schild, para o antagonismo do efeito cronotrópico da adrenalina pelo metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a choques nas patas, com início no estro e sacrifício em **diestro**.

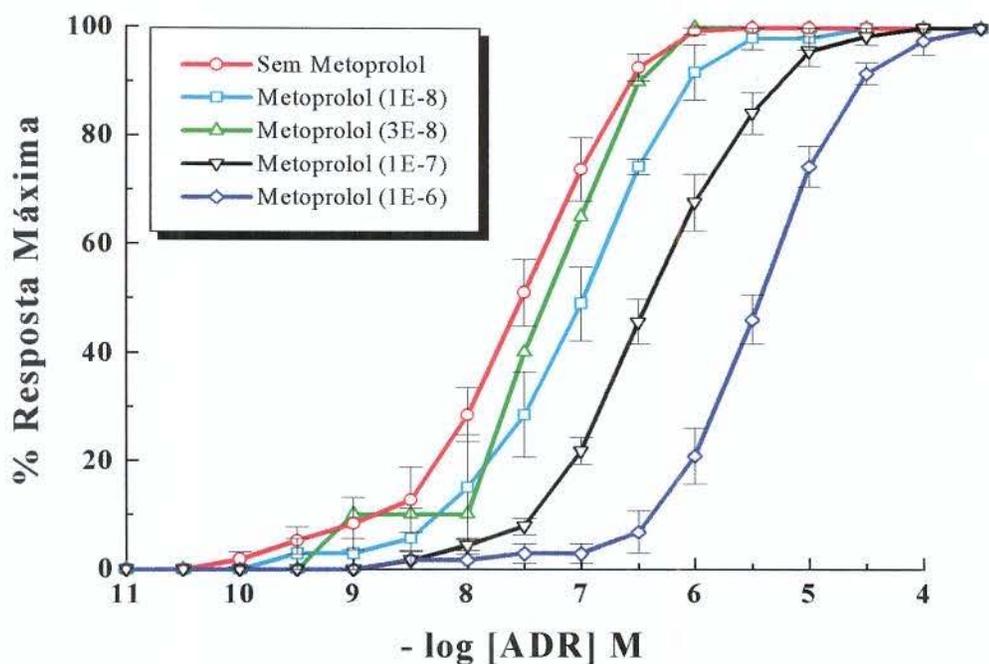


Figura 21 - Curva concentração/efeito da adrenalina, na presença de quatro concentrações diferentes de metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas controles sacrificadas no **estro**.

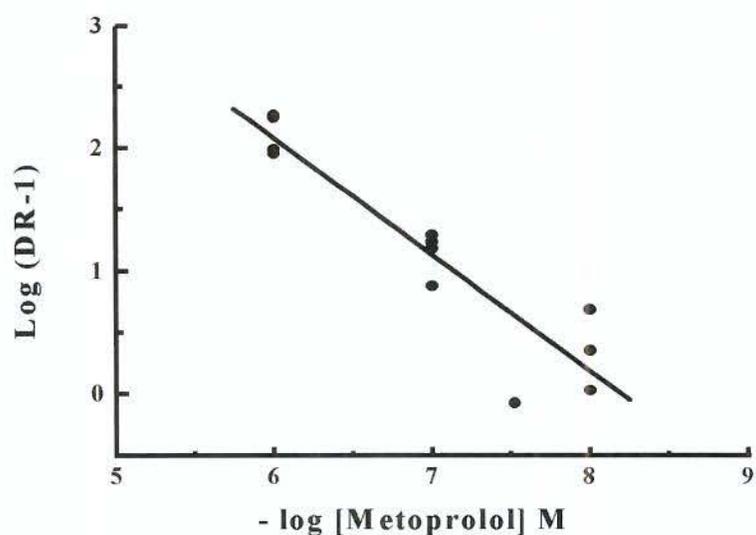


Figura 22 - Gráfico de Schild, para o antagonismo do efeito cronotrópico da adrenalina pelo metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas controles sacrificadas no **estro**.

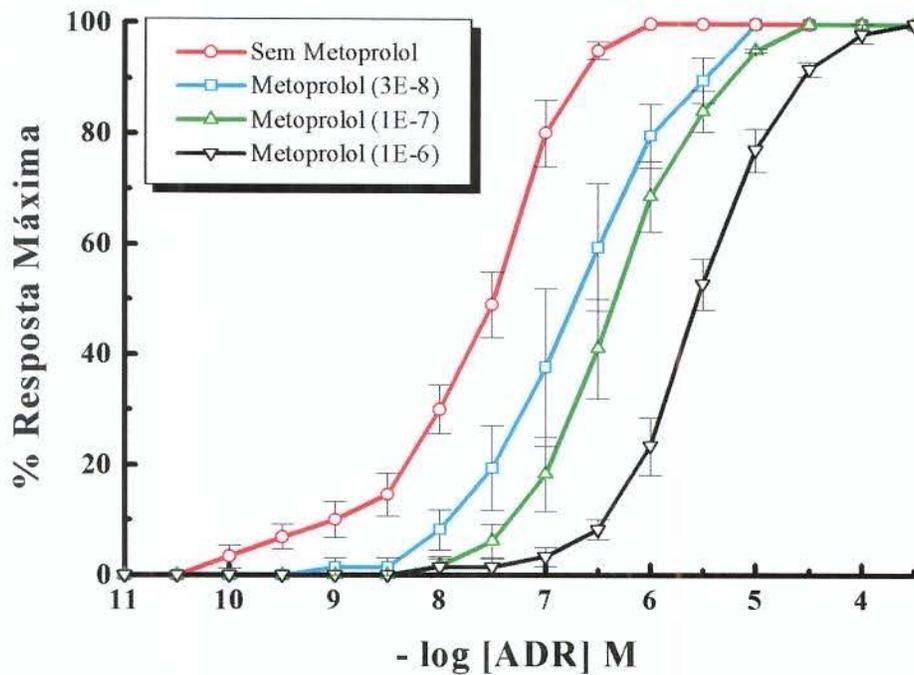


Figura 23 - Curva concentração/efeito da adrenalina, na presença de três concentrações diferentes de metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a choques nas patas, com início no diestro e sacrifício em **estro**.

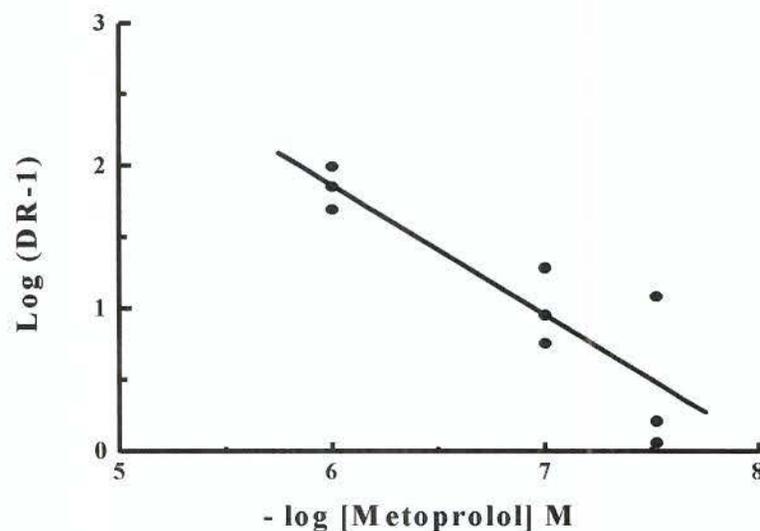


Figura 24 - Gráfico de Schild, para o antagonismo do efeito cronotrópico da adrenalina pelo metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a choques nas patas, com início no diestro e sacrifício em **estro**.

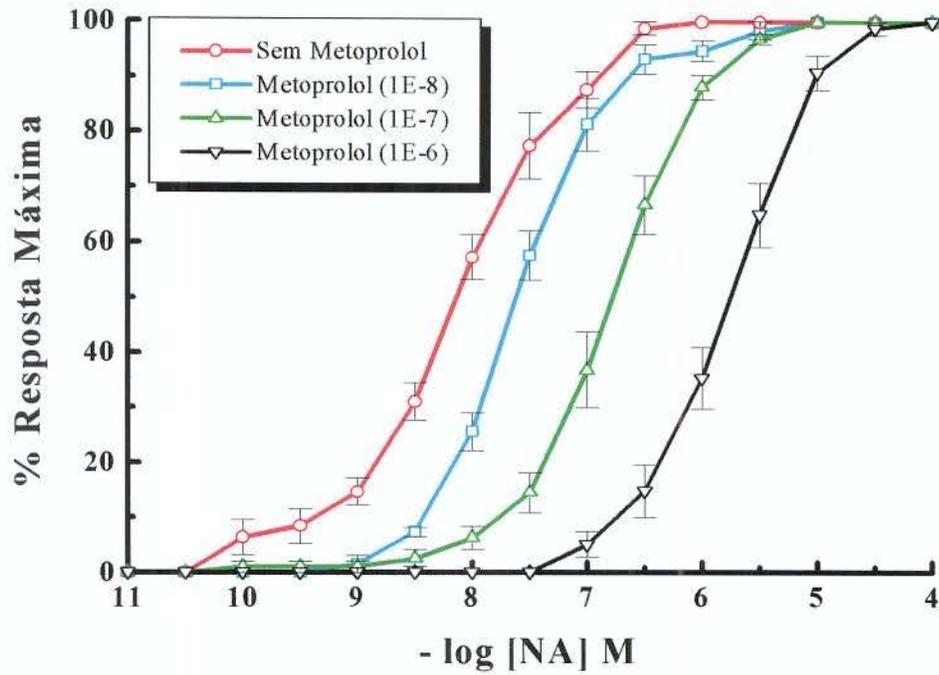


Figura 25 - Curva concentração/efeito da noradrenalina, na presença de três concentrações diferentes de metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas controles sacrificadas no **diestro**.

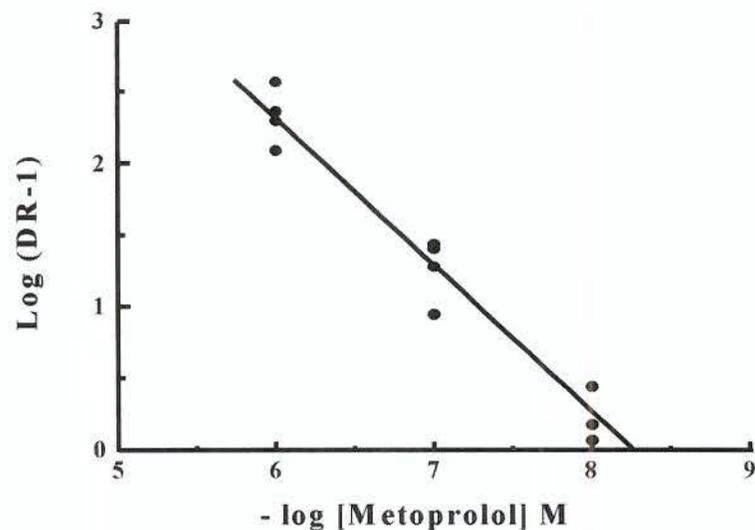


Figura 26 - Gráfico de Schild, para o antagonismo do efeito cronotrópico da noradrenalina pelo metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas controles sacrificadas no **diestro**.

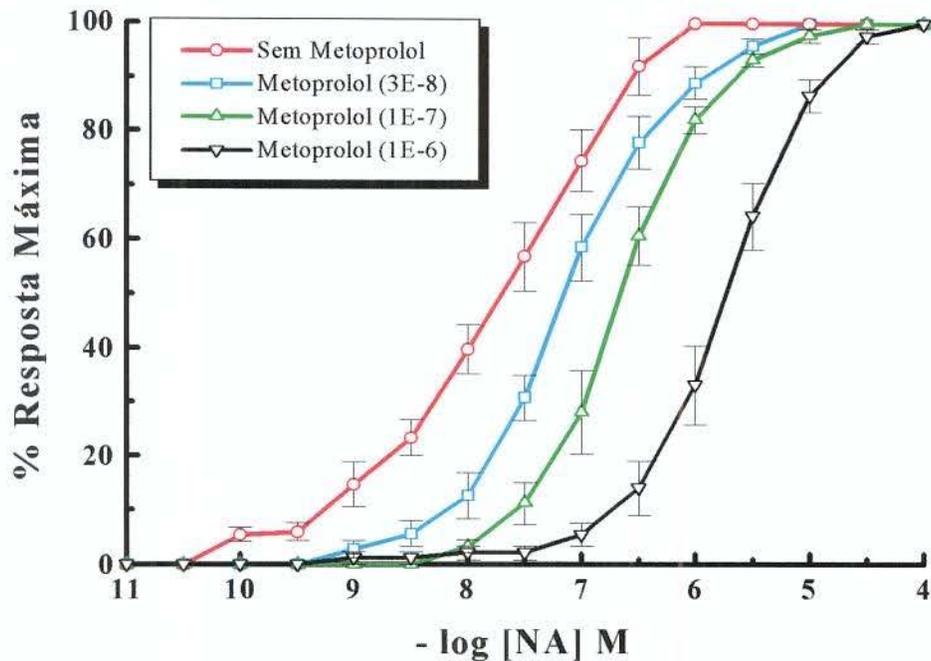


Figura 27 - Curva concentração/efeito da noradrenalina, na presença de três concentrações diferentes de metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a choques nas patas, com início no estro e sacrifício em **diestro**.

