

Universidade Estadual de Campinas

Rita de Cássia Ferreira

Influência do ciclo estral na resposta lipolítica a agentes adrenérgicos

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Mestre em
Biologia Funcional e Molecular na área de
Fisiologia

Orientadora: Prof^a D^{ra} Regina Célia Spadari-Bratfisch

Co-orientadora: Prof^a D^{ra} Dora Maria Grassi-Kassisse

Campinas – SP
2001

Este exemplar corresponde à redação fi
da tese defendida pelo (a) candidato
Rita de Cássia Ferreira
e aprovada pela Comissão Julgadora.

27/06/2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	Bc
N.º CHAMADA	T/UNICAMP
	F413i
V.	Ex.
TOMBO BC	46408
PROC.	16-392/61
C	☐
D	☒
PRECOS	R\$ 11,00
DATA	18/09/07
N.º CPD	

CM00159585-5

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Ferreira, Rita de Cássia

F413i Influência do ciclo estral na resposta lipolítica a agentes adrenérgicos/Rita de Cássia Ferreira. --Campinas-SP. [s.n.], 2001.

46f. Ilus.

Orientadora: Regina Célia Spadari-Bratfisch

Co-Orientadora: Dora Maria Grassi-Kassisse

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

• Receptores adrenérgicos. 2. Fêmeas. 3. Tecido adiposo. 4. Ciclo Sexual. I. Spadari-Bratfisch, Regina Célia. II. Grassi-Kassisse, Dora Maria. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Data da Defesa: 27/06/2001

BANCA EXAMINADORA

Profª D^{ra} Regina Célia Spadari-Bratfisch (Orientadora)

.....
Regina Célia Spadari-Bratfisch

Profª D^{ra} Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

.....
Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Profª D^{ra} Fernanda Klein Marcondes

.....
Fernanda Klein Marcondes

Prof Dr Luiz Carlos Marques Vanderlei

.....

“ O importante não é estar aqui ou ali, mas ser.
Ser é uma ciência dedicada.
Feita de pequenas grandes observações do
cotidiano,
dentro e fora da gente.
Se não executarmos estas observações,
não chegamos a ser, apenas estamos e
desaparecemos.”

Carlos Drumond de Andrade

A DEUS

“Senhor sempre pensei que optar fosse apenas escolher.

Escolher entre dois objetos, duas pessoas, entre duas coisas
de igual valor ou semelhantes.

Mas a vida foi ensinando...

Optar é acima de tudo, renunciar.

E quantas vezes esta renúncia fica doendo, pedindo,
arrancando lágrimas, plantando saudade...

Viver é optar.

Optar sempre, renunciar a cada momento.

Recebe, Senhor, ao cair desta tarde, meu ofertório de
renúncias doidas e a esperança viva que traça nos olhos,
a cada opção consciente e generosa que procuro
realizar por tua causa.

Senhor, no amanhã sempre existe algo que até hoje
não se dimensionou.

Por isso, sou hoje mais feliz do que ontem, e amanhã,
tenho certeza, serei mais feliz do que hoje”.

Aos meus Pais

Antonio Alves Ferreira e

Rosa Maria Sorce Ferreira

“De vocês recebi o dom mais precioso do universo – a vida. Já por isso, seria infinitamente grata, mas vocês não se contentaram em presentear-me com ela; revestiram minha existência de amor, carinho e dedicação. Vocês não foram só amigos, mas companheiros. Mesmo na hora em que meus ideais pareciam distantes e inatingíveis, vocês me incentivaram a prosseguir... Hoje, procuro entre as palavras aquela que gostaria que seus corações ouvissem do meu. E só encontro um simples e sincero obrigado. Amo vocês!”

Às Professoras

D^{ra} Regina Célia Spadari-Bratfisch

D^{ra} Dora Maria Grassi-Kassisse

“É inútil tentar resumir certos indivíduos,
só se pode mesmo segui-los”.

Aos professores

D^{ra} Isaura Maria Mesquita Prado

Dr Eduardo Fernandes Bondan

“Há pessoas que passam por este mundo e deles pouco se fica conhecendo. Vivem sua vida, mas não deixam rastros. Outros, queiram ou não, consciente ou inconsciente, vão deixando as marcas que os identificam, os traços que perpetuam seu nome e os tornam inconfundíveis.”

AGRADECIMENTOS

Minha admiração, meu agradecimento pelo apoio e pelo carinho da amizade, pela generosidade e grandeza da alma de minhas irmãs, **Zana e Guiga**.

Aos meus avós **Aristides e Isabel** (*in memoriam*) que sempre tiveram como objetivo o meu sorriso.

À **Maria Esméria Corezola do Amaral**, minha admiração pelo caráter e meu agradecimento pela boa vontade com que sempre me atendeu e ajudou, pela amizade e pelo carinho.

À **Heloísa e Patrícia Mattiazzi, Zuleica e Felipe Iglesias de Lima** pela amizade, pelo carinho, confiança, incentivo, companheirismo, cumplicidade, choros e risos... Zú, saudades... Helô, lhe agradeço imensamente pela ajuda!

Aos amigos

Valéria Wolf Nunes, Alexandre Marcucci Miotto, Iraídes Nunes dos Santos, Josiane Lombardi Verago, Elisângela Farias Silva, Marília Mantovani, André Luís Moura, Gustavo Enrigo, André, Regina, Denise, Ana Lúcia e Lucília Sartori, Neto, Zuca, Prof. Celso Leite Vilella, Prof. Dr. Alzido de Oliveira, Prof. Dr. Pedro Primo Bombonato, Cintia Lima Rossi e Silva, Ellen Maria Pestili de Almeida, Simone Zaninello, Kátia Vitorello, Rosiris Romero, Cristiana Bustamante, Mônica Jimena, Marcos Dalla Rosa, José Francisco da Costa, Maria de Fátima Vailatti, Augusto César Freitas de Souza, funcionários, alunos e professores do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da Unicamp, funcionários e professores do CREUPI e alunos da XX turma de Medicina Veterinária do CREUPI.

“Cada um que passa em nossa vida,
passa sozinho, pois cada pessoa é única
e nenhuma substitui a outra.

Cada um que passa em nossa vida,
passa sozinho, mas não vai só,
nem nos deixa só.

Leva um pouco de nós mesmos,
deixa um pouco de si mesmo.

Há os que levam muito, mas
não há os que não levam nada.

Há os que deixam muito, mas
não há os que não deixam nada.

Essa é a maior responsabilidade
de nossa vida e a prova
evidente que duas almas
não se encontram ao acaso.”

Um dia alguém falou que “o acaso é a vontade de Deus que Ele não quis assinar
embaixo”... A cada dia estou mais certa disto... Agradeço pela amizade.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS	10
MATERIAL E MÉTODOS	11
Animais	11
Preparo dos Adipócitos e Determinação da Lipólise.....	11
Medida Enzimática do Glicerol	13
Extração de Lipídeos	13
Drogas e Reagentes	14
Análise Estatística.....	14
RESULTADOS	15
DISCUSSÃO	26
CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc – adenosina monofosfato cíclico

ANOVA – análise de variância

ATP – adenosina trifosfato

COMT – catecol-orto-metil-transferase

d-AMPc – d-butilil- adenosina monofosfato cíclico

EPI – epinefrina

G_i – proteína G inibitória

G_s – proteína G estimulatória

HEPES – ácido (N-[2-Hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanosulfônico])

ISO – isoprenalina

KRBA – Krebs Ringer Bicarbonato adicionado de albumina

LHS – lipase hormônio sensível

MAO – mono amino oxidase

NOR – norepinefrina

pD₂ – logaritmo da concentração que produz 50% do efeito máximo

EPM – erro padrão da média

$\bar{x}$ – média

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peso do tecido adiposo e lipólise basal de adipócitos perigonadais isolados de ratas em cada fase do ciclo estral	18
Tabela 2. Valores pD_2 e de resposta lipolítica máxima para diferentes agonistas de adrenoreceptores em adipócitos perigonadais isolados de ratas em diferentes fases do ciclo estral.....	19

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Lipólise induzida pelo d-butilil-AMPC (1mM) em adipócitos perigonadais isolados de ratas nas diferentes fases do ciclo estral..... 20
- Figura 2. Resposta lipolítica máxima após incubação por 60 min com 10 μ M de isoprenalina (ISO), norepinefrina (NOR) e BRL37344 (BRL) e 1mM de epinefrina (EPI) em adipócitos isolados do tecido perigonadal de ratas nas diferentes fases do ciclo estral..... 21
- Figura 3. Resposta lipolítica máxima após incubação com 10 μ M de isoprenalina (ISO), norepinefrina (NOR) e BRL37344 e 1 mM de epinefrina (EPI) em adipócitos isolados do tecido adiposo perigonadal de ratas sacrificadas nas diferentes fases do ciclo estral..... 22
- Figura 4. Curvas concentração-efeito aos agonistas de adrenoceptores BRL37344, isoprenalina, norepinefrina e epinefrina em adipócitos isolados do tecido adiposo perigonadal de ratas nas diferentes fases do ciclo estral..... 23
- Figura 5. Valores pD_2 do BRL37344, isoprenalina, norepinefrina e epinefrina em adipócitos do tecido adiposo perigonadal de ratas sacrificadas em cada uma das fases do ciclo estral..... 24
- Figura 6. Valores pD_2 do BRL37344, isoprenalina, norepinefrina e epinefrina em adipócitos isolados do tecido perigonadal de ratas sacrificadas em cada uma das fases do ciclo estral..... 25

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do ciclo estral sobre a resposta lipolítica a agonistas adrenérgicos em adipócitos perigonadais isolados de ratas.