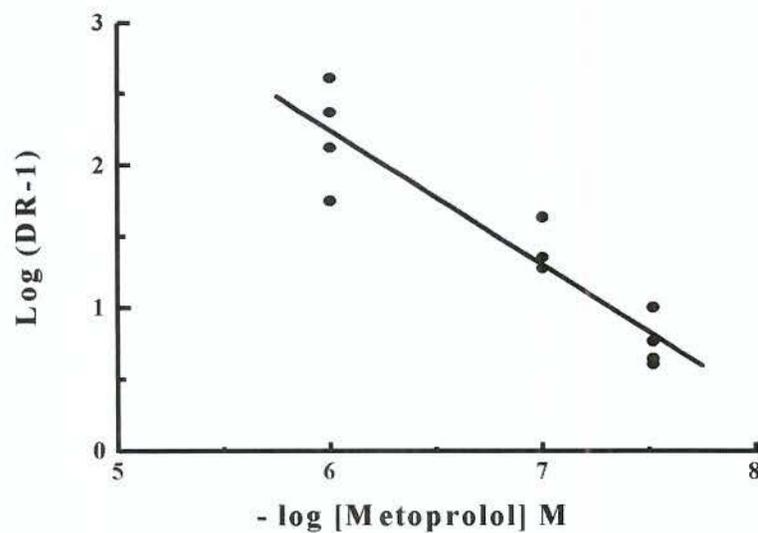


Figura 28 - Gráfico de Schild, para o antagonismo do efeito cronotrópico da noradrenalina pelo metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a choques nas patas, com início no estro e sacrifício em **diestro**.

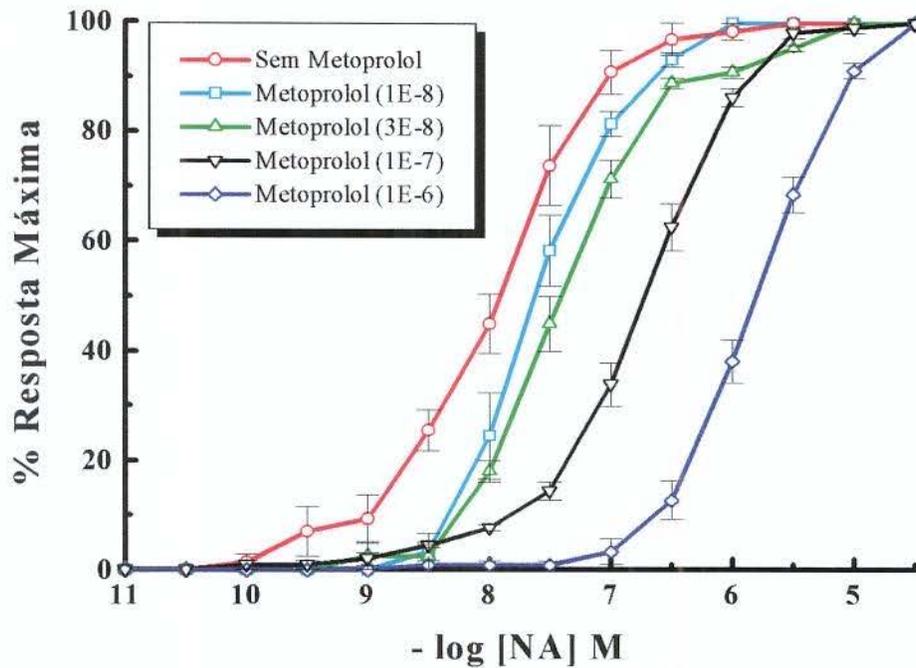


Figura 29 - Curva concentração/efeito da noradrenalina, na presença de quatro concentrações diferentes de metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas controles sacrificadas no **estro**.

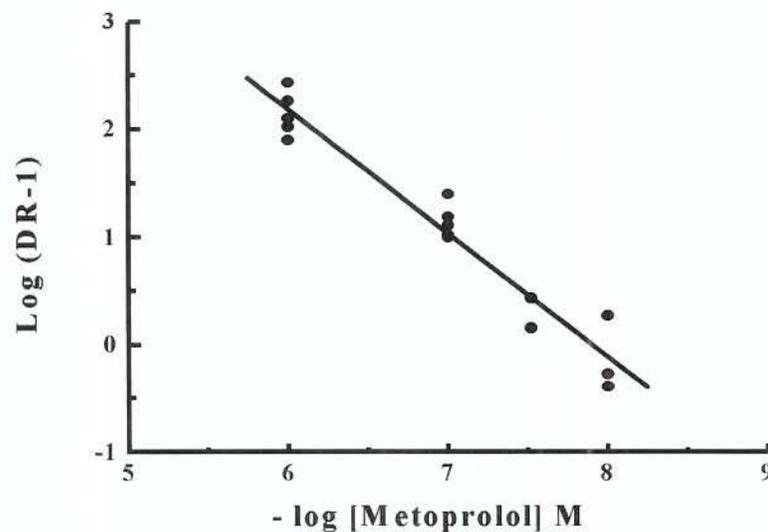


Figura 30 - Gráfico de Schild, para o antagonismo do efeito cronotrópico da noradrenalina pelo metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas controles sacrificadas no **estro**.

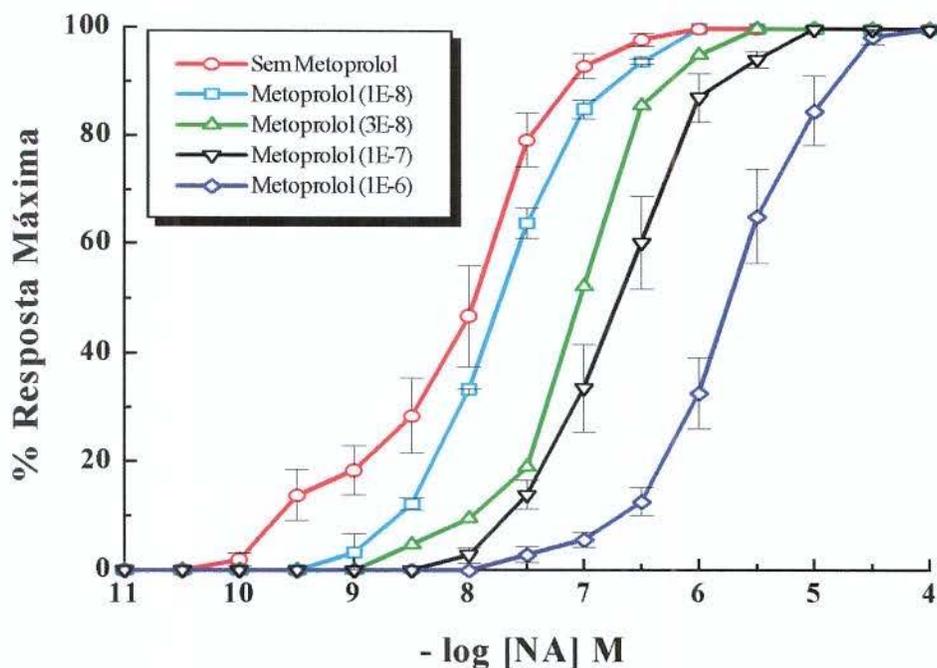


Figura 31 - Curva concentração/efeito da noradrenalina, na presença de quatro concentrações diferentes de metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a choques nas patas, com início no diestro e sacrifício em **estro**.

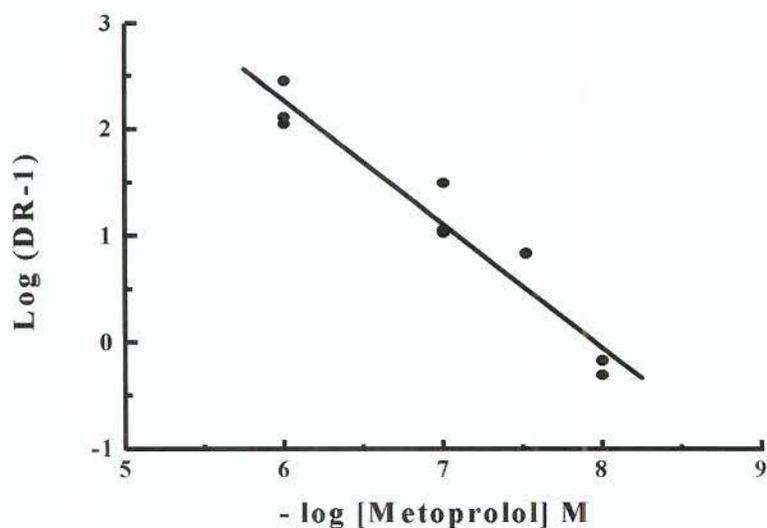


Figura 32 - Gráfico de Schild, para o antagonismo do efeito cronotrópico da noradrenalina pelo metoprolol, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a choques nas patas, com início no diestro e sacrifício em **estro**.

Tabela 8 - Valores  $pA_2$  e coeficientes angulares dos gráficos de Schild, para o metoprolol, em átrios direitos de ratas controle e submetidas a choques nas patas sacrificadas no **diestro** ou no **estro**.

Grupo	ADRENALINA			NORADRENALINA		
	$n^b$	$pA_2^a$	Inclinação <sup>c</sup>	$n^b$	$pA_2^a$	Inclinação <sup>c</sup>
<b>DIESTRO</b>						
<b>Controle</b>	21	8,41(0,06)	0,80(0,65-1,00)	12	8,30(0,05)	1,03(0,88-1,18)
<b>Choque</b>	23	8,02(0,05)*	0,87(0,73-1,01)	12	8,30(0,07)	0,94(0,69-1,19)
<b>ESTRO</b>						
<b>Controle</b>	12	8,13(0,09)	0,95(0,69-1,21)	15	8,05(0,06)	1,15(0,98-1,32)
<b>Choque</b>	9	7,94(0,11)	1,00(0,70-1,30)	9	8,13(0,09)	1,16(0,90-1,42)

<sup>a</sup>Valores médios calculados a partir dos valores individuais de  $pA_2$ . <sup>b</sup>número de experimentos. <sup>c</sup>coeficiente angular do gráfico de Schild acompanhado do limite de confiança. \*Diferença estatisticamente significativa em relação aos demais grupos sacrificados no diestro ( $p < 0,05$ ; teste de Scheffé).

## 5. DISCUSSÃO.

O estresse pode ser considerado um esforço realizado pelo organismo para adaptar-se ou reagir a agentes que ameaçam romper com a sua homeostase (DUARTE<sup>51</sup>, 1986). Frente aos denominados agentes estressores (SELYE<sup>177</sup>, 1936 ; DUARTE<sup>51</sup>, 1986), os quais podem ser de várias naturezas, variando desde aspectos psicológicos até agentes químicos, físicos e/ou biológicos (DUARTE<sup>51</sup>, 1986 ; GRIFFIN<sup>69</sup>, 1989 ; CHROUSOS & GOLD<sup>37</sup>, 1992 ; FRANKS<sup>62</sup>, 1994), o organismo produz uma série de modificações metabólicas e fisiológicas que providenciam recursos para antecipar e reagir rapidamente contra a ameaça, preservando a homeostase e garantindo a sua sobrevivência.

O agente estressor, por nós utilizado, foi choques nas patas, procedimento amplamente descrito na literatura mundial para produção de estresse (SUDHA & PRADHAN<sup>194</sup>, 1993). Durante as sessões de choques, os animais demonstraram um comportamento caracterizado por vocalização, piloereção, defecação, elevação dos membros anteriores e tentativas constantes de sair da gaiola, semelhante ao observado em ratos machos com o mesmo protocolo de estresse (BASSANI & DE MORAES<sup>13</sup>, 1987).

As respostas desencadeadas pelo organismo, frente a agentes estressores, podem mediar e/ou produzir alterações de sensibilidade do tecido atrial, aos efeitos cronotrópicos das catecolaminas, como foi observado em ratos submetidos a choques nas patas (BASSANI & DE MORAES<sup>12</sup>, 1986 ; BASSANI & DE MORAES<sup>13</sup>, 1987 ; NOURANI et al.<sup>153</sup>, 1992), natação (SPADARI & DE MORAES<sup>185</sup>, 1988 ; SPADARI et al.<sup>186</sup>, 1988), frio (HARRI et al.<sup>77</sup>, 1974 ; CALLIA<sup>31</sup>, 1981 ; CALLIA & DE MORAES<sup>32</sup>, 1983 ; CALLIA & DE MORAES<sup>33</sup>, 1984) ou imobilização (CAPAZ & DE MORAES<sup>35</sup>, 1988).

Nossos resultados demonstraram que átrios direitos isolados de ratas submetidas a choques nas patas, apresentaram alterações de sensibilidade do tecido atrial que foram dependentes da fase do ciclo estral, em que os animais foram sacrificados.

O protocolo de estresse, por nós empregado, induziu alterações de sensibilidade aos efeitos cronotrópicos da adrenalina, da noradrenalina e do soterenol, apenas quando a primeira sessão de choques nas patas foi aplicada durante o estro e o animal sacrificado no diestro (figuras 1, 7 e 15 ; tabelas 4, 6 e 7). Essas alterações de sensibilidade foram acompanhadas por um aumento da resposta máxima do tecido atrial à adrenalina (tabela 3), mas não à noradrenalina (tabela 5) ou ao soterenol (tabela 7), sem alterações da frequência inicial de batimentos espontâneos (tabelas 2 e 7). O aumento da resposta máxima do tecido atrial à adrenalina foi cancelado após a realização de tratamentos farmacológicos "in vitro" do tecido (tabela 3).

Quando a primeira sessão de choques nas patas ocorreu no diestro e o animal foi sacrificado no estro, nenhuma alteração de sensibilidade foi observada (figuras 2, 8 e 16 ; tabelas 4, 6 e 7), enquanto que o mesmo padrão de resposta máxima e frequência inicial de batimentos espontâneos, encontrado para ratas sacrificadas no diestro, foi observado nesses animais (tabelas 2, 3, 5 e 7).

As alterações de sensibilidade, observadas em ratas submetidas a estresse e sacrificadas no diestro, quando comparadas com seus respectivos controles, caracterizaram-se por subsensibilidade do tecido atrial, com um desvio à direita da curva concentração/efeito de 5,6 vezes, quando o agonista utilizado foi a adrenalina, de 5,3 vezes para a noradrenalina e, de 2,8 vezes para o soterenol.

Alterações de sensibilidade do tecido atrial podem ocorrer através de vários mecanismos: alterações da atividade dos processos de recaptção neuronal e captação extraneuronal (BASSANI & DE MORAES<sup>12</sup>, 1986 ; BASSANI & DE MORAES<sup>13</sup>, 1987 ; SPADARI et al.<sup>186</sup>, 1988), modificações na estrutura (CALLIA & DE MORAES<sup>33</sup>, 1984 ; SPADARI<sup>184</sup>, 1985 ; SPADARI & DE MORAES<sup>185</sup>, 1988) ou na densidade dos adrenoceptores  $\beta$  (MANO<sup>135</sup>, 1979), ou indução de heterogeneidade da população de adrenoceptores  $\beta$  que medeiam as respostas cronotrópicas às catecolaminas (CALLIA & DE MORAES<sup>33</sup>, 1984 ; BASSANI & DE MORAES<sup>14</sup>, 1988).

Os processos de recaptação neuronal e captação extraneuronal são os mecanismos responsáveis pela metabolização das catecolaminas. A captação extraneuronal associada à ação da enzima COMT inativa a isoprenalina e a adrenalina (BONISCH & TRENDELENBURG<sup>22</sup>, 1974 ; BONISCH<sup>20</sup>, 1978 ; TRENDELENBURG<sup>199</sup>, 1978 ; BONISCH<sup>21</sup>, 1980).

O processo de recaptação neuronal metaboliza principalmente a noradrenalina (IVERSEN<sup>92</sup>, 1965) e é bastante ativo no átrio direito (CALLIGHAM & BURGEM<sup>34</sup>, 1966 ; GOLDSTEIN et al.<sup>68</sup>, 1988). Neste processo a noradrenalina é recaptada pela terminação nervosa (SLOTKIN & BAREIS<sup>181</sup>, 1980) e inativada pela ação da enzima MAO (ABELL<sup>1</sup>, 1987 ; TRENDELENBURG<sup>201</sup>, 1991).

Para avaliarmos a participação do processo de recaptação neuronal nas alterações de sensibilidade que foram observadas, realizamos curvas concentração/efeito para noradrenalina, após tratamento farmacológico "*in vitro*" do tecido atrial que incluiu desnervação adrenérgica e inibição do processo de recaptação neuronal.

Após a realização desses procedimentos, ocorreu um desvio para a esquerda da curva concentração/efeito, dos animais submetidos a estresse, independente da fase do ciclo em que o animal foi sacrificado (tabela 6 ; figuras 9 e 10). Esse desvio da curva concentração/efeito cancelou a subsensibilidade do tecido atrial para a noradrenalina, em átrios direitos de ratas submetidas a choques nas patas e sacrificadas no diestro (tabela 6 ; figura 9).

BASSANI & DE MORAES<sup>13</sup> (1987), estudando o efeito do mesmo protocolo de estresse sobre a sensibilidade de átrios direitos isolados em ratos machos, também observaram subsensibilidade do tecido atrial à noradrenalina. Os autores atribuíram esta subsensibilidade a um aumento na eficiência do processo de recaptação neuronal, pois ela foi cancelada após desnervação adrenérgica e adição de cocaína. Esse mesmo mecanismo poderia explicar, pelo menos em parte, a subsensibilidade obtida em átrios direitos isolados de ratas estressadas e sacrificadas no diestro, à medida que a desnervação adrenérgica e a

inibição do processo de recaptação neuronal também cancelaram a subsensibilidade do tecido atrial à noradrenalina.

Nos animais controles, submetidos a esse protocolo experimental (desnervação adrenérgica e inibição da recaptação neuronal), o desvio para a esquerda da curva concentração/efeito somente foi significativo quando as ratas foram sacrificadas no estro (tabela 6 ; figuras 9 e 10), demonstrando que, em ratas controles no diestro, o processo de recaptação neuronal, aparentemente, já está inibido.

Os fatores responsáveis por estas alterações do processo de recaptação neuronal não foram esclarecidos. Entretanto, podemos levantar algumas hipóteses para explicar esses fatores.

A liberação da noradrenalina pela terminação nervosa é regulada através de um mecanismo de feedback negativo, controlado pelos adrenoceptores  $\alpha$ -adrenérgicos (LANGER et al.<sup>116</sup>, 1971 ; CUBEDDU et al.<sup>43</sup>, 1974) que são pré-sináptico e do tipo  $\alpha_2$  (LANGER<sup>115</sup>, 1974).

A aplicação de estresse, por choques nas patas, induziu subsensibilidade à noradrenalina, no córtex cerebral de ratos, associada a uma redução de 15% na afinidade dos adrenoceptores  $\alpha_2$ , sem modificações nos adrenoceptores  $\alpha_1$  e  $\beta$ , fosfodiesterase e/ou atividade total da adenilil ciclase (STONE<sup>190</sup>, 1981).

Apesar da redução da afinidade dos adrenoceptores  $\alpha_2$  não ter sido diretamente relacionada com a subsensibilidade à noradrenalina (STONE<sup>190</sup>, 1981), esta poderia prejudicar a inibição pré-sináptica da liberação desta catecolamina. Esta inibição, associada ao aumento da liberação de noradrenalina induzida pelo estresse (STONE<sup>189</sup>, 1979), produziria um aumento muito elevado na concentração dessa catecolamina na fenda sináptica, o que levaria a um aumento na eficiência do processo de recaptação neuronal, como um mecanismo compensatório.

A modulação do sistema enzimático pelos esteróides sexuais, também pode estar envolvida nas alterações observadas no processo de recaptação neuronal.

A atividade enzimática da MAO varia ao longo do ciclo estral em diferentes tecidos (ZOLOVICK et al.<sup>215</sup>, 1966 ; HOLZBAUER & YODIM<sup>87</sup>, 1973) e foi modificada pela ação do estradiol em placenta humana (SAARIKOSKI<sup>170</sup>, 1988), medula adrenal de bovinos (YODIM et al.<sup>212</sup>, 1989) e células SK-ER3 de neuroblastoma humano (MA et al.<sup>129</sup>, 1993).

Essas observações, associadas ao fato de que os níveis plasmáticos de estradiol variam ao longo do ciclo estral (YOSHINAGA et al.<sup>211</sup>, 1969 ; DUPON & KIM<sup>52</sup>, 1973), são influenciados pelo estresse (MARCONDES & SPADARI-BRATFISCH<sup>138</sup>, 1995), e que o coração é um órgão alvo para o estradiol (STUMPF & SAR<sup>193</sup>, 1977), constituem evidências de que o estradiol possa estar envolvido nas alterações encontradas.

Os níveis plasmáticos de progesterona também variam ao longo do ciclo estral (BUTCHER et al.<sup>29</sup>, 1974 ; NEQUIN et al.<sup>150</sup>, 1979 ; FREEMAN<sup>64</sup>, 1988) e com o estresse (MARCONDES & SPADARI-BRATFISCH<sup>138</sup>, 1995). A progesterona também pode modificar a atividade enzimática da MAO (SAARIKOSKI<sup>170</sup>, 1988).

Em nossos experimentos, após a realização do tratamento farmacológico, que além da desnervação adrenérgica e inibição do processo de recaptação neuronal, incluiu inibição do processo de captação extraneuronal e bloqueio dos receptores  $\alpha$  e muscarínicos, ocorreu um desvio da curva concentração/efeito à noradrenalina para a direita nos átrios direitos de animais submetidos a choques nas patas e sacrificados no diestro, que foi suficiente para novamente evidenciar a subsensibilidade do tecido atrial a esta catecolamina (tabela 6 ; figura 11), quando comparado com seus respectivos controles. Os animais, cuja primeira sessão de choques nas patas foi aplicada no diestro e o sacrifício ocorreu no estro, não apresentaram alterações de sensibilidade do tecido atrial aos efeitos cronotrópicos da noradrenalina, quando submetidos a esse mesmo protocolo experimental (tabela 6 ; figura 12).

Os resultados obtidos com ratas estressadas e sacrificadas no diestro são aparentemente conflitantes, pois a noradrenalina é metabolizada pelo processo de recaptação neuronal (IVERSEN<sup>92</sup>, 1965) e a inibição da captação

extraneuronal pela corticosterona e fenoxibenzamina (IVERSEN & SALT<sup>93</sup>, 1970 ; IVERSEN et al.<sup>94</sup>, 1972) não deveria interferir com a sensibilidade do tecido à noradrenalina.

A captação extraneuronal é um processo saturável que obedece à cinética de Michaelis-Menten (IVERSEN<sup>92</sup>, 1965). Esse sistema possui baixa afinidade (alto  $K_m$ ) e alta capacidade ( $V_{max}$ ) para as catecolaminas. Para a captação extraneuronal de ( $\pm$ )-noradrenalina, o  $K_m$  é de 382 e a  $V_{max}$  é 74 vezes mais alta que os valores correspondentes para a recaptação neuronal (BONISCH<sup>21</sup>, 1980). O alto  $K_m$  indica que o processo de captação extraneuronal não possui um papel importante na remoção da noradrenalina do espaço extracelular, quando sua concentração é baixa (FIEBIG & TRENDELENBURG<sup>59</sup>, 1978a).

Contudo, quando o sistema de recaptação neuronal está inibido, a concentração de noradrenalina, ao redor do receptor, aumenta (TRENDELENBURG<sup>198</sup>, 1966) e, nesse caso, ela pode ser metabolizada pelo processo de captação extraneuronal. A captação extraneuronal de noradrenalina foi descrita por vários autores (LIGHTMAN & IVERSEN<sup>122</sup>, 1969 ; LANGER<sup>115</sup>, 1974 ; FIEBIG & TRENDELENBURG<sup>59</sup>, 1978a ; FIEBIG & TRENDELENBURG<sup>60</sup>, 1978b ; TRENDELENBURG<sup>200</sup>, 1990), sendo responsável por 50% da remoção total (neuronal + extraneuronal) de noradrenalina marcada com trício ( $[H^3]$ -noradrenalina) no coração perfundido de rato (FIEBIG & TRENDELENBURG<sup>59</sup>, 1978a), a qual é metabolizada pela ação da COMT e MAO (FIEBIG & TRENDELENBURG<sup>60</sup>, 1978b ; BONISCH<sup>21</sup>, 1980 ; TRENDELENBURG<sup>200</sup>, 1990).

Portanto, a captação extraneuronal de noradrenalina pode ter influenciado o resultado obtido. O sistema de captação extraneuronal pode também afetar a sensibilidade do tecido atrial aos efeitos cronotrópicos das catecolaminas (BASSANI & DE MORAES<sup>12</sup>, 1986 ; SPADARI et al.<sup>186</sup>, 1988).

O sistema de captação extraneuronal pode ser inibido pelas  $\beta$ -haloalquilaminas (LIGHTMAN & IVERSEN<sup>122</sup>, 1969),  $\beta$ -estradiol (NICOL &

RAE<sup>151</sup>, 1972 ; SALT<sup>171</sup>, 1972) e pela corticosterona (SALT<sup>171</sup>, 1972 ; BONISCH<sup>20</sup>, 1978 ; BONISCH<sup>21</sup>, 1980).

Os níveis plasmáticos de corticosterona e estradiol são alterados pelo ciclo estral (YOSHINAGA et al.<sup>211</sup>, 1969 ; FREEMAN<sup>64</sup>, 1988) ou por situações de estresse (MacNIVEN et al.<sup>131</sup>, 1992 ; RODRIGUES et al.<sup>168</sup>, 1992 ; MARCONDES & SPADARI<sup>137</sup>, 1993 ; MARCONDES & SPADARI-BRATFISCH<sup>138</sup>, 1995).

O efeito inibidor da corticosterona pode ser avaliado pelas curvas concentração/efeito para adrenalina em átrios direitos de ratas controles e estressadas sacrificadas no estro e, ratas estressadas sacrificadas no diestro. Contudo, não foi observado, em átrios direitos de ratas controles sacrificadas no diestro, nos quais a captação extraneuronal encontrava-se inibida por algum fator endógeno relacionado ao ciclo estral, provavelmente corticosterona ou esteróides sexuais, como relatado por RODRIGUES et al.<sup>167</sup> (1995).

A inibição da captação extraneuronal está associada ao aparecimento de supersensibilidade do tecido atrial às catecolaminas.

SPADARI et al.<sup>186</sup> (1988) observaram o desenvolvimento de supersensibilidade do tecido atrial aos efeitos cronotrópicos do isoproterenol, em ratos machos submetidos a uma única sessão de natação de 50 minutos, e atribuíram essa supersensibilidade à inibição do processo de captação extraneuronal, devido a níveis aumentados de corticosterona.

Supersensibilidade, em órgãos isolados de animais estressados em consequência de elevação dos níveis plasmáticos de glicocorticóides, foi também descrita por outros autores (KALSNER<sup>99</sup>, 1969a ; KALSNER<sup>100</sup>, 1969b ; GIBSON & POLLOCK<sup>67</sup>, 1975). Considerando que a adrenalina é inativada pelo sistema de captação extraneuronal, o seu efeito deveria ser potencializado pela inibição desse sistema que ocorre nos animais estressados devido aos elevados níveis de corticosterona. Entretanto, não observamos supersensibilidade do tecido atrial aos efeitos cronotrópicos da adrenalina em ratas submetidas a estresse.