Utilizamos ratas Wistar adultas, pesando entre 175 e 250 g. A determinação das fases do ciclo estral foi realizada diariamente por meio de lavado vaginal, durante oito dias consecutivos (dois ciclos), no mínimo. Após a identificação das fases do ciclo estral, os animais foram sacrificados e o tecido adiposo perigonadal foi removido e submetido à digestão, para isolamento das células adiposas utilizadas no ensaio.

Os grupos experimentais foram estabelecidos de acordo com as fases do ciclo estral e com os agonistas adrenérgicos utilizados. Não houve influência do ciclo estral sobre o peso do tecido adiposo perigonadal e sobre a lipólise basal, avaliada *in vitro*. Dos adipócitos foram obtidas curvas concentração-efeito à isoprenalina (ISO), norepinefrina (NOR), epinefrina (EPI) e BRL37344 (BRL). O efeito do d-butilil-cAMP (d-AMPc) também foi avaliado. A concentração de glicerol liberado no meio de incubação foi utilizada como índice de lipólise (μmol glicerol/100 mg lipídeos totais.60 min). As curvas foram comparadas por análise de variância, seguida de teste de Fisher. Diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

Durante o proestro, a lipólise estimulada pelo d-AMPc e o efeito lipolítico máximo dos agonistas de adrenoceptores BRL37344, isoprenalina, norepinefrina e

epinefrina foram menores do que nas outras fases do ciclo. A sensibilidade das células adiposas aos agonistas endógenos não seletivos, α e β -adrenérgicos, norepinefrina e epinefrina, apresentaram-se diminuídas apenas durante o proestro, sugerindo, uma maior participação do adrenoceptor α_2 nesta fase. Entretanto, as respostas máximas aos agonistas seletivos para receptores β -adrenérgicos, isoprenalina e BRL37344, foram menores durante o proestro e o metaestro em relação ao estro e diestro.

Nossos resultados obedecem à ordem de potências relativas propostas para agonistas β -adrenérgicos, exceto, na fase de metaestro, na qual a potência do BRL37344 foi menor em relação à isoprenalina e à norepinefrina.

Podemos concluir que, durante o ciclo estral de ratas ocorrem oscilações da resposta aos agonistas adrenérgicos refletindo a proporção da participação dos diferentes subtipos de adrenoceptores na resposta lipolítica de adipócitos perigonadais. Outro mecanismo envolvido com estas oscilações, compreende variações da sensibilidade da lipase hormônio sensível ao AMPc.

ABSTRACT

The aim of this thesis was to examine the lipolytic effect of adrenergic agonists in white perigonadal adipocytes isolated from rats in each phase of the estrous cycle.

Adult female Wistar rats (175-250 g) were used. The phases of the estrous cycle were determined from daily vaginal smears over at least eight consecutive days (two cycles). After identification of the estrous phase, the rats were killed and the perigonadal adipose tissue was removed and digested to isolate the adipocytes. The experimental groups were set up according to the phase of the estrous cycle and the agonists to be used. Concentration-response curves were obtained for isoprenaline (ISO), norepinephrine (NOR), epinephrine (EPI) and BRL37344 (BRL). The effect of d-butyryl-cAMP was also examined. The concentration of glycerol released into the incubating medium was used as an indicator of lipolysis ($\mu\text{mol glycerol}/100 \text{ mg of total lipids.h}$). The concentration-response curves were compared by ANOVA followed by Fisher's test. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

There was no variation in the weight of perigonadal adipose tissue during the four phases of the estrous cycle, nor was there any difference in the basal lipolysis of isolated adipocytes. The lipolysis stimulated by d-cAMP and the maximum lipolytic effect obtained with the various adrenoceptor agonists were lower in proestrous than in the other phase of the cycle. The sensitivity to the non-selective α - and β -adrenergic agonists norepinephrine and epinephrine was lower

only during proestrous, which suggested a greater role for α_2 -adrenoceptors in this phase. In contrast, the maximum responses for the β -adrenergic selective agonists, isoprenaline and BRL37344, were lower in proestrous and metaestrous. These results agree with the general relative potencies of β -adrenergic agonists, except in metaestrous, when the sensitivity to BRL37344 was lower than that to isoprenaline and norepinephrine.

These results show that there are oscillations in the sensitivity of perigonadal adipocytes to adrenergic agonists during the estrous cycle, with different subtypes predominating in each phase. There are also variations in the activity of the cAMP-sensitive lipase.

INTRODUÇÃO

A secreção cíclica das gonadotrofinas hipofisárias e dos esteróides ovarianos caracteriza os ciclos reprodutivos dos mamíferos que têm por finalidade a ovulação, processo pelo qual o óvulo é liberado pelo ovário e, se fecundado, dará origem a um ovo, que se desenvolverá em embrião. Em alguns animais, a ovulação é sazonal, ocorrendo uma vez por ano. Porém, animais poliestros, como a rata, apresentam vários ciclos reprodutivos ovulatórios anualmente (HOAR, 1975; HOUSSAY, 1980; FREEMAN, 1988).

O ciclo reprodutivo da rata é denominado de ciclo estral e apresenta duração média de 4 a 5 dias. É constituído de quatro fases, proestro, estro, metaestro e diestro, com duração média de 12-18h, 25-30h, 24-30h e 28-50h, respectivamente (YOUNG et al., 1941; MANDL, 1951; HOUSSAY, 1980; SMITH et al., 1973). Estas fases podem ser identificadas pelos tipos celulares que constituem o epitélio vaginal (LONG & EVANS, 1922; YOUNG et al., 1941; HOAR, 1975). A técnica de lavado vaginal é usada para identificar as fases do ciclo estral em roedores (DRICKAMER, 1987).

A ovulação ocorre no estro, quando a fêmea está receptiva ao macho. Se a fecundação não ocorrer, um corpo lúteo, pequeno e transitório, forma-se durante o metaestro e regride no diestro (HOAR, 1975). O útero, que se apresenta rosado e preenchido por fluidos durante o estro, torna-se fino e anêmico no diestro. Durante o proestro, novos folículos se formam e o útero novamente aumenta de volume em preparação para uma possível implantação durante o estro seguinte. As

alterações uterinas e do epitélio vaginal observadas ao longo do ciclo estral devem-se às ações dos esteróides sexuais nestes tecidos (HOAR, 1975).

Em ratas, as menores concentrações de estradiol são observadas durante o estro, ocorrendo aumento no metaestro para atingir o pico no proestro (BROWN-GRANT et al., 1970; NAFTOLIN et al., 1972; DUPON & KIN, 1973; BUTCHER et al., 1974; SHAIKI & SHAIKI, 1975; FREEMAN, 1988). Quanto à progesterona, ocorre um pico durante o metaestro e outro durante o proestro, sendo as menores concentrações observadas durante o diestro (BUTCHER et al., 1974; SMITH et al., 1975; NEQUIN et al., 1979; FREEMAN, 1988).

O ciclo estral e os esteróides sexuais influenciam também diversas funções orgânicas não diretamente relacionadas à reprodução. A temperatura retal de ratas, por exemplo, é maior durante o proestro do que durante o metaestro e o diestro, sendo que a progesterona parece estar relacionada a este efeito, ao elevar o ponto fixo hipotalâmico, e ativar mecanismos termogênicos periféricos, como tremor muscular (MARRONE et al., 1976).

Durante o proestro, houve aumento na resposta cronotrópica à adrenalina em relação ao estro e ao metaestro, em átrios direitos isolados de ratas normais (RODRIGUES et al., 1995). Em resposta ao estresse por três sessões de choques nas patas, aplicadas em dias consecutivos, durante o estro, metaestro e diestro houve subsensibilidade do átrio direito isolado às catecolaminas, sem alteração quando este protocolo foi aplicado durante o diestro, proestro e estro (MARCONDES et al., 1996; VANDERLEI et al., 1996). Portanto, em ratas o desenvolvimento de alterações da sensibilidade atrial às catecolaminas em

resposta a estímulos estressores depende da fase do ciclo estral (SPADARI-BRATFISH et al., 1999).