O fenômeno de supersensibilidade, decorrente de inibição do sistema de captação extraneuronal, somente poderá ser demonstrado quando a

concentração do agonista, para a obtenção da  $EC_{50}$ , for menor que a concentração necessária para saturar esse sistema (TRENDELENBURG & GRAEFE<sup>202</sup>, 1975 ; TRENDELENBURG<sup>199</sup>, 1978), o que pode ter influenciado os resultados obtidos em nossos experimentos.

Além desse aspecto, não podemos descartar a hipótese de que outros mecanismos compensatórios, ocorridos com os receptores e que serão discutidos adiante, tenham sido desencadeados, e possam ter contribuído para mascarar a supersensibilidade do tecido atrial aos efeitos cronotrópicos da adrenalina.

Desta forma, acreditamos que os sistemas de metabolização das catecolaminas estão alterados na situação de estresse por nós empregada. Nessa condição, quando realizamos curvas concentração/efeito, a quantidade de agonista, que de fato alcança o receptor, é diferente quando comparamos ratas estressadas com ratas controles. A realização do tratamento farmacológico completo, que inclui desnervação adrenérgica, inibição dos receptores  $\alpha$  e muscarínicos, bem como, inibição dos sistemas de captação extraneuronal e recaptação neuronal, elimina essa diferença, garantindo que a mesma quantidade de agonista alcance os receptores em átrios direitos isolados de ratas estressadas e controles e, nesse caso, o valor  $pD_2$  representaria a verdadeira interação entre o agonista e o receptor.

Nesta condição, átrios direitos isolados de ratas submetidas a choques nas patas e sacrificadas no estro, não apresentaram alterações da frequência de batimentos espontâneos (tabela 2), resposta máxima (tabelas 3 e 5) e de sensibilidade aos efeitos cronotrópicos da adrenalina e/ou noradrenalina (tabelas 4 e 6 ; figuras 4 e 12). Contudo, em ratas submetidas a estresse e sacrificadas no diestro, apesar de não verificarmos alterações da frequência de batimentos espontâneos (tabela 2) e da resposta máxima (tabelas 3 e 5) , observamos subsensibilidade do tecido atrial aos efeitos cronotrópicos da noradrenalina (tabela 6 ; figura 11), sem alterações da resposta cronotrópica à adrenalina (tabela 4 ; figura 3).

Esses resultados indicam que, a alteração de sensibilidade atrial observada em ratas estressadas e sacrificadas em diestro, somente pode ser atribuída a modificações ocorridas com os adrenoceptores que modulam a resposta cronotrópica.

O tecido do átrio direito de rato é densamente inervado pelo sistema nervoso autônomo simpático e, em condições normais, uma população homogênea de adrenoceptores  $\beta_1$  medeia a resposta cronotrópica às catecolaminas (MINNEMAN & MOLINOFF<sup>145</sup>, 1980 ; BRYAN et al.<sup>26</sup>, 1981 ; JUBERG et al.<sup>98</sup>, 1985), apesar dos estudos com radioligantes terem demonstrado que, no coração do rato, existe uma população heterogênea de adrenoceptores  $\beta$  (MINNEMAN et al.<sup>146</sup>, 1979 ; JUBERG et al.<sup>98</sup>, 1985).

Os agonistas que utilizamos, diferem entre si quanto à seletividade para subtipos de adrenoceptores  $\beta$ . A noradrenalina é considerada como seletiva para o subtipo  $\beta_1$  (McPHERSON et al.<sup>142</sup>, 1985), indicando que a subsensibilidade do tecido atrial aos efeitos cronotrópicos da noradrenalina, em ratas estressadas e sacrificadas no diestro (tabela 6 ; figura 11), está relacionada a mecanismos de dessensibilização desse receptor.

Esse mecanismo de adaptação ao estresse não foi observado em ratas submetidas a choques nas patas e sacrificadas no estro (tabela 6 ; figura 12), demonstrando que, nesses animais, algum fator endógeno, presente ou ausente durante essa fase do ciclo estral, impede esse tipo de alteração de sensibilidade do tecido atrial.

O processo de dessensibilização pode ocorrer devido à diminuição do número de receptores ("down-regulation") ou de alterações na sua função (desacoplamento) (LOHSE<sup>124</sup>, 1993).

Para avaliarmos se a dessensibilização observada nos adrenoceptores  $\beta_1$ , em ratas estressadas e sacrificadas no diestro, foi produzida por diminuição no número de receptores, realizamos curvas concentração/efeito ao soterenol, que é um agonista parcial em coração de ratos (BUCKNER et al.<sup>27</sup>, 1978).

Do ponto de vista teórico, a resposta máxima para um agonista parcial, somente ocorre quando todos os receptores nos quais esse agonista atua estiverem ocupados (BASSANI & DE MORAES<sup>13</sup>, 1987), o que permite, de forma indireta, avaliar se ocorreram mudanças no número de uma determinada população de receptores.

Como podemos observar (tabela 7 ; figuras 15 e 16) não ocorreram diferenças estatisticamente significativas na resposta máxima ao soterenol em ratas estressadas, quando comparadas com seus respectivos controles, independente da fase do ciclo em que o animal foi sacrificado, o que é uma forte evidência funcional de que o fenômeno de dessensibilização encontrado em ratas estressadas e sacrificadas no diestro, não está relacionado à redução no número de receptores, mas a alterações na sua função. Nesses animais, observamos subsensibilidade do tecido atrial aos efeitos cronotrópicos do soterenol, quando comparados com seus respectivos controles (tabela 7), confirmando, mais uma vez, a dessensibilização do adrenoceptor  $\beta_1$ .

A redução na afinidade do metoprolol, observada em ratas estressadas e sacrificadas no diestro, utilizando a adrenalina como agonista, sugere que alterações estruturais na população de adrenoceptores  $\beta_1$  ocorreram e poderiam ser responsáveis pela subsensibilidade.

Além disso, a fosforilação dos adrenoceptores é um outro mecanismo que pode induzir dessensibilização (BENOVIC et al.<sup>15</sup>, 1986 ; BENOVIC et al.<sup>17</sup>, 1991 ; LOHSE et al.<sup>127</sup>, 1992 ; LOHSE<sup>124</sup>, 1993 ; HAGA & HAGA<sup>72</sup>, 1990 ; PITCHER et al.<sup>160</sup>, 1992 ; PIPPIG et al.<sup>159</sup>, 1993), pois reduz a capacidade do receptor de ativar a proteína  $G_s$ . Esse desacoplamento, entre o receptor e a proteína  $G_s$ , poderia ser também uma explicação para a dessensibilização da resposta  $\beta_1$ , observada nos nossos experimentos.

Independente do mecanismo que produziu a dessensibilização dos adrenoceptores  $\beta_1$ , é certo que o aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona, que ocorre em animais submetidos a choques nas patas (OTTENWELLER et al.<sup>155</sup>, 1992 ; HANDA et al.<sup>75</sup>, 1994), é, pelo menos em parte, responsável por esse fenômeno, pois alterações de sensibilidade aos efeitos

cronotrópicos das catecolaminas, em átrios direitos isolados de ratos machos submetidos a estresse, não ocorreram após procedimentos experimentais que evitaram os aumentos nos níveis plasmáticos de corticosterona, durante a realização do estresse (CAPAZ & DE MORAES<sup>35</sup>, 1988 ; SPADARI & DE MORAES<sup>185</sup>, 1988 ; SPADARI et al.<sup>186</sup>, 1988).

Os hormônios esteróides podem modular a sensibilidade do tecido frente às catecolaminas, através da regulação do número de receptores na membrana plasmática ou pela regulação no acoplamento do receptor a seus efetores (DAVIES & LEFKOWITZ<sup>44</sup>, 1984 ; YARDEN et al.<sup>210</sup>, 1986 ; KIELY et al.<sup>107</sup>, 1994), portanto, a subsensibilidade do adrenoceptor  $\beta_1$ , em ratas estressadas e sacrificadas no diestro, pode também ter sido mediada por esteróides sexuais, que variam ao longo do ciclo estral (FREEMAN<sup>64</sup>, 1988) e com o estresse (MacNIVEN et al.<sup>131</sup>, 1992 ; MARCONDES & SPADARI-BRATFISCH<sup>138</sup>, 1995).

O coração é um órgão alvo para os esteróides sexuais (DENG & KAUFMANN<sup>45</sup>, 1993) e os átrios e aurículas apresentam receptores para estradiol (STUMPF & SAR<sup>193</sup>, 1977).

A influência dos esteróides sexuais sobre a densidade dos adrenoceptores e, em alguns casos, a ativação dos sistemas de segundos mensageiros foram demonstradas em útero (ROBERTS et al.<sup>164</sup>, 1977 ; KRALL et al.<sup>111</sup>, 1978 ; KANO<sup>101</sup>, 1982), bexiga urinária (LEVIN et al.<sup>120</sup>, 1980), plaquetas de coelhos (ROBERTS et al.<sup>165</sup>, 1979), útero de cobaias (HATJIS et al.<sup>78</sup>, 1988), regiões do cérebro (WILKINSON et al.<sup>208</sup>, 1979 ; WAGNER et al.<sup>207</sup>, 1979 ; MAGGI et al.<sup>132</sup>, 1985 ; JOHNSON et al.<sup>97</sup>, 1988 ; PETITTI et al.<sup>157</sup>, 1992) e em coração de ratas (KLANGKALYA & CHAN<sup>109</sup>, 1988).

As enzimas responsáveis pelos sistemas de metabolização das catecolaminas, como vimos anteriormente, podem ser alteradas pelos esteróides sexuais (SAARIKOSKI<sup>170</sup>, 1988 ; MA et al.<sup>129</sup>, 1993), o que também pode produzir alterações nos receptores.

O processo de dessensibilização dos adrenoceptores  $\beta_1$  pode explicar a subsensibilidade do tecido atrial para noradrenalina, observada em

átrios direitos isolados de ratas submetidas a estresse e sacrificadas no diestro. Entretanto, não explica a ausência de alterações de sensibilidade do tecido atrial à adrenalina, agonista que não possui seletividade, podendo atuar também em adrenoceptores  $\beta_2$  (KAUMANN<sup>104</sup>, 1986 ; BASSANI & DE MORAES<sup>14</sup>, 1988).

Como vimos anteriormente, a resposta cronotrópica do átrio direito de rato é mediada por uma população homogênea de adrenoceptores  $\beta_1$ . Entretanto, estudos com radioligantes demonstraram a existência, nesse tecido, de uma população heterogênea de adrenoceptores que, frente a uma situação de estresse, poderia participar da resposta cronotrópica (CALLIA & DE MORAES<sup>33</sup>, 1984 ; BASSANI & DE MORAES<sup>14</sup>, 1988).

Portanto, a participação dos adrenoceptores  $\beta_2$ , na mediação da resposta cronotrópica às catecolaminas, poderia ser um dos mecanismos adaptativos desenvolvidos por ratas submetidas a choques nas patas e sacrificadas no diestro, o que explicaria a ausência de alterações de sensibilidade à adrenalina nesses animais.

Com o objetivo de avaliar essa hipótese, foram obtidas curvas concentração/efeito para adrenalina e noradrenalina, na presença de butoxamina, um antagonista seletivo de adrenoceptores  $\beta_2$ .

Como podemos observar, a adição de butoxamina ao líquido de incubação produziu subsensibilidade do tecido atrial aos efeitos cronotrópicos da adrenalina (tabela 4 ; figura 5), sem alteração no padrão de resposta à noradrenalina (tabela 6 ; figura 13), modificações na frequência de batimentos espontâneos (tabela 2) e na resposta máxima (tabelas 3 e 5) em átrios de ratas estressadas e sacrificadas no diestro, quando comparadas com seus respectivos controles. A subsensibilidade à adrenalina, caracterizada por um desvio à direita da curva concentração/efeito de 2,3 vezes, demonstra que, nesses animais, os adrenoceptores  $\beta_2$  passaram a ter participação ativa na mediação da resposta cronotrópica às catecolaminas.

A butoxamina, na concentração utilizada (1  $\mu$ M), é seletiva para adrenoceptores  $\beta_2$  (BASSANI & DE MORAES<sup>14</sup>, 1988), e isso pode ser comprovado também pelos resultados obtidos nesse trabalho, pois os valores  $pD_2$ ,

dos átrios direitos isolados dos animais controles, não apresentaram alterações antes ou após a adição de butoxamina (tabelas 4 e 6). Além disso, os resultados, obtidos para noradrenalina, demonstraram um padrão similar de resposta na presença ou na ausência de butoxamina (tabela 6).

Um resultado inesperado nos nossos experimentos foi obtido em átrios direitos de ratas estressadas e sacrificadas no estro. Após a adição de butoxamina, o tecido atrial mostrou-se subsensível aos efeitos cronotrópicos da adrenalina (tabela 4 ; figura 6), o que demonstra que, nesses animais, os adrenoceptores  $\beta_2$  também participam da resposta cronotrópica.

Novamente, a corticosterona parece ter efeito fundamental na participação de adrenoceptores  $\beta_2$ , conforme se observa na resposta cronotrópica às catecolaminas, em ratas submetidas a choques nas patas.