Em adipócitos isolados e, portanto, desprovidos de inervação, a metabolização de agonistas adrenérgicos se faz pela catecol-orto-metil-transferase (COMT), após captação pelas próprias células adiposas. Um dos principais inibidores endógenos deste processo é a corticosterona, já tendo sido demonstrado que, quando sua concentração plasmática está aumentada ocorre também aumento da sensibilidade às catecolaminas em outros tecidos (IVERSEN & SALT, 1970).

Não só a síntese, mas também a inativação das catecolaminas varia ao longo do ciclo reprodutivo. A atividade da enzima mono amino oxidase (MAO), que metaboliza a noradrenalina e a adrenalina em diferentes órgãos, sofre influência do ciclo estral. Nos ovários e nas adrenais, a atividade da MAO é mínima na noite entre o estro e o metaestro, e é alta no diestro; no útero, a atividade desta enzima atinge um pico no metaestro (HOLZBAUER & YODIM, 1973).

As catecolaminas interagem com receptores específicos, denominados adrenoceptores por ALQUIST (1948) que os identificou e classificou inicialmente nos tipos α e β . Estes tipos foram posteriormente, subdivididos em subtipos 1 e 2 (LANDS et al., 1967 a, b; LANGER, 1981). Atualmente, baseado em evidências farmacológicas e moleculares, tem-se a classificação em três tipos - α_1 , α_2 e β - sendo que cada um apresenta três subtipos (BYLUND et al., 1998).

Na década de 1980, o terceiro subtipo de β -adrenoceptor, designado β_3 , foi demonstrado em tecido adiposo humano (EMORINE et al., 1987; FRIELLE et al.,

1987; KOBILKA et al., 1987; EMORINE et al., 1989; ROSEMBAUN et al., 1993), em ratos (MACHIDA et al., 1990; GRANEEMAN et al., 1991; TAVERNIER et al., 1996; OHSAKA et al., 1998), em camundongos (NAHMIAS et al., 1991; PREITNER et al., 1998), e em outras espécies. E, na década seguinte, KAUMANN e colaboradores sugeriram a existência de um novo subtipo de adrenoceptor em miocárdio, que foi designado adrenoceptor β_4 . Este, uma vez estimulado, teria capacidade de mediar cardioestimulação em várias espécies (KAUMANN, 1989; KAUMANN, 1997).

A estrutura proteica do adrenoceptor β_4 ainda não é conhecida, mas os subtipos de adrenoceptores β_1 , β_2 e β_3 têm natureza proteica comum, embora apresentem especificidades estruturais e funcionais (BOWEN et al., 1992). Essas diferenças são dependentes do tecido onde se encontram, mesmo que no mesmo animal, e do estado funcional orgânico (MAURIÈGE et al., 1987; TAOUIS et al., 1987; TAOUIS et al., 1989; ARNER, 1992; LAFONTAN & BERLAN, 1993). Os quatro subtipos de adrenoceptores agem estimulando a adenilil ciclase e, conseqüentemente, aumentando a concentração intracelular de AMPc (adenosina monofosfato cíclico). A interação entre o receptor e a adenilil ciclase é mediada por uma proteína G_s (GILMAN, 1987). Embora a maioria dos autores tenha demonstrado que as ações do receptor β_2 adrenérgico seja mediada por uma proteína G_s , alguns autores propuseram que os receptores β_2 -adrenérgicos também podem se acoplar à proteína G_i (XIAO et al., 1995). Quando G_s é estimulada, esta ativa a enzima adenilil ciclase que aumenta a síntese intracelular de AMPc. Proteínas quinases dependentes de AMPc (PKA), quando ativadas em

adipócitos, fosforilam a lipase hormônio sensível que, por sua vez, catalisa a hidrólise dos triglicerídeos a ácidos graxos e glicerol (FAIN et al., 1983; LANGIN et al., 1996). Deste modo, alterações na quantidade de glicerol produzido podem refletir alterações da sensibilidade adrenérgica.

Os receptores α_2 -adrenérgicos, por outro lado, desencadeiam inibição da adenilil ciclase, devido à sua interação com proteína G_i . Desta forma, após ativação α_2 -adrenérgica, o estado de ativação de PKA diminui e, como consequência, a lipólise fica inibida (GALITZKY et al., 1993; LANGIN et al., 1996).

Estudos indicam que o tamanho do adipócito é um fator importante para demonstrar a atividade de adrenoceptores α_2 em adipócitos de hamsters, cães e ratos (CARPÉNÉ et al., 1983; TAOUIS et al., 1987; REBOURCET et al., 1988; CARPÉNÉ et al., 1990). Nenhuma atividade pode ser detectada em adipócitos pequenos, de animais jovens, mas atividade α_2 adrenérgica foi observada em adipócitos maiores, de animais adultos (CARPÉNÉ et al., 1983; TAOUIS et al., 1987). Foi também demonstrado que os esteróides sexuais desempenham um importante papel na expressão de adrenoceptores α_2 , induzindo um aumento na densidade destes receptores (PECQUERY et al., 1988; SAULNIER-BLACHE et al., 1992; BOULOUMIÉ et al., 1994).

Os principais reguladores da lipólise são as catecolaminas endógenas, ligando-se aos receptores α_2 , β_1 , β_2 e β_3 (CAREY, 1998). Os receptores α_2 estimulam a lipogênese, opondo-se ao efeito β -adrenérgico que é lipolítico (LAFONTAN et al., 1997). Ainda, a característica de inibição a partir do adrenoceptor α_2 depende do depósito de gordura considerado, provavelmente

devido a variações no número de receptores em cada depósito, sendo observado efeito lipogênico menos pronunciado em tecido adiposo omental do que em tecido subcutâneo (VIKMAN et al., 1996).

Além do clássico conhecimento do tecido adiposo como um local de armazenamento de lipídeos, DI GIROLAMO et al. (1992) demonstraram que este depósito é um importante sítio para a produção de lactato. Estes mesmos autores mostraram *in vitro*, que esta produção é modulada por mudanças nas concentrações de glicose, insulina e epinefrina. Neste mesmo ano, TORRES-MARQUES et al. (1992), demonstraram a presença de receptores adrenérgicos α_1 em adipócitos brancos de hamsters. Foi então que, em 1996, FAINTRENIE & GÉLOËN demonstraram que a ativação de α_1 está envolvida com a produção de lactato e, em 2000, que o subtipo envolvido é o α_{1b} (GRASSI-KASSISSE & GÉLOËN).

Os adrenoceptores sofrem sensibilização ou dessensibilização induzidas por agentes homólogos e heterólogos (LOHSE, 1993) sendo as catecolaminas e os glicocorticóides os principais agentes envolvidos na regulação destes processos (AXELROD & REISINE, 1984). Alterações de sensibilidade a agonistas adrenérgicos foram demonstradas em tecido adiposo de várias espécies animais, em diferentes estados fisiológicos (GIUDICELLI et al., 1979; CARPÉNÈ et al., 1990). O sistema de transdução de sinal adrenérgico em adipócitos brancos, regulando não apenas a lipólise, mas também as diferenças regionais no acúmulo de gordura subcutânea, o tamanho dos adipócitos, e a atividade lipolítica basal, é

modulado pelos hormônios sexuais, como foi demonstrado através de estudos com ratas castradas (GIUDICELLI et al., 1993; ELBERS et al., 1999).

O número de receptores β -adrenérgicos em útero de ratas é maior durante o estro e o proestro (KRALL et al., 1978). O tratamento com estradiol induz aumento no número de receptores α -adrenérgicos e supersensibilidade à noradrenalina em útero (ROBERTS et al., 1977; ROBERTS et al., 1981) e em bexiga de coelhas (LEVIN et al., 1980). A população de receptores β -adrenérgicos da glândula mamária de ratas também está sob controle dos hormônios ovarianos e da prolactina, o que sugere que as catecolaminas circulantes ou liberadas localmente poderiam interagir com os hormônios sexuais e a prolactina, regulando o crescimento, a diferenciação e a atividade desta glândula (MARCHETTI & LABRIE, 1990).

Esteróides sexuais alteram a resposta β -adrenérgica *in vitro*, por ação direta sobre células musculares lisas do endométrio de coelhas, inibindo a atividade da adenilil ciclase (BOULET & FORTIER, 1987).

Os hormônios femininos, em concentrações fisiológicas, modulam negativamente o efeito de estimulação β -adrenérgica cardíaca, por inibirem o aumento intracelular da síntese de AMPc que se seguiria à ativação da adenilil ciclase pelo receptor ocupado (LI et al., 2000).

A lipase hormônio sensível (LHS) é uma enzima responsável pela hidrólise de triglicerídeos em adipócitos de mamíferos, resultando na liberação de ácidos graxos não esterificados e glicerol (SLAVIN et al., 1994; CAREY, 1998; LARGE et al., 1998). A lipase hormônio sensível é inibida pela insulina, adenosina,

prostaglandinas e catecolaminas (via ativação de adrenoceptor α_2), e ativada por agentes que promovam um aumento das concentrações intracelulares de AMPc, como, por exemplo, as catecolaminas via adrenoceptores β (LARGE et al., 1998).

Ainda, segundo MARSDEN et al. (1996), em mulheres ocorre redução da capacidade ligante da insulina ao seu receptor na fase lútea do ciclo menstrual, o que implicaria em maior ativação da enzima lipase hormônio sensível.

Alterações nas concentrações de progesterona e ou de estradiol estão relacionados às alterações de sensibilidade adrenérgica do marcapasso cardíaco de ratas submetidas a estresse e sacrificadas na fase de diestro (MARCONDES et al., 1996). Estes hormônios, interagindo com seus respectivos receptores intracelulares, poderiam ativar ou inibir genes responsáveis pela síntese de proteínas, entre as quais, receptores de membrana e, entre estes, os adrenoceptores (BEATO, 1989; MALAYER & GORSKI, 1993).

Estudos realizados por PEDERSEN et al. (1996), identificaram na espécie humana receptores para estrogênios, glicocorticóides e andrógenos em adipócitos maduros de indivíduos de ambos os sexos, os quais, entretanto, não apresentam receptores para progesterona. KOTWICA et al. (1991) e KOTWICA & BOGACKI (1999) apontam que a inervação adrenérgica sobre o ovário afeta o corpo lúteo, em sua função de secreção, em muitas espécies, e que, em bovinos, a estimulação beta adrenérgica, no corpo lúteo, garante a secreção basal de progesterona.

Em adipócitos estão presentes pelo menos três subtipos de receptores β -adrenérgicos estimulando a lipólise, e um subtipo de receptor α_2 -adrenérgico que,

juntamente com os receptores de insulina inibem a lipólise. Estes receptores parecem ter a sua função modulada por outros agentes endócrinos, sugerindo um processo de sinalização adrenérgica nas células adiposas baseado na variação da sensibilidade dos diferentes tipos e subtipos de receptores, e no seu recrutamento diferenciado.

Considerando que, em fêmeas, a concentração de hormônios sexuais varia de acordo com as fases do ciclo estral e que já foram demonstradas alterações de sensibilidade às catecolaminas em tecido cardíaco de ratas durante o ciclo estral (RODRIGUES et al., 1995), o objetivo deste trabalho foi verificar se ocorrem variações de sensibilidade ao efeito lipolítico de agentes adrenérgicos em adipócitos isolados de ratas sacrificadas em cada uma das fases do ciclo estral.

OBJETIVOS

Verificar a ocorrência de variações de sensibilidade ao efeito lipolítico de agentes adrenérgicos em adipócitos perigonadais isolados de ratas sacrificadas em diferentes fases do ciclo estral.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), adultas, pesando entre 175 e 250 g. Estes animais foram mantidos em gaiolas coletivas, em sala climatizada (22°C), com ciclo claro-escuro de 12 em 12 horas (luzes acendendo às 6:30 h). Receberam, durante todo o período, água e ração à vontade.

As fases do ciclo estral foram determinadas diariamente às 8:00 h, por meio de lavado vaginal durante oito dias consecutivos (dois ciclos) no mínimo. Foram desprezadas as ratas que apresentaram ciclos irregulares, caracterizados por ausência ou permanência em uma das fases além do período normal. As ratas apresentando ciclos de 4 dias (proestro, estro, metaestro e diestro) foram utilizadas de acordo com os princípios para uso de animais em pesquisa e educação, segundo Declaração de Princípios aceitos pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas sob nº 057 – 1.

Preparo dos adipócitos e determinação da lipólise

Depois da determinação das fases do ciclo estral, os animais foram sacrificados por um golpe na cabeça, seguido de secção dos vasos cervicais e o

tecido adiposo branco perigonadal foi imediatamente removido. A atividade lipolítica foi analisada em células adiposas isoladas de acordo com o método de RODBELL (1964), modificado. Foi utilizado Tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRBA) contendo albumina bovina (3%), HEPES e glicose (6 mM), ajustado para pH 7,4 com NaOH 1 M. Depois de incubação em KRBA, por 45 min, a 37°C, ao qual foi adicionada collagenase (1 mg/mL) para promover a digestão do tecido, o material foi submetido à filtração e lavagens sucessivas, com o objetivo de eliminar a collagenase e separar as células adiposas. Preparou-se uma suspensão celular a 10%, 500 μ L desta suspensão celular e 500 μ L de tampão foram incubados em tubos de polietileno. A cada tubo foram adicionados 10 μ L do agente farmacológico, com concentrações que variavam entre 10 pM e 1 mM, em escala logarítmica. Estes tubos foram incubados, em duplicata, por 60 minutos em banho-maria a 37°C, sob agitação constante de 60 ciclos por minuto. A adição dos fármacos definiu o início dos ensaios. Foram incubados dois tubos aos quais não foi adicionado o fármaco e sua leitura foi considerada como lipólise basal.

Após 60 minutos de incubação com os agonistas, os tubos foram colocados em gelo, para interromper a reação, e alíquotas de 200 μ L do meio de incubação infranadante foram utilizadas para a determinação enzimática do glicerol liberado no meio de incubação (WEILAND, 1957), o que foi utilizado como índice de lipólise. A avaliação dos lipídeos totais foi realizada gravimetricamente, após a extração (DOLE & MEINERTZ, 1960) e, o valor obtido foi utilizado para normalização dos valores de glicerol liberado no meio de incubação em cada experimento.

Curvas concentração-efeito para os agonistas foram obtidas e a concentração de agonista induzindo 50% da lipólise máxima (EC_{50}) foi calculada para cada curva, e expressa como pD_2 ($-\log EC_{50}$).

Medida enzimática do glicerol

A medida do glicerol foi realizada enzimaticamente, segundo método de WEILAND (1957). O princípio da reação é o que segue:

O glicerol sofre ação da gliceroquinase, tendo como cofator da reação a adenosina trifosfato, dando como produto o glicerofosfato. Este, por sua vez sofre ação da glicerofosfato desidrogenase, tendo como cofator da reação a nicotinamida dinucleotídeo, dando origem à dihidroxiacetona fosfato. A adição de hidrazina torna esta reação irreversível.

A concentração de glicerol foi determinada por espectrofotometria com comprimento de onda de 340 nm.

Extração de lipídeos

A extração dos lipídeos foi feita com uma mistura contendo heptano, isopropanol e ácido sulfúrico 1N (10:40:1), mantida a 4°C. Os lipídeos extraídos localizavam-se na fase do heptano. Uma alíquota desta fase (500 μ L) foi tomada e evaporada completamente para determinação do peso total de lipídeos. Este valor

foi usado para os cálculos dos valores obtidos do glicerol liberado, que foram expressos em μmol de glicerol/100 mg de lipídeos.60 min.

Drogas e reagentes

ATP, collagenase tipo II de *Clostridium histolyticum*, ($\pm$)-epinefrina, glicerofosfato desidrogenase tipo I de músculo de coelho, gliceroquinase de *Candida micoderma*, HEPES, (-)-isoproterenol, NAD, (-)-norepinefrina e soroalbumina bovina (fração V) foram comprados de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA); BRL37344 foi comprado de Tocris Cookson (St. Louis, MO, USA); ácido sulfúrico, bicarbonato de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, cloreto de potássio, cloreto de sódio, fosfato biácido de potássio, glicose, heptano, isopropanol, L-ácido ascórbico e sulfato de magnésio utilizados no preparo do meio de incubação foram adquiridos da Reagem (Quimibras Indústrias Químicas S.A., Rio de Janeiro, BR); glicerol 99%, glicocole e hidrazina hidratada 25% foram adquiridos da Merck S.A. Indústrias Químicas (Rio de Janeiro, BR).

Análise estatística

Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Fisher. Diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

RESULTADOS

A quantidade de tecido adiposo perigonadal bem como sua atividade lipolítica basal não sofreram influência da variação hormonal presente nas diferentes fases do ciclo estral de fêmeas (Tabela 1).

A lipólise estimulada pelo d-AMPc foi significativamente menor em proestro ($0,93 \pm 0,07$ μ mol de glicerol/100 mg de lipídeos totais/60 min, n= 7) do que em estro ($1,77 \pm 0,09$ μ mol de glicerol/100 mg de lipídeos totais/60 min, n= 4), metaestro ($1,70 \pm 0,10$ μ mol de glicerol/100 mg de lipídeos totais/60 min, n= 12), e diestro ($1,67 \pm 0,19$ μ mol de glicerol/100 mg de lipídeos totais/60 min, n= 7) confirmando que, o mecanismo de segundo mensageiro interfere com a resposta celular em adipócitos brancos perigonadais isolados de ratas na fase proestro do ciclo estral (Figura 1).