Estudos com radioligantes demonstraram que glicocorticóides têm a capacidade de aumentar o número de adrenoceptores  $\beta$  (MANO et al.<sup>135</sup>, 1979 ; BARNES et al.<sup>10</sup>, 1984 ; DAVIES & LEFTKOWITZ<sup>44</sup>, 1984 ; HADCOCK et al.<sup>71</sup>, 1989). Hidrocortisona, administrada cronicamente a ratos, aumentou em 70% a densidade de receptores  $\beta$  em tecido pulmonar, com um decréscimo na afinidade do ligante [ $I^{125}$ ]-hidroxibenzilpindolol. Nesses experimentos, a adrenalectomia produziu uma queda de 29% no número de adrenoceptores  $\beta$ , sem alteração de sua afinidade, quadro que foi revertido pela aplicação exógena de hidrocortisona (MANO et al.<sup>135</sup>, 1979).

A administração de betametasona a coelhas, no 25<sup>a</sup> dia de gestação, aumentou a densidade dos adrenoceptores  $\beta$  nos pulmões dos fetos, sugerindo que, o glicocorticóide endógeno na circulação fetal, estimularia esse processo (CHENG et al.<sup>36</sup>, 1980).

A adição de dexametasona, em cultura de células adiposas 3T3-F442A maduras e em diferenciação, demonstrou que esse glicocorticóide influencia a expressão dos adrenoceptores  $\beta$ , também nesse tecido. A dexametasona aumentou a expressão dos adrenoceptores  $\beta_2$ , ao mesmo tempo que reduziu os adrenoceptores  $\beta_1$ , com uma inversão na razão de  $\beta_1$ :  $\beta_2$  de 90:10 para 20:80 (FEVÉ et al.<sup>58</sup>, 1990).

Em células C6 de glioma de ratos, a dexametasona também alterou a relação  $\beta_1:\beta_2$  de 80:20 para 50:50, sem alterações na quantidade total de adrenoceptores  $\beta$  (KIELY et al.<sup>107</sup>, 1994).

A incubação de células DDT<sub>1</sub>MF-2 de ducto deferente de camundongo com glicocorticóide aumentou o número de adrenoceptores  $\beta$  e o estado de equilíbrio do mRNA desses receptores (HADCOCK & MALBON<sup>70</sup>, 1988), sendo que, a adição de um inibidor do processo de transcrição impediu o aumento do mRNA, sugerindo que o glicocorticóide alterou a transcrição gênica.

O tratamento de células musculares lisas, da linhagem DDT<sub>1</sub>MF-2 de camundongos, por glicocorticóides, produziu um aumento no número de adrenoceptores  $\beta_2$ , por elevação na taxa de transcrição gênica (COLLINS et al.<sup>41</sup>, 1988) que foi apontada, também, como responsável pelo aumento na densidade dos adrenoceptores  $\beta_2$ , em pulmões humanos incubados com dexametasona (MAK et al.<sup>133</sup>, 1995), e aparentemente, também, em nossos experimentos.

Para avaliarmos a presença de uma população heterogênea de receptores mediando a resposta cronotrópica às catecolaminas, em átrios direitos isolados de ratas estressadas, determinamos o gráfico de Schild e o valor  $pA_2$  para o metoprolol, usando, como agonistas, a adrenalina e a noradrenalina.

O valor  $pA_2$  corresponde numericamente ao logaritmo negativo da concentração molar do antagonista, que provoca um deslocamento de duas vezes à direita na curva concentração/efeito do agonista (JENKINSON et al.<sup>96</sup>, 1995).

A análise de Schild é utilizada para caracterizar a população de receptores em um órgão ou tecido isolado (BASSANI & DE MORAES<sup>14</sup>, 1988). Quando existe uma população heterogênea de receptores mediando a resposta, a inclinação da reta de regressão do gráfico de Schild poderá ser diferente da unidade, e depende da seletividade do agonista e do antagonista (KENAKIN<sup>105</sup>, 1982 ; KENAKIN<sup>106</sup>, 1984).

Como demonstramos anteriormente, os adrenoceptores  $\beta_2$  passaram a participar da resposta cronotrópica em ratas estressadas. Contudo, as inclinações das retas de regressão dos gráficos de Schild para o metoprolol, usando adrenalina ou noradrenalina como agonista, não foram estatisticamente

diferentes de 1.0 (tabela 8 ; figuras de 17 à 32), o que aparentemente indica que a população de receptores mediando essa resposta cronotrópica é homogênea. Entretanto, MILNOR<sup>144</sup> (1986) enfatizou que, a inclinação do gráfico de Schild para uma população heterogênea de receptores, na qual um dos subtipos de receptores contribua com menos do que 35% da população total, não é, necessariamente, diferente de 1,0. Esta tendência se acentua quando os dois subtipos de receptores possuem a mesma afinidade para o agonista, mas grande diferença de afinidade para o antagonista, como é o caso dos nossos experimento, em que utilizamos metoprolol como antagonista e adrenalina como agonista.

A aplicação de choques nas patas, em ratas estressadas e sacrificadas no diestro, reduziu o valor  $pA_2$  para o metoprolol, utilizando adrenalina como agonista (tabela 8) em 2,5 vezes, indicando uma redução na afinidade aparente do antagonista pelo adrenoceptor  $\beta_1$ , o que sugere uma alteração estrutural desses receptores, induzida pelo agente estressor. Essa alteração estrutural poderia determinar a subsensibilidade do tecido atrial aos efeitos cronotrópicos das catecolaminas.

Os nossos resultados demonstraram que, átrios direitos isolados de ratas submetidas a choques nas patas e sacrificadas no diestro, apresentaram alterações de sensibilidade do tecido atrial relacionadas a modificações adaptativas nos processos de metabolização das catecolaminas e dos adrenoceptores que modulam a resposta cronotrópica. Contudo, em átrios direitos isolados de ratas submetidas ao mesmo protocolo de estresse, mas sacrificadas no estro, não observamos alterações de sensibilidade do tecido atrial às catecolaminas, exceto pelo aparecimento de subsensibilidade aos efeitos cronotrópicos da adrenalina, somente após a adição de butoxamina, sugerindo um papel dos adrenoceptores  $\beta_2$  na modulação dessa resposta.

Infelizmente, o presente trabalho não apresenta possibilidades metodológicas de elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos com essas alterações. Entretanto, a demonstração de que as alterações induzidas pelo estresse, como parte de um processo adaptativo, são dependentes da fase do ciclo estral, na qual o animal foi sacrificado, abre novos horizontes de pesquisas na

busca de respostas para inúmeras questões tais como: Por que essas alterações somente ocorrem em ratas estressadas e sacrificadas no diestro? A aparente ausência de mecanismos adaptativos frente a uma situação de estresse, em fêmeas sacrificadas no estro, representa um fator de proteção para esses animais? Quais os fatores endógenos, relacionados ou não com o ciclo estral, que induzem a essas alterações? Quais são os verdadeiros mecanismos moleculares responsáveis pelas alterações de sensibilidade que foram observadas? Essas questões permanecem sem respostas até o presente momento, mas pretendemos respondê-las no futuro.

## 6. CONCLUSÕES.

Os resultados obtidos demonstraram que:

- Átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas e sacrificadas no estro, não apresentaram alterações de sensibilidade aos efeitos cronotrópicos da adrenalina, noradrenalina e soterenol.

- Átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas e sacrificadas no diestro, apresentaram subsensibilidade aos efeitos cronotrópicos da adrenalina, noradrenalina e soterenol. Os mecanismos subjacentes a esta subsensibilidade incluem: aumento na eficiência do sistema de recaptação neuronal, dessensibilização dos adrenoceptores  $\beta_1$  e participação dos adrenoceptores  $\beta_2$  na mediação da resposta cronotrópica às catecolaminas.

- Apesar de não ter sido detectado pelos agonistas plenos, os resultados com butoxamina demonstraram que, possivelmente, os adrenoceptores  $\beta_2$  também passaram a participar na mediação da resposta cronotrópica às catecolaminas, em átrios direitos isolados de ratas submetidas a choques nas patas e sacrificadas no estro.

- As alterações de sensibilidade, observadas em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas e sacrificadas no diestro, são devidas a mecanismos semelhantes àqueles descritos em átrios direitos isolados de ratos machos submetidos ao mesmo agente estressor.

- O ciclo estral tem um papel fundamental nas alterações de sensibilidade do tecido atrial aos efeitos cronotrópicos das catecolaminas, pois ratas submetidas a choques nas patas e sacrificadas durante o diestro, apresentaram alterações de sensibilidade que não foram encontradas em ratas estressadas e sacrificadas durante o estro.

## ABSTRACT

This study was performed to analyse the alterations in sensitivity to catecholamines in right atria isolated (AD) from rats submitted to footshock stress and sacrificed at estrus or diestrus.

Adult Wistar female rats exhibiting regular 4-day estrous cycles were submitted to three footshock sessions at estrus, metestrus and diestrus or at diestrus, proestrus and estrus. Each rat received during 30 min, 120 electric shocks (1.0 mA, 1.0 s) at variable intervals of 5 to 25 s. After the last session, the animals were sacrificed and its right atria set up for isometric recording of spontaneous beating. Dose-response curves to noradrenaline (NA), adrenaline (ADR) and soterenol (SO) were obtained before "*in vitro*" treatment. To analyse the mechanisms of the alterations in sensitivity one or more of the following "*in vitro*" treatment were used: sympathetic denervation, inhibition of the extraneuronal uptake and neuronal reuptake and blockade of alpha adrenoceptors and muscarine receptors. Data were compared by using analysis of variance followed by Scheffé test and student t-test. Differences were considered significant at  $p < 0,05$ .

Right atria from rats submitted to footshock stress and sacrificed at diestrus compared to those from control rats showed subsensitivity to ADR ( $pD_2 = 7.38 \pm 0,09$  vs.  $6.63 \pm 0,08$ ), NA ( $pD_2 = 7.67 \pm 0.11$  vs.  $6.95 \pm 0,13$ ) and SO ( $pD_2 = 6.80 \pm 0.13$  vs.  $6.36 \pm 0.07$ ). The inhibition of neuronal reuptake canceled the subsensitivity to NA ( $pD_2 = 7.88 \pm 0.06$  vs.  $7.73 \pm 0.08$ ). After complete "*in vitro*" treatment AD from stressed rats showed subsensitivity to NA ( $pD_2 = 8.10 \pm 0.11$  vs  $7.68 \pm 0.14$ ) however the subsensitivity to ADR was canceled ( $pD_2 = 7.67 \pm 0.13$  vs.  $7.49 \pm 0.08$ ) but returned after addition of butoxamine ( $pD_2 = 7.51 \pm 0.05$  vs.  $7.15 \pm 0.13$ ). Right atria from stressed rats sacrificed at estrus were also subsensitive to ADR after addition of butoxamine ( $pD_2 = 7.59 \pm 0.05$  vs.  $7.17 \pm 0.07$ ).

These results demonstrat that footshock stress, induces an increase in the efficiency of the neuronal reuptake process, desensitization of  $\beta_1$

adrenoceptors and increase in  $\beta_2$ -adrenoceptor-mediated response in right atria from female rats sacrificed at diestrus. During estrus it seems that those adaptive responses of the chronotropic control of the heart by catecholamines do not occur with the exception of the increase in  $\beta_2$ -adrenoceptor-mediated response.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*.

1. ABELL, C.W. Monoamine oxidase A and B from human liver and brain. *Methods in Enzimology*, v. 142, p. 638-650, 1987.
2. AHLQUIST, R.P. A study of adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol.*, v. 153, p. 586-600, June 1948.
3. ANISHCHENKO, T.G., GUDKOVA, E.V. Sex differences in sensitivity of albino rats to adrenalin. *Bull. Exp. Biol. Med.*, v. 113, n. 6, p. 769-771, 1992.
4. APRIGLIANO, O., HERMSMEYER K. In vitro denervation of the portal vein and caudal artery of the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 198, n. 3, p. 568-577, 1976.
5. ARUNLAKSHANA, O., SCHILD, H.O. Some quantitative uses of drug antagonists. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 14, p. 48-58, 1959.
6. AXELROD, J., REISINE, T.D. Stress hormones: their interaction and regulation. *Science*, v. 224, n. 4648, p. 452-459, 1984.
7. BANERJEE, S.P., KUNG, L.S.  $\beta$ -adrenergic receptors in rat heart: effects of thyroidectomy. *Europ. J. Pharmacol.*, v. 43, p. 207-208, 1977.
8. BÁNKY, Z., NAGY, G.M., HALÁSZ, B. Analysis of pituitary prolactin and adrenocortical response to ether, formalin or restraint in lactating rats: rise in corticosterone, but no increase in plasma prolactin levels after exposure to stress. *Neuroendocrinology*, v. 59, p. 63-71, 1994.
9. BARNES, P.J., ADCOCK, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 14, p. 436-441, 1993.
10. \_\_\_\_\_, JACOBS, M.M., ROBERTS, J.M. Glucocorticoids preferentially increase fetal alveolar  $\beta$ -receptors: autoradiographic evidence. *Paediatr. Res.*, v. 18, p. 1191-1194, 1984.

---

\* De acordo com a NB-6023, de agosto de 1989, da Associação Brasileira de Normas Técnicas.