O efeito lipolítico máximo induzido pela norepinefrina e epinefrina em adipócitos perigonadais isolados de ratas foi significativamente menor na fase de proestro quando comparada com a resposta máxima induzida nas outras fases do ciclo estral (Tabela 2, Figura 2, Figura 3) e não houve diferença da resposta induzida pelos diferentes agonistas nesta fase. Nas fases de estro, metaestro e diestro a resposta máxima induzida pela epinefrina foi significativamente maior do que aquela induzida pela norepinefrina (Tabela 2, Figura 2, Figura 3).

A lipólise máxima, induzida pela isoprenalina em adipócitos brancos perigonadais isolados de ratas na fase estro, se apresenta semelhante aquela induzida pela epinefrina na mesma fase. Entretanto, a resposta máxima induzida pela isoprenalina em adipócitos isolados de ratas nas fases de metaestro e diestro

foi significativamente menor que aquela induzida pela epinefrina em adipócitos isolados de ratas nestas mesmas fases (Tabela 2 e Figura 2).

Quando analisamos a resposta máxima exclusivamente β lipolítica observamos um efeito cíclico para os agonistas não seletivos, isoprenalina e BRL37344 (β_3 e β_1 na concentração de 10 μ M). Isto é, uma resposta máxima significativamente maior quando os adipócitos foram isolados em ratas nas fases de estro e diestro (Figura 3). Entretanto, a resposta máxima induzida pela isoprenalina em adipócitos isolados de ratas tanto na fase de estro como de diestro foi significativamente maior que aquela induzida pelo BRL37344 (Figura 2).

Para uma melhor análise da resposta lipolítica induzida pelos diferentes agonistas, construímos curvas concentração-efeito obtidas em adipócitos brancos isolados de ratas sacrificadas em cada fase do ciclo estral considerando o agonista que produziu uma lipólise máxima naquela fase como 100% (Figura 4).

Em diestro e em proestro observa-se que a curva concentração-efeito ao BRL37344 está à esquerda das demais, seguida pela isoprenalina, depois pela norepinefrina e esta pela epinefrina. Os valores pD_2 para cada agonista confirmam a ordem de potências relativas destes agonistas de adrenoreceptores em adipócitos isolados do tecido adiposo perigonadal de ratas em diestro e proestro: BRL37344 > isoprenalina > norepinefrina > epinefrina. Na fase de estro, esta ordem se mantém mas, como as diferenças entre os agonistas não são tão marcantes, temos: BRL37344 $\geq$ isoprenalina = norepinefrina $\geq$ epinefrina. Esta tendência se torna mais clara em metaestro, quando as potências relativas de isoprenalina,

norepinefrina e epinefrina não diferem significativamente entre si e o BRL37344 é o agonista de adrenocetores menos potente (Tabela 2, Figura 4 e 5).

Estes mesmos valores foram agrupados por agonista, o que nos permite verificar que a potência da isoprenalina não varia durante o ciclo estral, enquanto que as potências da norepinefrina e da epinefrina são menores em proestro e a do BRL37344 é menor durante o metaestro (Figura 6).

Durante o ciclo estral, ocorre oscilação marcante na potência da epinefrina e do BRL37344, o mesmo ocorre de maneira menos marcante, para a norepinefrina, e não ocorre para a isoprenalina (Tabela 2, Figura 6).

Nas diferentes fases do ciclo estral ocorre alteração na eficácia do BRL37344 e da isoprenalina enquanto que, para a norepinefrina e a epinefrina esta alteração foi menos pronunciada (Tabela 2, Figura 3).

TABELA 1. Peso do tecido adiposo e lipólise basal de adipócitos perigonadais isolados de ratas em cada fase do ciclo estral.

Fases	Peso do tecido adiposo perigonadal (g)	Lipólise basal (μmol glicerol/100 mg de lipídeos totais.60 min)
Proestro	$2,94 \pm 0,11$ (13)	$0,65 \pm 0,10$ (11)
Estro	$2,86 \pm 0,20$ (13)	$0,83 \pm 0,10$ (9)
Metaestro	$2,40 \pm 0,09$ (10)	$0,61 \pm 0,07$ (16)
Diestro	$2,65 \pm 0,27$ (7)	$0,61 \pm 0,09$ (7)

Os valores representam médias $\pm$ EPM de experimentos realizados em duplicata. Os números de experimentos realizados estão apresentados entre parêntesis. Os resultados foram analisados através de Análise de Variância seguida por teste de Fisher. Os resultados não foram estatisticamente diferentes.

TABELA 2.Valores pD_2 e de resposta lipolítica máxima para diferentes agonistas de adrenoceptores em adipócitos perigonadais isolados de ratas em diferentes fases do ciclo estral.

Agonistas	Proestro			Estro			Metaestro			Diestro		
	pD_2	R_{max}		pD_2	R_{max}		pD_2	R_{max}		pD_2	R_{max}	
BRL37344	$6,82 \pm 0,20$ (5)	$0,95 \pm 0,12^a$ (5)		$6,49 \pm 0,11$ (7)	$1,50 \pm 0,09$ (7)		$5,71 \pm 0,16^d$ (5)	$0,79 \pm 0,12^a$ (5)		$7,03 \pm 0,11^c$ (4)	$1,37 \pm 0,12$ (4)	
Isoprenalina	$6,23 \pm 0,26$ (6)	$0,99 \pm 0,11^a$ (6)		$6,23 \pm 0,08$ (6)	$2,16 \pm 0,22$ (6)		$6,35 \pm 0,07$ (5)	$0,77 \pm 0,13^a$ (5)		$6,55 \pm 0,08$ (5)	$2,01 \pm 0,09$ (5)	
Norepinefrina	$5,54 \pm 0,11^e$ (6)	$0,95 \pm 0,08^b$ (6)		$6,20 \pm 0,22$ (6)	$1,73 \pm 0,14$ (6)		$6,26 \pm 0,09$ (5)	$1,78 \pm 0,23$ (5)		$5,86 \pm 0,07^e$ (4)	$1,98 \pm 0,06$ (4)	
Epinefrina	$3,94 \pm 0,05^b$ (5)	$0,89 \pm 0,02^b$ (5)		$5,70 \pm 0,27$ (7)	$2,45 \pm 0,13$ (7)		$6,12 \pm 0,14$ (5)	$2,41 \pm 0,15$ (5)		$5,10 \pm 0,10^e$ (4)	$2,43 \pm 0,04$ (4)	

Os valores representam médias $\pm$ EPM de experimentos realizados em duplicata e em dias diferentes. O número de experimentos realizados está apresentado entre parêntesis. A potência do agente lipolítico foi avaliada pela sua EC_{50} , que corresponde à concentração do agonista induzindo 50% da lipólise máxima, expressa como pD_2 (-log EC_{50}). R_{max} é a resposta máxima ao agonista e, está expressa como μ mol de glicerol/100 mg de lipídeos totais.60 min. Análise estatística foi realizada usando ANOVA seguida de teste de Fisher (a, $p < 0,05$ vs estro e diestro; b, $p < 0,05$ vs estro, metaestro e diestro; c, $p < 0,05$ vs estro e metaestro; d, $p < 0,05$ vs metaestro; e, $p < 0,05$ vs estro e metaestro).

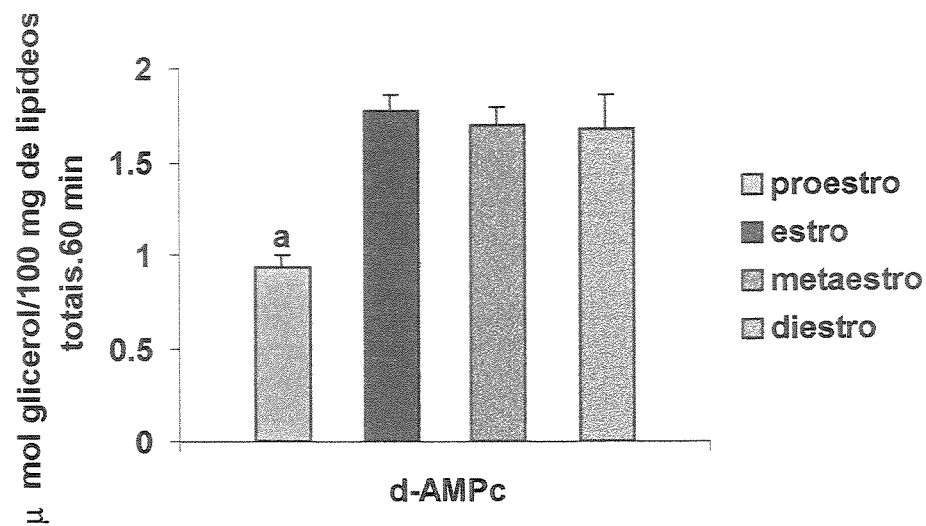


Figura 1. Lipólise induzida pelo d-butiril-AMPc (1mM) em adipócitos perigonadais isolados de ratas nas diferentes fases do ciclo estral. As colunas representam as médias e as barras verticais o valor de EPM de experimentos realizados em duplicata. ANOVA e teste de Fisher foram usados para comparar os valores entre os grupos (a, $p < 0,05$ vs estro, metaestro e diestro).