11. BARON, S., BRUSH, F.R. Effects of acute and chronic restraint and estrus cycle on pituitary-adrenal function in the rat. *Horm. Behav.*, v. 12, p. 218-224, 1979.
12. BASSANI, R.A., DE MORAES, S. Variações de sensibilidade às catecolaminas em átrios direitos isolados de ratos submetidos à choque na pata. *In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DAS SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL*, 1., 1986, São Paulo. *Anais...* São Paulo: FESBE, 1986. p. 299.
13. \_\_\_\_\_. Subsensitivity to  $\beta$ -adrenoceptor agonists in right atria isolated from footshock-stressed rats. *Gen. Pharmacol.*, v. 18, n. 5, p. 473-477, 1987.
14. \_\_\_\_\_. Effects of repeated footshock stress on the chronotropic responsiveness of the isolated pacemaker of the rat: role of beta-2 adrenoceptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 246, p. 316-321, 1988.
15. BENOVIC, J.L. et al.  $\beta$ -adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 83, p 2797-2801, May 1986.
16. \_\_\_\_\_. et al.  $\beta$ -adrenergic receptor kinase: primary structure delineates a multigene family. *Science*, v. 246, p. 235-240, Oct. 1989.
17. \_\_\_\_\_. et al. Cloning, expression, and chromosomal localization of  $\beta$ -adrenergic receptor kinase 2. *J. Biol. Chem.*, v. 266 , n. 23 , p. 14939-14946, 1991.
18. BERRIDGE, D.B. The molecular bases of communication within the cell. *Scientific American*, v. 253, p. 124-136, 1985.
19. 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.
20. BONISCH, H. Further studies on the extraneuronal uptake and metabolism of isoprenaline in the perfused rat heart. *Naunyn-Schimiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 303, p. 121-131, 1978.

21. BONISCH, H. Extraneuronal transport of catecholamines. *Pharmacology*, v. 21, p. 93-108, 1980.
22. \_\_\_\_\_, TRENDELENBURG, U. Extraneuronal removal, accumulation and O-methylation of isoprenaline in the perfused heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 283. p. 191-218, 1974.
23. BOUVIER, M. et al. Two distinct pathways for cAMP-mediated down-regulation of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.*, v. 264, p. 16786-16792, 1989.
24. BOYAJIAN, C.L., LESLIE, F.M. Pharmacological evidence for alpha-2 adrenoceptor heterogeneity: differential binding properties of [ $^3$ H] Rauwolscine and [ $^3$ H] idazoxan in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 241, n. 3, p. 1092-1098, 1987.
25. BROWN-GRANT, K., EXLEY, D., NAFTOLIN, F. Peripheral plasma oestradiol and luteinizing hormone concentrations during the oestrous cycle of the rat. *J. Endocr.*, v. 48, n. 2, p. 295-296, 1970.
26. BRYAN, L.J. et al. A study designed to explore the hypothesis that beta-1 adrenoceptors are "innervated" receptors and beta-2 adrenoceptors are "hormonal" receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 216, n. 2, p. 395-400, 1981.
27. BUCKNER, C.K., TORPHY, T., COSTA, D. J. Studies on  $\beta$ -adrenoceptors mediating changes in mechanical events and adenosine 3'-5' monophosphate levels. rat atria. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 47, p. 259-271, 1978.
28. BURGÉN, A.S.V., IVERSEN, L.L. The inhibition of noradrenaline uptake by sympathomimetic amines in the rat isolated heart. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 25, p. 34-49, 1965.
29. BUTCHER, R.L., COLLINS, W.E., FUGO, N.W. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 $\beta$  throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology*, v. 94, p. 1704-1708, 1974.
30. BYLUND, D.B. et al. International Union of Pharmacology Nomenclature of Adrenoceptors. *Pharmacol. Rev.*, v. 46, n. 2, p. 121-136, 1994.

31. CALLIA, M. L. *Supersensibilidade de adrenoceptores  $B_1$  cardíacos e níveis plasmáticos de corticosterona em ratos expostos ao frio*. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 1981. 62 p.
32. \_\_\_\_\_, DE MORAES, S. Supersensitivity to isoprenaline in right atria isolated from cold-exposed rats. *J. Pharmac. Pharmacol.*, v. 35, p. 196-197, 1983.
33. \_\_\_\_\_. Heterogeneity of beta adrenoceptors in right atria isolated from cold-exposed rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 230, p. 450-454, 1984.
34. CALLIGHAM, B.A., BURGEN, A.S.V. The uptake of isoprenaline and noradrenaline by the perfused rat heart. *Mol. Pharmacol.*, v. 2, p. 37-42, 1966.
35. CAPAZ, F.R., DE MORAES, S. Reduction by acute restraint stress of noradrenaline sensitivity in the isolated pacemaker of the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 147, p. 295-298, 1988.
36. CHENG, J.B. et al. Glucocorticoids increase pulmonary  $\beta$ -adrenergic receptors in fetal rabbit. *Endocrinology*, v. 105, n. 5, p. 1646-1648, 1980.
37. CHROUSOS, G.P., GOLD, P.W. The concepts of stress and stress system disorders. *J. Amer. Med. Assoc.*, v. 267, n. 9, p. 1244-1252, Mar. 1992.
38. CHUNG, F.Z. et al. Cloning and sequence analysis of the human brain  $\beta$ -adrenergic receptor. *FEBS Letters*, v. 211, n. 2, p. 200-206, Jan. 1987.
39. CIARALDI, T., MARINETTI, G.V. Thyroxine and propylthiouracil effects in vivo on alpha and beta adrenergic receptors in rat heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 74, n. 3, p. 984-991, 1977.
40. COLLINS, S. Recent perspectives on the molecular structure and regulation of the  $\beta_2$ -adrenoceptor. *Life Sci.*, v. 52, n. 26, p. 2083-2091, 1993.
41. \_\_\_\_\_, CARON, M.G., LEFKOWITZ, R.J.  $\beta_2$ -adrenergic receptors in hamster smooth muscle cells are transcriptionally regulated by glucocorticoids. *J. Biol. Chem.*, v. 263, n. 19, p. 9067-9070, 1988.

42. COLLINS, S., et al. Structure and regulation of G protein-coupled receptors: The  $\beta_2$ -adrenergic receptor as a model. *Vitamins and Hormones*, v. 46, p. 1-39, 1991.
43. CUBEDDU, L. et al. Release of norepinephrine and dopamine- $\beta$ -hydroxylase by nerve stimulation. I. role of neuronal and extraneuronal uptake and of alpha presynaptic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, v. 190, n. 3, p. 431-450, 1974.
44. DAVIES, A.O., LEFKOWITZ, R.J. Regulation of  $\beta$ -adrenergic receptors by steroid hormones. *Ann. Rev. Physiol.*, v. 46, p. 119-130, 1984.
45. DENG, Y., KAUFMANN, S. The influence of reproductive hormones on ANF release by rat atria. *Life Sci.*, v. 53, n. 9, p. 689-696, 1993.
46. DIXON, R.A. et al. Cloning of the gene and cDNA for mammalian  $\beta$ -adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature*. v. 321, n. 1, p. 75-79, May 1986.
47. \_\_\_\_\_ et al. Ligand binding to the  $\beta$ -adrenergic receptor involves its rhodopsin-like core. *Nature*, v. 326, p. 73-77, Mar. 1987.
48. \_\_\_\_\_, SIGAL, I.S., STRADER, C.D. Structure-function analysis of the  $\beta$ -adrenergic receptor. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, v. LIII, p. 487-497, 1988.
49. DOHLMAN, H.G. et al. The multiple membrane spanning topography of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor: localization of the sites of binding, glycosylation, and regulatory phosphorylation by limited proteolysis. *J. Biol. Chem.*, v. 262, n. 29, p. 14282-14288, 1987.
50. DRICKAMER, L.C. Determination of oestrous condition in female mice is dependent upon time of day. *J. Reprod. Fert.*, v. 79, p.659-662, 1987.
51. DUARTE, G.M. Fisiopatologia do exercício. *In: DUARTE, G.M. Ergometria - bases da reabilitação cardiovascular.* Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1986. cap. 2, p. 3-6.
52. DUPON, C., KIM, M.H. Peripheral plasma levels of testosterone, androstenedione, and oestradiol during the rat oestrus cycle. *J. Endocr.*, v. 59, n. 3, p. 653-654, 1973.

53. ELIOT, R.S. Fisiologia do estresse. *In: Estresse e o coração - mecanismos, avaliação e cuidados*. Rio de Janeiro: Revinter Ltda, 1992. cap. 4, p. 23-30.
54. EMORINE, L.J. et al. Structure of the gene for human  $\beta_2$ -adrenergic receptor: expression and promoter characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 84, p. 6995-6999, Oct. 1987.
55. \_\_\_\_\_, et al. Molecular characterization of the human  $\beta_3$ -adrenergic receptor. *Science*, v. 245, p. 1118-1121, Sept. 1989.
56. EUKER, J.S., MEITES, J., RIEGLE, G.D. Effects of acute stress on serum LH and prolactin in intact, castrate and dexamethasone-treated male rats. *Endocrinology*, v. 96, n. 1, p. 85-92, 1975.
57. FAIN, J.N., GARCIA-SÁINZ, J. A. Role of phosphatidylinositol turnover in  $\alpha_1$  and of adenylate cyclase inhibition in  $\alpha_2$ . effects of catecholamines. *Life Sci.*, v. 26, n. 15, p. 1183-1194, 1980.
58. FÈVE, B. et al. Differential regulation of  $\beta_1$ -and  $\beta_2$ -adrenergic receptor protein and mRNA levels by glucocorticoids during 3T3-F442A adipose differentiation. *J. Biol. Chem.*, v. 265, n. 27, p.16343-16349, 1990.
59. FIEBIG, E.R., TRENDELENBURG, U. The neuronal and extraneuronal uptake and metabolism of  $^3\text{H}$ -(-)-noradrenaline in the perfused rat heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 303, p. 21-35, 1978a.
60. \_\_\_\_\_. The kinetic constants for the extraneuronal uptake and metabolism of  $^3\text{H}$ -(-)-noradrenaline in the perfused rat heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 303, p. 37-45, 1978b.
61. FOSTER, S.J., HARDEN, T.K. Dexamethasone increases  $\beta$ -adrenoceptor density in human astrocytoma cells. *Biochem. Pharmacol.*, v. 29, p. 2151-2153, 1980.
62. FRANKS, B.D. What is stress?. *Quest*, v. 46, p. 1-7, 1994.
63. FRASER, C.M., VENTER, J.C. The synthesis of  $\beta$ -adrenergic receptors in cultured human lung cells: induction by glucocorticoids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 94, n. 1, p. 390-397, May 1980.

64. FREEMAN, M.E. The ovarian cycle of the rat. In: KNOBIL, E. et al. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press. LTD., 1988. cap. 45, p. 1893-1928.
65. FRIELLE, T. et al. Cloning of the cDNA for the human  $\beta_1$ -adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 84, p. 7920-7924, Nov. 1987.
66. FURCHGOTT, R.F., BURSZTYN, P. Comparison of dissociation constants and of relative of efficacies of selected agonists acting on parasympathetic receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 144, p. 882-891, 1967.
67. GIBSON, A., POLLOCK, D. The involvement of corticosteroids in the supersensitivity produced in the rat anococcygeus muscle by morphine withdrawal, thyroidectomy or a single dose of reserpine. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, v. 192, n. 2, p. 390-398, 1975.
68. GOLDSTEIN, D.S. et al. In vivo measurement of neuronal uptake of norepinephrine in the human heart. *Circulation*, v. 78, n. 1, p. 41-48, July 1988.
69. GRIFFIN, J.F.T. Stress and immunity: a unifying concept. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 20, p. 263-312, 1989.
70. HADCOCK, J.R., MALBON, C.C. Regulation of  $\beta$ -adrenergic receptors by "permissive" hormones: glucocorticoids increase steady-state levels of receptor mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 85, p. 8415-8419, 1988.
71. \_\_\_\_\_, WANG, H., MALBON, C.C. Agonist-induced destabilization of  $\beta$ -adrenergic receptor mRNA. *J. Biol. Chem.*, v. 264, n. 33, p. 19928-19933, 1989.
72. HAGA, K., HAGA, T. Dual regulation by G proteins of agonist-dependent phosphorylation of muscarinic acetylcholine receptors. *FEBS Letters*, v. 268, n. 1, p. 43-47, July 1990.
73. HALEEM, D.J., KENNETT, G., CURZON, G. Adaptation of female rats to stress: shift to male pattern by inhibition of corticosterone synthesis. *Brain Res.*, v. 458, p. 339-347, 1988.

74. HAN, C., ABEL, P.W., MINNEMAN, K.P.  $\alpha$ -1 adrenoceptor subtypes linked to different mechanisms for increasing intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in smooth muscle. *Nature*, v. 329, p. 333-335, Sept. 1987.
75. HANDA, R.J. et al. Androgen regulation of adrenocorticotropin and corticosterone secretion in the male rat following novelty and foot shock stressors. *Physiol. Behav.*, v. 55, n. 1, p. 117-124, 1994.
76. HARDEN, T.K. Agonist-induced desensitization of the  $\beta$ -adrenergic receptor-linked adenylate cyclase. *Pharmacol. Rev.*, v. 35, p. 5-32, 1983.
77. HARRI, M.N.E., MELENDER, L., TIRRI, R. Changed chronotropic sensitivity to sympathomimetic amines in isolated atria from rats following cold acclimation. *Experientia*, v. 30, n. 9, p. 1041-1043, 1974.
78. HATJIS, C.G., KORITNIK, D.K., CREWS, A. Up-regulation of guinea pig myometrial  $\beta$ -adrenoceptors by systemic estradiol and progesterone. *Endocrinology*, v. 122, N. 4, p. 1455-1459, 1988.
79. HAUSDORFF, W.P. et al. Phosphorylation sites on two domains of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J. Biol. Chem.*, v. 264, n. 21, p. 12657-12665, 1989.
80. \_\_\_\_\_, CARON, M.G., LEFKOWITZ, R.J. Turning off the signal: desensitization of  $\beta$ -adrenergic receptor function. *FASEB J.*, v. 4, p. 2881-2889, Aug. 1990a.
81. \_\_\_\_\_ et al. A mutation of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor impairs agonist activation of adenylyl cyclase without affecting high affinity agonist binding. Distinct molecular determinants of the receptor are involved in physical coupling to and functional activation of  $G_s$ . *J. Biol. Chem.*, v. 265, n. 3, p. 1388-1393, 1990b.
82. HEDBERG, A. et al. Effects of pindolol and propranolol on beta adrenergic receptor on human lymphocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 239, n. 1, p.117-123, 1986.