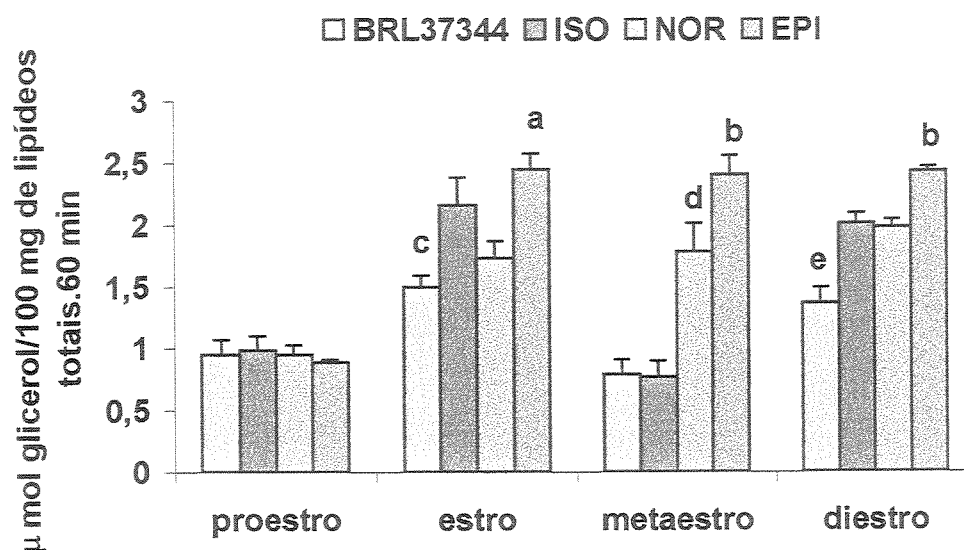


Figura 2. Resposta lipolítica máxima após incubação por 60 minutos com 10 μ M de isoprenalina (ISO), norepinefrina (NOR) e BRL37344 e 1 mM de epinefrina (EPI) em adipócitos brancos isolados do tecido adiposo perigonadal de ratas nas diferentes fases do ciclo estral. As colunas representam as médias e as barras verticais o valor de EPM de experimentos realizados em duplicata e em dias diferentes. Os números de experimentos estão apresentados na Tabela 2. ANOVA seguida de teste de Fisher foram usados para comparar as respostas máximas dos agonistas numa mesma fase (a, $p < 0,05$ vs BRL37344 e norepinefrina; b, $p < 0,05$ vs BRL37344, norepinefrina e isoprenalina; c, $p < 0,05$ vs isoprenalina; d, $p < 0,05$ vs BRL37344 e isoprenalina; e, $p < 0,05$ vs isoprenalina e norepinefrina).

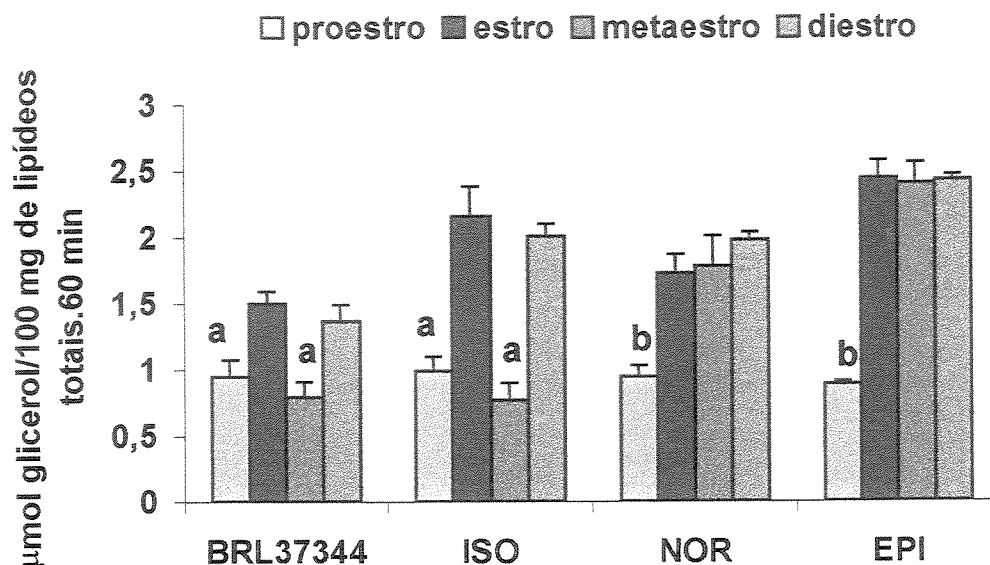


Figura 3. Resposta lipolítica máxima após incubação com 10μM de isoprenalina (ISO), norepinefrina (NOR) e BRL37344 e 1mM de epinefrina (EPI) em adipócitos isolados do tecido adiposo perigonadal de ratas sacrificadas nas diferentes fases do ciclo estral. As colunas representam as médias e as barras verticais o valor de EPM de experimentos realizados em duplicata. Os números de experimentos estão apresentados na Tabela 2. ANOVA seguida de teste Fisher foram usados para comparar as eficácias do mesmo agonista nas diferentes fases (a, $p < 0,05$ vs estro e diestro; b, $p < 0,05$ vs estro, metaestro e diestro).

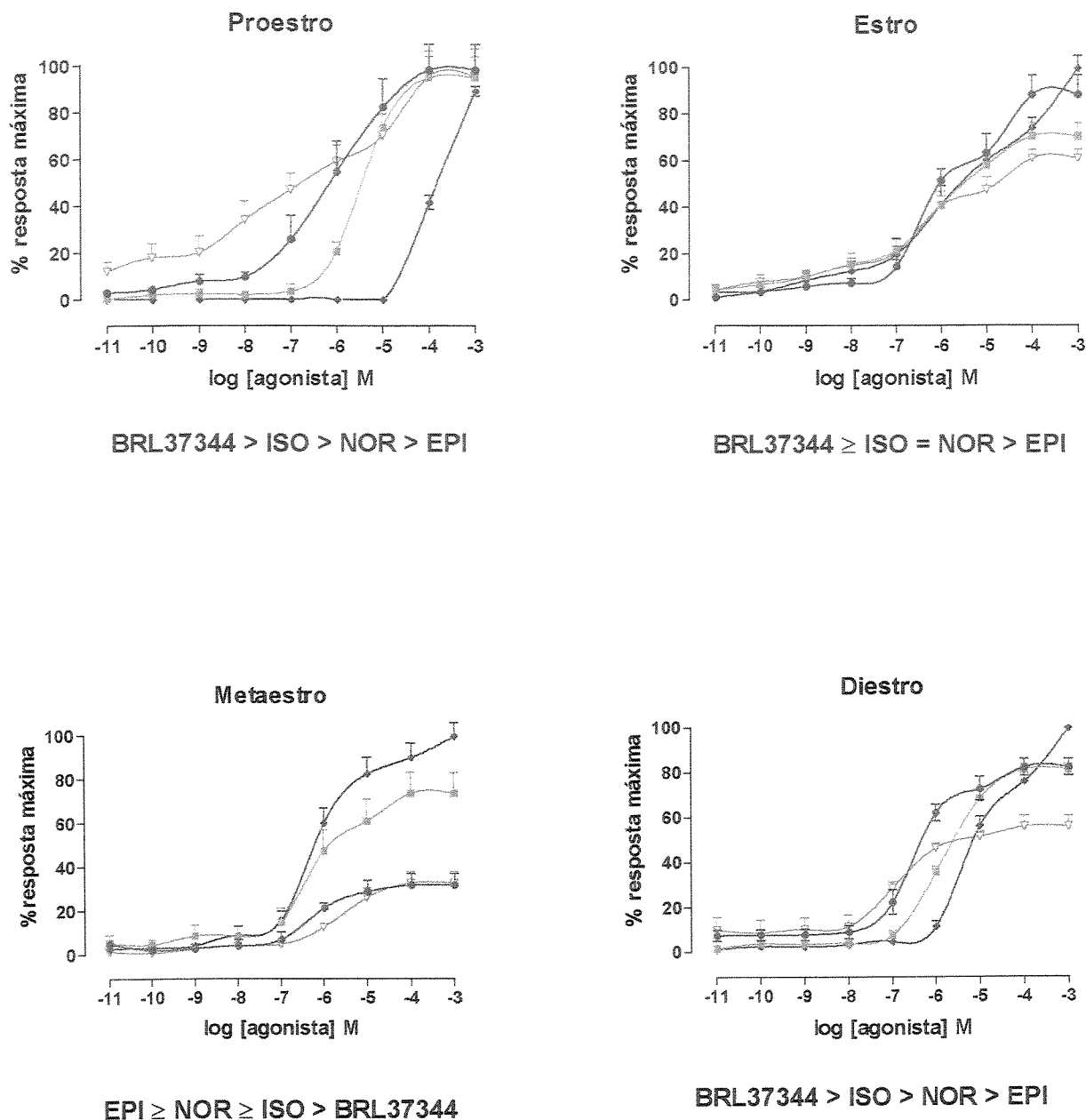


Figura 4. Curvas concentração-efeito aos agonistas de adrenoceptores BRL37344 (∇), isoprenalina ($\bullet$), norepinefrina ($\blacksquare$) e epinefrina ($\blacklozenge$) em adipócitos isolados do tecido adiposo perigonadal de ratas nas diferentes fases do ciclo estral. Os valores foram calculados em relação a lipólise máxima induzida pela isoprenalina como 100% na fase de proestro e em relação a epinefrina como 100% nas fases de estro, metaestro e diestro. Barras verticais representam EPM. Os números de experimentos são dados na Tabela 2.

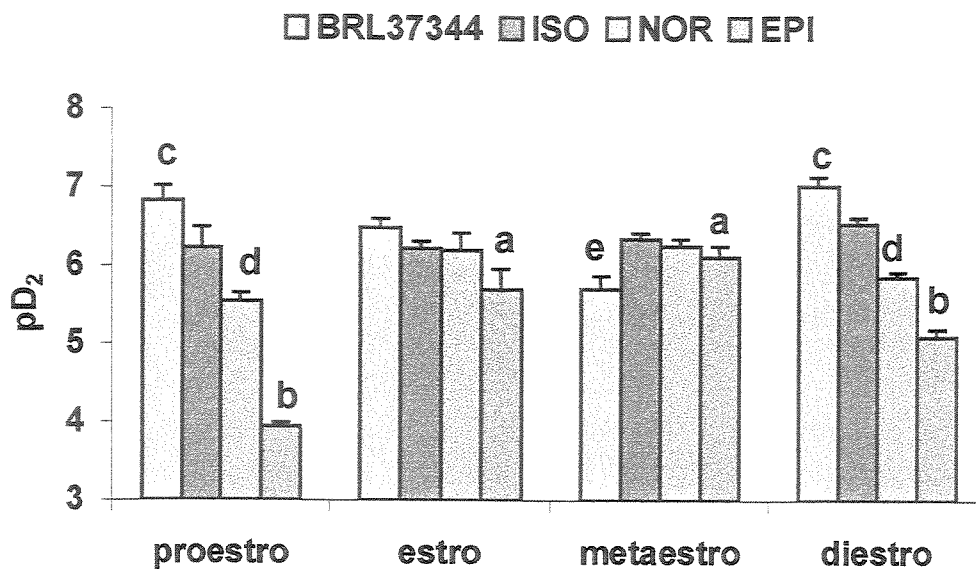


Figura 5. Valores pD_2 do BRL37344, isoprenalina, norepinefrina e epinefrina em adipócitos isolados do tecido adiposo perigonadal de ratas sacrificadas em cada uma das fases do ciclo estral. As colunas representam as médias e as barras verticais o valor de EPM de experimentos realizados em duplicata. Os números de experimentos estão apresentados na Tabela 2. Análise estatística foi realizada usando ANOVA seguida de teste de Fisher (a, $p < 0,05$ vs BRL37344; b, $p < 0,05$ vs BRL37344, isoprenalina e norepinefrina; c, $p < 0,05$ vs isoprenalina; d, $p < 0,05$ vs BRL37344 e isoprenalina; e, $p < 0,05$ vs isoprenalina e norepinefrina).

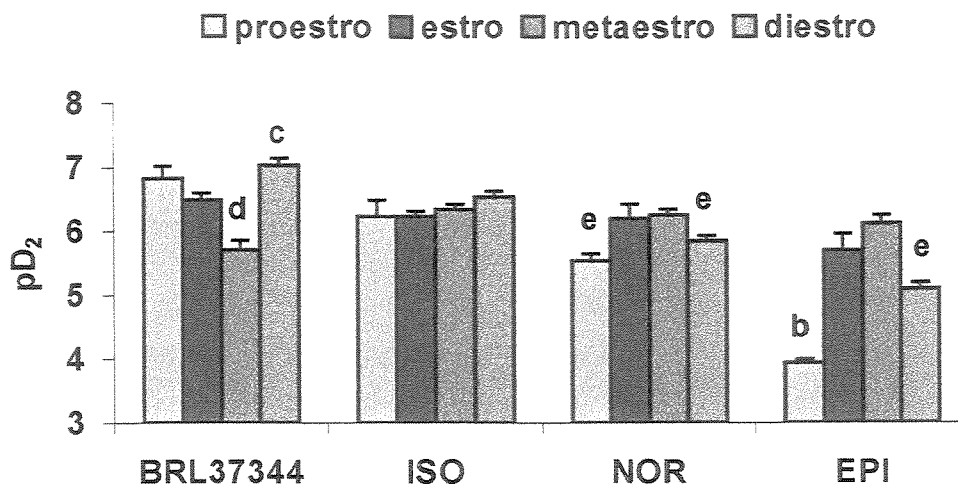


Figura 6. Valores pD_2 do BRL37344, isoprenalina, norepinefrina e epinefrina em adipócitos isolados de tecido adiposo perigonadal de ratas sacrificadas em cada uma das fases do ciclo estral. As colunas representam as médias e as barras verticais o valor de EPM dos números de experimentos realizados em duplicata. Os números de experimentos estão apresentados na Tabela 2. Análise estatística foi realizada usando ANOVA seguida de teste de Fisher (**b**, $p < 0,05$ vs estro, metaestro e diestro; **c**, $p < 0,05$ vs estro; **d**, $p < 0,05$ vs proestro, estro e diestro; **e**, $p < 0,05$ vs estro e metaestro).

DISCUSSÃO

Encontramos os três subtipos de adrenoreceptores β mediando a lipólise em adipócitos isolados de ratas (ordem de predomínio $\beta_3 > \beta_1 > \beta_2$) e o subtipo α_2 mediando a lipogênese. O efeito lipolítico induzido pelas catecolaminas endógenas é resultado tanto da ativação β como α_2 . A epinefrina ativa os quatro tipos de adrenoreceptores, sendo então seu efeito final uma resultante da ativação tanto da lipólise como da lipogênese. A norepinefrina tem efeito semelhante, exceto pelo fato de apresentar menor afinidade pelo subtipo β_2 . A isoprenalina e o BRL37344 foram os agonistas (exógenos) de adrenoreceptores β utilizados neste trabalho. A isoprenalina induz uma lipólise através da ativação dos três subtipos beta adrenérgicos enquanto que o BRL37344 apresenta maior seletividade para β_3 apresentando atuação em β_1 quando usado em altas concentrações (ARNER, 1992; LAFONTAN & BERLAN, 1993; GERMACK et al., 1997).

Nossos resultados mostraram que não há diferença de peso do tecido adiposo perigonadal de ratas e nem da lipólise basal, avaliada em adipócitos isolados de ratas sacrificadas em cada uma das quatro fases do ciclo estral. Por outro lado, a resposta lipolítica ao d-AMPC, e a resposta máxima bem como a sensibilidade aos agonistas de adrenoreceptores, apresentaram diferenças significativas entre as fases do ciclo.

O d-AMPC é um análogo sintético do AMPC. Possui a característica de induzir a lipólise agindo diretamente sobre a proteína quinase A sem interferir com o receptor e não sofrendo ação da fosfodiesterase.

Durante o proestro, tanto a lipólise estimulada pelo d-AMPc como também o efeito lipolítico máximo dos agonistas de adrenoceptores BRL37344, isoprenalina, norepinefrina e epinefrina foram menores do que nas outras fases do ciclo.

Em adipócitos isolados a diminuição da resposta máxima a agonistas de adrenoceptores β e ao d-AMPc, tem sido atribuída à redução na atividade da subunidade catalítica da adenilil ciclase (PECQUERY et al., 1986) e da lipase hormônio sensível (BOUSQUET-MÉLOU et al., 1999; LARGE et al., 1999), o que é o passo limitante na cascata de reações intracelulares que resultam na estimulação da lipólise por ativação de adrenoceptores β (LANGIN et al., 1996).

Em células adiposas subcutâneas de indivíduos obesos, há uma diminuição da expressão e da função desta enzima, com prejuízo da capacidade lipolítica dos adipócitos (LARGE et al., 1999). As modificações na resposta do tecido adiposo às catecolaminas que ocorrem em coelhas, durante a gestação, também estão associadas com mudanças na cascata lipolítica pós-receptor, cujo alvo principal parece ser a lipase hormônio sensível (BOUSQUET-MÉLOU et al., 1999). Além disso, as diferenças de resposta às catecolaminas observadas entre adipócitos dos depósitos intra-abdominal e subcutâneo também parecem estar associadas com diferenças na atividade da adenilil ciclase, a qual acarretaria diferenças na atividade da lipase hormônio sensível. Tais diferenças foram canceladas pela ovariectomia (LACASA et al., 1991).