83. HENNESSY, M.B. et al. Plasma corticosterone concentrations sensitively reflects levels of stimulus intensity in the rat. *Physiol. Behav.*, v. 22, n. 5, p. 821-825, 1979.
84. HERD, J.A. Cardiovascular response to stress. *Physiol. Rev.*, v. 71, n. 1, p. 305-330, 1991.
85. HIROSHIGE, T. et al. Sex difference in circadian periodicity of CRF activity in the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology*, v. 11, p. 306-320, 1973.
86. HOFFMAN, H.S., FLESHLER, M. A relay sequencing device for scrambling grid shock. *J. Exp. Anim. Behav.*, v. 55, p. 329-330, 1962.
87. HOLZBAUER, M., YODIM, M.B.H. The oestrus cycle and monoamine oxidase activity. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 48, p. 600-608, 1973.
88. HOMCY, C.J., GRAHAM, R.M. Molecular characterization of adrenergic receptors. *Circ. Res.*, v. 56, n. 5, p. 635-650, May 1985.
89. HOUSSAY, B. Ciclos Sexuais Femininos. In: HOUSSAY, B. *Fisiologia Humana*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1980.
90. IMMS, F.J., NEAME, R.L.B., POWIS, D.A. The subdivision of  $\beta$ -adrenoceptors in the cardiovascular system of the rat. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 67, p. 367-370, 1979.
91. IVERSEN, L.L. The uptake of noradrenaline by the isolated perfused rat heart. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 21, p. 523-37, 1963.
92. \_\_\_\_\_. The uptake of catechol amines at high perfusion concentrations in the rat isolated heart: a novel catechol amine uptake process. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 25, p. 18-33, 1965.
93. \_\_\_\_\_, SALT, P.J. Inhibition of catecholamine uptake<sub>2</sub> by steroids in the isolated rat heart. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 40, p. 528-530, 1970.
94. \_\_\_\_\_, WILSON, H.A. Inhibition of catecholamines uptake in isolated rat heart by haloalkylamines related to phenoxybenzamine. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 46, p. 647-657, 1972.
95. JASPER, J.R., INSEL, P. A. Evolving concepts of partial agonism. The  $\beta$ -adrenergic receptor as a paradigm. *Biochem. Pharmacol.*, v. 43, n. 2, p. 119-130, 1992.

96. JENKINSON, D.H. et al. International union of pharmacology committee on receptor nomenclature and drug classification. IX. Recommendations on terms and symbol in quantitative pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, v. 47, n. 2, p. 255-266, 1995.
97. JOHNSON, A.E. et al.  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -noradrenergic receptor binding in guinea pig brain: sex differences and effects of ovarian steroids. *Brain Res.*, v. 442, p. 205-213, 1988.
98. 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.*, v. 330, p. 193-202, 1985.
99. KALSNER, S. Steroid potentiation of response to sympathomimetic amine in aorta strips. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 36, p. 582-590, 1969a.
100. \_\_\_\_\_. Mechanism of hydrocortisone potentiation on responses to epinephrine and norepinephrine in rabbit aorta. *Circ. Res.*, v. 24, p. 383-395, 1969b.
101. KANO, T. Effects of estrogen and progesterone on adrenoceptors and cyclic nucleotides in rat uterus. *Japan. J. Pharmacol.*, v. 32, p. 535-549, 1982.
102. KANT, G.J. et al. Graded footshock stress elevates pituitary cyclic AMP and plasma  $\beta$ -endorphin,  $\beta$ -LPH, corticosterone and prolactin. *Life Sci.*, v. 33, n. 26, p. 2657-2663, 1983.
103. KASPRZAK, A., LESNIEWSKA, B., MALENDOWICZ, L.K. Sex differences in adrenocortical structure and function. XXI. The effects of gonadectomy and testosterone or estradiol replacement on mitotic activity of the rat adrenal cortex. *Exp. Clin. Endocrinol.*, v. 87, n. 1, p. 26-30, 1986.
104. KAUMANN, A.J. The  $\beta_1$ -adrenoceptor antagonist CGP20712A unmasks  $\beta_2$ -adrenoceptors activated by (-)-adrenaline in rat sinoatrial node. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 332, p. 406-409, 1986.
105. KENAKIN, T.P. The Schild regression in the process of receptor classification. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v. 60, p. 249-265, 1982.

106. KENAKIN, T. P. The classification of drugs and drugs receptors in isolated tissues. *Pharmacol. Rev.*, v. 36, p.165-222, 1984.
107. KIELY, J. et al. Glucocorticoids down-regulate  $\beta_1$ -adrenergic-receptor expression by suppressing transcription of the receptor gene. *Biochem. J.*, v. 302, p. 397-403, 1994.
108. KITAY, J.I. Sex differences in adrenal cortical secretion in the rat. *Endocrinology*, v. 68, n. 5, p. 818-824, May 1961.
109. KLANGKALYA, B., CHAN, A. The effects of ovarian hormones on beta-adrenergic and muscarinic receptor in rat heart. *Life Sci.*, v. 42, n. 23, p. 2307-2314, 1988.
110. KOBILKA, B.K. et al. Chimeric  $\alpha_2$ -,  $\beta_2$ -adrenergic receptors: delineation of domains involved in effector coupling and ligand binding specificity. *Science*, v. 240, p. 1310-1316, June 1988.
111. KRALL, J.F. et al. Demonstration of adrenergic catecholamine receptors in rat myometrium and their regulation by sex steroid hormones. *Life Sci.*, v. 23, n. 10, p. 1073-1082, 1978.
112. KRULICH, L. et al. The effects of acute stress on the secretion of LH, FSH, prolactin and GH in the normal male rat, with comments on their statistical evaluation. *Neuroendocrinology*, v. 16, p. 293-311, 1974.
113. LANDS, A.M., LUDUENA, F.P., BUZZO, H.J. Differentiation of receptor responsiveness to isoproterenol. *Life Sci.*, v. 6, n. 21, p. 2241-2249, 1967a.
114. \_\_\_\_\_. et al. Differentiation of receptors systems activated by sympatominetic amines. *Nature*, v. 241, p. 597-598, 1967b.
115. LANGER, S.Z. Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochem. Pharmacol.*, v. 23, p. 1793-1800, 1974.
116. \_\_\_\_\_. et al. The role of the alpha-receptors in regulating noradrenaline overflow by nerve stimulation. *Proc. Int. Union Physiol. Sci.*, v. 9, p. 335, 1971.

117. LEFKOWITZ, R.J. et al. Mechanisms of hormone-receptor effector coupling : the beta-adrenergic receptor and adenylate-cyclase. *Fed. Proc.*, v. 41, p. 2664-670, 1982.
118. \_\_\_\_\_, HAUSDORFF, W.P., CARON, M. C. Role of phosphorylation in desensitization of the  $\beta$ -adrenoceptor. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 11, p. 190-194, May 1990.
119. LESCOAT, G. et al. Influence de sexe sur les modalités de reponse de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrealien aux agressions emotionelles et somatiques chez le rat. *Comp. Rend. Soc. Biol.*, v. 164, p. 2106-2113, 1970.
120. LEVIN, R.M., SHOFER, F.S., WEIN, A.J. Estrogen-induced alterations in the autonomic responses of the rabbit urinary bladder. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 215, n. 3, p. 614-618, 1980.
121. LEVY, B. The adrenergic blocking activity of N-tert-butylmethoxamine (butoxamine). *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, v. 151, p. 413-22, 1966.
122. LIGHTMAN, S.L., IVERSEN, L.L. The role of uptake<sub>2</sub> in the extraneuronal metabolism of catecholamines in the isolated rat heart. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 37, p. 638-649, 1969.
123. LIMBIRD, L.E. GTP and Na<sup>+</sup> modulate receptor-adenyl cyclase coupling and receptor-mediated function. *Am. J. Physiol.*, v. 247, p. E59-E68, 1984.
124. LOHSE, M.J. Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1179, p. 171-188, 1993.
125. \_\_\_\_\_. et al. Multiple pathways of rapid  $\beta_2$ -adrenergic receptor desensitization: delineation with specific inhibitors. *J. Biol. Chem.*, v. 265, n. 6, p. 3202-3209, 1990a.
126. \_\_\_\_\_. et al.  $\beta$ -Arrestin: a protein that regulates  $\beta$ -adrenergic receptor function. *Science*, v. 248, p. 1547-1550, June 1990b.
127. \_\_\_\_\_. et al. Receptor-specific desensitization with purified proteins. *J. Biol. Chem.*, v. 267, n. 12, p. 8558-8564, 1992.

128. LUGER, A. et al. Hormonal responses to the stress of exercise. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 245, p. 273-280, 1988.
129. MA, Z.Q. et al. Estrogen modulation of catecholamine synthesis and monoamine oxidase A activity in the human neuroblastoma cell line SK-ER3. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.*, v. 47, n. 1-6, p. 207-211, 1993.
130. MACKAY, D. How should values of  $pA_2$  and affinity constants for pharmacological competitive antagonists be estimated?. *J. Pharmac. Pharmacol.*, v. 30, p. 312-313, 1978.
131. MacNIVEN, E., De CATANZARO, D., YOUNGLAI, E.V. Chronic stress increases estrogen and other steroids in inseminated rats. *Physiol. Behav.*, v. 52, n. 1, p. 159-162, 1992.
132. MAGGI, A., ZUCCHI, I., PEREZ, J. Progesterone in brain: modulation of  $\beta$ -adrenergic receptor activity. *Pharmacol. Res. Commun.*, v. 17, n. 3, p. 283-291, 1985.
133. MAK, J.C.W., NISHIKAWA, M., BARNES, P.J. Glucocorticosteroids increase  $\beta_2$ -adrenergic receptor transcription in human lung. *Am. J. Physiol.*, v. 268, p. L41-L46, 1995.
134. MALENDOWICZ, L.K. Sex differences in adrenocortical structure and function. III. The effects of postpubertal gonadectomy and gonadal hormone replacement on adrenal cholesterol sidechain cleavage activity and on steroid biosynthesis by rat adrenal homogenates. *Endocrinology*, v. 67, p. 26-35, 1976.
135. MANO, K., AKBARZADEH, A., TOWNLEY, R.G. Effect of hydrocortisone on beta-adrenergic receptors in lung membranes. *Life Sci.*, v. 25, n.22, p. 1925-1930, 1979.
136. MARCONDES, F.K. *Influência do sexo e das fases do ciclo estral sobre a reação de estresse em ratos*. Tese (Mestrado em Fisiologia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 1995. 58p.

137. MARCONDES, F.K., SPADARI, R.C. Níveis plasmáticos de corticosterona em ratos e ratas submetidas à natação. In: REUNIÃO DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 8., 1993, Caxambu. *Anais...* Caxambu: FESBE, 1993. p. 131.
138. \_\_\_\_\_, SPADARI-BRATFISCH, R.C. Influence of the cycle on the hormonal response to stress. LATIN AMERICAN SYMPOSIUM ON CHRONOBIOLOGY, 3., 1995, Caraguatatuba. *Anais...* Caraguatatuba, 1995. p. 80.
139. MARPLES, D.N. et al. Endocrine responses of stress susceptible and stress resistant swine to environmental stressors. *J. Anim. Sci.*, v. 35, n. 3, p. 576-579, 1972.
140. MASON, J.W. A review of psychoendocrine research on the pituitary-adrenal cortical system. *Psychosom. Med.*, v. 30, p. 576-607, 1968a.
141. \_\_\_\_\_. A review of psychoendocrine research on the pituitary-adrenal cortical system. *Psychosom. Med.*, v. 30, p. 631-653, 1968b.
142. McPHERSON, G.A., MOLENAAR, P., MALTA, E. The affinity and efficacy of naturally occurring catecholamines at  $\beta$ -adrenoceptor subtypes. *J. Pharmac. Pharmacol.*, v. 37, p. 499-501, 1985.
143. MILLS, F.J., CHIR, B. The endocrinology of stress. *Aviat. Space Environ. Med.*, v. 56, p. 642-650, July 1985.
144. MILNOR, W.R. Limitations of schild plot in a two-receptor system: Alpha adrenoceptors of vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, v. 238, n. 1, p. 237-241, 1986.
145. MINNEMAN, K.P., MOLINOFF, P.B. Classification and quantification of beta adrenergic receptor interactions: I. Determination of the properties of receptors subtypes. *Life Sci.*, v. 29, p. 427-443, 1980.
146. \_\_\_\_\_, HEGSTRAND, L.R., MOLINOFF, P.B. Simultaneous of determination of  $\beta$ -1 and  $\beta$ -2 adrenergic receptors in tissues containing both receptor subtypes. *Mol. Pharmacol.*, v. 16, p. 36-46, 1979.

147. MOQUILESWSKY, M., PHILIBERT, D. RU-38486: a potent antiglucocorticoid activity correlated with strong binding to the cytosolic glucocorticoid receptor followed by an impaired activation. *J. Steroid Biochem.*, v. 20, p. 271-276, 1984.
148. NAFTOLIN, F., BROWN-GRANT, K., CORKER, C.S. Plasma and pituitary luteinizing hormone and peripheral plasma oestradiol concentrations in the normal oestrus cycle of the rat and after experimental manipulation of the cycle. *J. Endocr.*, v. 53, p. 17-30, 1972.
149. NATELSON, B.H. et al. Humoral indices of stress in rats. *Physiol. Behav.*, v. 26, p. 1049-1054, 1981.
150. NEQUIN, L.G., ALVAREZ, J., SCHWARTZ, N.B. Measurement of serum steroid and gonadotropin levels and uterine and ovarian variables throughout 4 day and 5 day estrous cycle in the rat. *Biol. Reprod.*, v. 20, p. 659-670, 1979.
151. NICOL, C.J.M., RAE, R.M. Inhibition of accumulation of adrenaline and noradrenaline in arterial smooth muscle by steroids. *Brit. Pharmacol. Soc.*, v. 44, n. 2, p. 361p-362p, 1972.
152. NORRIS, J.S. et al. Glucocorticoid induction of  $\beta$ -adrenergic receptors in the DDT<sub>1</sub>MF-2 smooth muscle cell line involves synthesis of new receptor. *Molec. Cell. Biochem.*, v. 74, p. 21-27, 1987.
153. NOURANI, F.R.R., SPADARI, R.C., DE MORAES, S. Footshock stress-induced supersensitivity to isoprenaline in the isolated pacemaker of the rat: effects of the compounds RU-38486 and RU-28362. *Gen. Pharmacol.*, v. 23, n. 4, p. 787-791, 1992.
154. O'DONNELL, S.R., WANSTALL, J.C. Responses to the  $\beta_2$ -selective agonist procaterol of vascular and atrial preparations with different functional  $\beta$ -adrenoceptor populations. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 84, p. 227-235, 1985.

155. OTTENWELLER, J.E. et al. A chronic stress state in rats: effects of repeated stress on basal corticosterone and behavior. *Physiol. & Behav.*, v. 51, n. 4, p. 689-698, 1992.
156. PARÉ, W.P., REDEL E. Sex differences and stress response of WKY rats. *Physiol. Behav.*, v. 54, n. 6, p. 1179-1185, 1993.
157. PETITTI, N., KARKANIAS, G.B., ETGEN, A.M. Estradiol selectively regulates  $\alpha_{1B}$ -noradrenergic receptors in the hypothalamus and preoptic area. *The Journal of Neuroscience*, v. 12, n. 10, p. 3869-3876, 1992.
158. PHYLLIPS, J.G., POOLSANGUAN, W. A method to study temporal changes in adrenal activity in relation to sexual status in the female laboratory rat. *J. Endocr.*, v. 77, p. 283-291, 1978.
159. PIPPIG, S. et al. Overexpression of  $\beta$ -arrestin and  $\beta$ -adrenergic receptor kinase augment desensitization of  $\beta_2$ -adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.*, v. 268, n. 5, p. 3201-3208, 1993.
160. PITCHER, J.A. et al. Role of  $\beta\gamma$  subunits of G proteins in targeting the  $\beta$ -adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science*, v. 257, p. 1264-1267, Aug. 1992.
161. POLLARD, I. et al. Plasma glucocorticoid elevation and desynchronization to sexual status in the female laboratory rat. *Behav. Biol.*, v. 14, p. 103-108, 1975.
162. RAPS, D., BARTHE, P.L., DESAULLES, P.A. Plasma and adrenal corticosterone levels during the different phases of the sexual cycle in the female rat. *Experientia*, v. 27, p. 339-340, 1971.
163. RIEGLE, G.D. Chronic stress effects on adrenocortical responsiveness in young and aged rats. *Neuroendocrinology*, v. 11, p. 1-10, 1973.
164. ROBERTS, J.M. et al.  $\alpha$  adrenoceptors but not  $\beta$  adrenoceptors increase in rabbit uterus with oestrogen. *Nature*, v. 270, p. 624-625, 1977.
165. \_\_\_\_\_. et al. Estrogen treatment decreases  $\alpha$ -adrenergic binding sites on rabbit platelets. *Endocrinology*, v. 104, n. 3, p. 722-728, 1979.

166. ROBERTS, J.M., INSEL, P.A., GOLDFIEN, A. Regulation of myometrial adrenoceptors and adrenergic response by sex steroids. *Mol. Pharmacol.*, v. 20, p. 52-58, 1981.
167. RODRIGUES, M.L.V., MARCONDES, F.K., SPADARI-BRATFISCH, R.C., Relationship among sensitivity to adrenaline, plasma corticosterone level, and estrous cycle in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v. 73, p. 602-607, 1995.
168. \_\_\_\_\_, MOURA, M.J.C.S., SPADARI, R.C. Níveis plasmáticos de corticosterona em ratas submetidas à natação. In: REUNIÃO DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 7., 1992, Caxambu. *Anais...* Caxambu: FESBE, 1992. p. 179.
169. ROSEWICZ, S. et al. Mechanism of glucocorticoid receptor down-regulation by glucocorticoids. *J. Biol. Chem.*, v. 263, n. 6, p. 2581-2584, 1988.
170. SAARIKOSKI, S. Effect of oestrogens and progesterone on the metabolic inactivation of noradrenaline in the human placenta. *Placenta*, v. 9, p. 507-512, 1988.
171. SALT, P.J. Inhibition of noradrenaline uptake<sub>2</sub> in the isolated rat heart by steroids, clonidine and methoxylated phenylethylamines. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 20, p. 329-340, 1972.
172. SANO, M. et al. Non-homogeneous distribution of  $\beta_1$  and  $\beta_2$ -adrenoceptors in various human tissues. *Life Sci.*, v. 52, n. 12, p. 1063-1070, 1993.
173. SAPOLSKY, R.M. Stress in the wild. *Scientific American*, p. 106-113, Jan. 1990.
174. SCARPACE, P.J. et al. Desensitization and resensitization of  $\beta$ -adrenergic receptors in a smooth muscle cell line. *Molec. Pharmacol.*, v. 28, p. 495-501, 1985.
175. SCHILD, H.O. pAy and competitive drug antagonism. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 2, p. 185-206, 1947.

176. SEGGIE, J., BROWN, G.M. Stress response patterns of plasma corticosterone, prolactin and growth hormone in rat, following handling or exposure to novel environment. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v. 53, p. 629-637, 1975.
177. SELYE, H.A. Syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, v. 138, n. 1, p. 32, 1936.
178. SHAIKH, A.A., SHAIKH, S.A. Adrenal and ovarian steroid secretion in the rat estrous cycle temporally related to gonadotropins and steroid levels found in peripheral plasma. *Endocrinology*, v. 96, n. 1, p. 37-44, 1975.
179. SHORE, P.A. Transport and storage of biogenic amines. *Ann. Rev. Pharmacol.*, v. 12, p. 209-226, 1972.
180. SIBLEY, D.R., LEFKOWITZ, R.J. Molecular mechanisms of receptor desensitization using the  $\beta$ -adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase system as a model. *Nature*, v. 317, p. 124-129, 1985.
181. SLOTKIN, T.A., BAREIS, D.L. Uptake of catecholamines by storage vesicles. *Pharmacology*, v. 21, p. 109-122, 1980.
182. SMITH, E.R., BOWERS, C.Y., DAVIDSON, J.M. Circulating levels of plasma gonadotropins in 4- and 5- day cycling rats. *Endocrinology*, v. 93, n. 3, p. 756-58, 1973.
2183. SNEDECOR, G.W., COCHRAN, N.G. *Statistical Methods*. 6. ed. Ames: The Iowa State University Press, 1967.
184. SPADARI, R.C. *Sensibilidade às catecolaminas no átrio direito isolado de ratos submetidos à natação : o papel da corticosterona*. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 1985. 58 p.
185. \_\_\_\_\_, DE MORAES, S. Repeated swimming stress and responsiveness of the isolated rat pacemaker to the chronotropic effect of noradrenaline and isoprenaline: role of adrenal corticosteroids. *Gen. Pharmacol.*, v. 19, n. 4, p. 553-557. 1988.

186. SPADARI, R.C., BASSANI, R.A., DE MORAES, S. Supersensitivity to isoprenaline and epinephrine in right atria isolated from rats submitted to a single swimming session. *Gen. Pharmacol.*, v. 19, n. 1, p. 129-135. 1988.
187. STILES, G.L., CARON, M.G., LEFKOWITZ, R.J.  $\beta$ -adrenergic receptors: biochemical mechanisms and physiological regulation. *Physiol. Rev.*, v. 64, n. 2, p. 661-743, 1984.
188. \_\_\_\_\_, LEFKOWITZ, R.J. Cardiac adrenergic receptors. *Ann. Rev. Med.*, v. 35, p. 149-164, 1984.
189. STONE, E.A. Reduction by stress of norepinephrine-stimulated accumulation of cyclic AMP in rat cerebral cortex. *Journal of Neurochemistry*, v. 32, p. 1335-1337, 1979.
190. \_\_\_\_\_. Mechanism of stress-induced subsensitivity to norepinephrine. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 14, n. 5, p. 719-723, 1981.
191. STRADER, C.D., SIGAL, I.S., DIXON, R.A.F. Structural basis of  $\beta$ -adrenergic receptor function. *FASEB J.*, v. 3, p. 1825-1832, 1989.
192. STROSBURG, A.D. Structural and functional diversity of  $\beta$ -adrenergic receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 757, p. 253-260, 1995.
193. STUMPF, W.E., SAR, M. The heart: a target organ for estradiol. *Science*, v. 196, p. 319-320, 1977.
194. SUDHA, S., PRADHAN, N. Behavioral consequences of predictable vs. unpredictable shocks in rats. *Physiol. Behav.*, v. 54, n. 2, p. 243-247, 1993.
195. TORRELLAS, A. et al. Adrenal hormones and brain catecholamines responses to morning and afternoon immobilization stress in rats. *Physiol. Behav.*, v. 26, n. 1, p. 129-133. 1981.
196. TOTA, M.R. et al. Biophysical and genetic analysis of the ligand-binding site of the  $\beta$ -adrenoceptor. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 12, p. 4-6, 1991.
197. TRENDELENBURG, U. Supersensitivity and subsensitivity to sympathomimetic amines. *Pharmacol. Rev.*, v. 45, p. 225-276, 1963.

198. TRENDELENBURG, U. I. Mechanisms of supersensitivity and subsensitivity to sympathomimetic amines. *Pharmacol. Rev.*, v. 18, n. 1, p. 629-640, 1966.
199. \_\_\_\_\_. Extraneuronal uptake and metabolism of catecholamines as a site of loss. *Life Sci.*, v. 22, n. 13/15, p. 1217-1222, 1978.
200. \_\_\_\_\_. The interaction of transport mechanisms and intracellular enzymes in metabolizing systems. *J. Neural Transm.*, v. 32, p. 3-18, 1990. [Suppl.].
201. \_\_\_\_\_. Functional aspects of the neuronal uptake of noradrenaline. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 12, p. 334-337, 1991.
202. \_\_\_\_\_, GRAEFE, K.H. Supersensitivity to catecholamines after impairment of extraneuronal uptake or catechol-O-methyl transferase. *Fed. Proc.*, v. 34, n. 10, p. 1971-1974, 1975.
203. VAN de KAR, L.D., RICHARDSON-MORTON, K.D., RITTENHOUSE, P.A. Stress: neuroendocrine and pharmacological mechanisms. *Methods Achiev. Exp. Pathol.*, v. 14, p. 133-173, 1991.
204. VAN ROSSUM, J.M. Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. *Arch. Inter. Pharmacodyn.*, v. 143, n. 3-4, p. 229-330, 1963.
205. VIAU, V., MEANEY, M.J. Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. *Endocrinology*, v. 129, n. 5, p. 2503-2511, 1991.
206. VOGEL, W.H., JENSH, R. Chronic stress and plasma catecholamines and corticosterone levels in male rats. *Neurosc. Lett.*, v. 87, p. 183-188, 1988.
207. WAGNER, H.R., CRUTCHER, K.A., DAVIS, J.N. Chronic estrogen treatment decreases  $\beta$ -adrenergic responses in rat cerebral cortex. *Brain Res.*, v. 171, p. 147-151, 1979.

208. WILKINSON, M. et al. Radioligand binding studies on hypothalamic noradrenergic receptors during the estrous cycle or after steroid injection in ovariectomized rats. *Brain Res.*, v. 168, p. 652-655, 1979.
209. WILLIAMS, L.T. et al. Thyroid hormone regulation of  $\beta$ -adrenergic receptor number. *J. Biol. Chem.*, v. 252, n. 8, p. 2787-2789, 1977.
210. YARDEN, Y. et al. The avian  $\beta$ -adrenergic receptor: primary structure and membrane topology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 83, p. 6795-6799, 1986.
211. YOSHINAGA, K., HAWKINS, R.A., STOCKER, J.F. Estrogen secretion by the rat ovary in vivo during the estrous cycle and pregnancy. *Endocrinology*, v. 85, p. 103-112, 1969.
212. YOUDIM, M.B.H. et al. Steroid regulation of monoamine oxidase activity in the adrenal medulla. *FASEB J.*, v. 3, p. 1753-1759, 1989.
213. ZAR, J. H. *Biostatistical analysis*. 2. ed. New Jersey EUA: Prentice-Hall International, 1984.
214. ZHOU, X.M., FISHMAN, P.H. Desensitization of the human  $\beta_1$ -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.*, v. 266, n. 12, p. 7462-7468, 1991.
215. ZOLOVICK, A.J. et al. Monoamine oxidase activity in various parts of the rat brain during the estrous cycle. *Science*, v. 154, p. 649, 1966.