O tecido adiposo é considerado tecido de estoque para esteróides sexuais, e um importante sítio para o metabolismo de hormônios esteróides (DESLYPERE et al., 1985). Vários estudos clínicos e experimentais sugerem o envolvimento de

hormônios esteróides sexuais no controle do metabolismo e da distribuição regional do tecido adiposo, além de demonstrarem a presença de receptores para esteróides sexuais em adipócitos (GRAY et al., 1981; REBUFFE-SCRIVE, 1987; PEDERSEN et al., 1996). Em tecido adiposo abdominal, a adenilil ciclase é um dos alvos da ação dos hormônios esteróides sexuais (PECQUERY et al., 1986).

Nós não avaliamos a atividade da adenilil ciclase ou da lipase hormônio sensível em adipócitos isolados de ratas em diferentes fases do ciclo estral, mas as alterações que observamos na resposta ao d-AMPc mostram que, durante o proestro, a atividade da lipase hormônio sensível em resposta ao AMPc está diminuída. Esta diminuição poderia ser responsável, total ou parcialmente, pela diminuição na resposta máxima aos agonistas de adrenoceptores, observada na fase de proestro.

Entretanto, durante o metaestro, a resposta ao d-AMPc não está diminuída, embora a resposta máxima aos agonistas de adrenoceptores β , BRL37344 e isoprenalina, esteja. WILSON et al. (1996) clonaram adrenoceptores β_3 humanos e expressaram-nos em células de ovário de hamster em três diferentes densidades. A ordem de potência para as diferentes densidades dos receptores foi semelhante para cada clone, sendo a potência da isoprenalina maior que a do BRL37344. A eficácia relativa variou para os diferentes clones sendo, a eficácia do BRL37344 várias vezes menor do que a da isoprenalina. Segundo os autores, isto pode ser explicado por baixa potência do BRL37344 quando comparado com a isoprenalina, apesar de sua grande afinidade pelo receptor.

Acredita-se que o adrenoceptor β_3 pode ser acoplado a mais de um segundo mensageiro, com a possibilidade de que este adrenoceptor, em adipócitos de ratos, interagir com proteínas Gs e Gi (CHAUDRY et al., 1994) Em região septal de coração humano, GAUTHIER et al. (1996) demonstraram que o adrenoceptor β_3 se acopla à proteína Gi, resultando em efeito inotrópico negativo, em total contraste com observações prévias que sempre descreveram ação inotrópica positiva das catecolaminas no tecido cardíaco (KAUMANN, 1996; KAUMANN & MOLENNAR, 1996).

Sabendo-se que hormônios sexuais podem levar a alterações na função dos adipócitos e ainda, que podem modular a atividade adrenérgica (DAVIES & LEFKOWITZ, 1984; REYNISDOTTIR et al., 1995), pode-se sugerir que a baixa potência e eficácia do agonista BRL37344 em desencadear ativação do adrenoceptor β_3 na fase de metaestro estaria relacionada com a atividade mediada por este receptor, sendo este possivelmente, modulado por ação dos hormônios sexuais, secretados nesta fase do ciclo estral.

As respostas máximas aos agonistas endógenos não seletivos, α - e β -adrenérgicos, norepinefrina e epinefrina, estão diminuídas apenas durante o proestro. Entretanto, as respostas máximas aos agonistas seletivos para receptores β -adrenérgicos, com muito baixa afinidade por receptores α -adrenérgicos, isoprenalina e BRL37344, estão diminuídas durante o proestro e o metaestro. Assim sendo, enquanto no proestro, a diminuição da resposta parece ser devida à menor sensibilidade da lipase hormônio sensível ao AMPc, durante o metaestro, outro fator além deste, parece estar causando diminuição na resposta

aos agonistas β -adrenérgicos. Este fator parece não interferir com a responsividade àqueles agonistas que ativam também receptores α -adrenérgicos.

A Figura 5 apresenta os valores pD_2 dos diferentes agonistas de adrenoceptores em adipócitos de ratas. Esta variável representa a potência dos agonistas é utilizada como indicativa da sensibilidade do tecido ao agonista em questão. Em tecido adiposo subcutâneo de ratos aceita-se a seguinte ordem de potência para agonistas seletivos: $\beta_3 > \beta_1 \gg \beta_2$ (TAVERNIER et al., 1996; LAFONTAN et al., 1997; OHSAKA et al., 1998). A concentração de adrenoceptores β_3 transcritos em tecido adiposo perigonadal de ratos seria dez vezes maior que aquela do tecido adiposo subcutâneo de suínos, onde o número maior de adrenoceptores corresponderia ao subtipo β_1 (McNEEL & MERSMANN, 1999), enquanto que em humanos o subtipo predominante seria o β_2 (LAFONTAN & BERLAN, 1993).

Nas fases de proestro, estro e diestro, nossos resultados obedecem à ordem de potências relativas proposta para agonistas β -adrenérgicos. Mas, na fase de metaestro, a sensibilidade ao BRL37344 é menor do que a sensibilidade à isoprenalina e à norepinefrina.

O composto BRL37344 foi descrito como sendo o agonista pleno mais potente capaz de estimular seletivamente a lipólise em adipócitos de ratos, por meio da interação com adrenoceptores β_3 (HOLLENGA et al., 1990). Em concentrações micromolares, este composto estimula também adrenoceptores β_1 (GERMACK et al., 1997).

Hormônios esteróides, interagindo com seus respectivos receptores intracelulares, podem ativar ou inibir genes responsáveis pela síntese de proteínas, entre as quais, receptores de membrana e, entre eles, os adrenoceptores (BEATO, 1989; MALAYER & GORSKI, 1993). A presença e a densidade de adrenoceptores β em miométrio de ratas sofrem influência da concentração plasmática de estrógenos (NIMMO, 1989). O tecido adiposo também pode ser alvo para os hormônios esteróides sexuais já que foram detectados receptores para estes hormônios nestes tecidos (GRAY et al., 1981). O tratamento com estradiol diminuiu a resposta lipolítica em adipócitos brancos de hamsters através da redução na atividade da subunidade catalítica da adenilil ciclase (PECQUERY et al., 1986).

Não houve alteração da sensibilidade à isoprenalina (um agonista que ativa os três subtipos de adrenoceptores β , mas não tem afinidade por adrenoceptores α). Porém observamos que a sensibilidade ao BRL37344 foi maior durante o diestro do que durante o proestro e o estro, e menor ainda durante o metaestro. Estes resultados sugerem que, durante o ciclo estral, estariam ocorrendo oscilações cíclicas da proporção dos subtipos de adrenoceptores β que medeiam a resposta lipolítica em adipócitos de ratas, com a resposta global não sendo alterada, uma vez que a resposta à isoprenalina não se altera. De acordo com esta hipótese, os subtipos β_3 e β_1 (resposta ao BRL37344) seriam mais importantes durante o diestro, diminuindo sua participação durante o proestro e o estro, apresentando importância mínima durante o metaestro. Esta diminuição da participação destes subtipos seria compensada pelo aumento da participação do

subtipo β_2 . Se assim fosse, a sensibilidade à epinefrina, que ativa os três subtipos de adrenoreceptores β , mas não a sensibilidade à norepinefrina, cuja afinidade pelo subtipo β_2 é baixa, deveria ser maior no metaestro do que no diestro. Os resultados apresentados na Figura 6 e na Tabela 2 fornecem forte suporte a esta hipótese.

Segundo EINSPANIER et al. (1999), durante o ciclo estral ocorreriam alterações da expressão do adrenoreceptor β_2 , com altos níveis de transcrição e significativo aumento da capacidade ligante durante a fase luteal. Depois de uma suplementação com progesterona, células epiteliais de oviduto bovino em cultura apresentaram elevada expressão deste adrenoreceptor, confirmando a hipótese que a progesterona regula, aumentando, o número de adrenoreceptores β_2 nestas células. Neste sentido, KOTWICA et al. (1991) já haviam demonstrado que novilhas que receberam infusão de agonistas β -adrenérgicos apresentavam aumento da concentração plasmática de progesterona, enquanto a infusão de um antagonista beta adrenérgico diminuiu as concentrações plasmáticas deste hormônio, sugerindo que a secreção basal de progesterona, em bovinos, pode ser parcialmente dependente de uma constante estimulação beta adrenérgica, e esta, por sua vez, modularia a expressão do receptor adrenérgico.

Em linfócitos de mulheres na fase luteal do ciclo menstrual ocorre aumento na densidade de adrenoreceptores β_2 (WHEELDON et al., 1994).

Nossos resultados sugerem que durante o ciclo estral haveria, em adipócitos brancos isolados de ratas, oscilação na resposta lipolítica mediada pelos diferentes subtipos de adrenoreceptores, proporcionada pelos efeitos

regulatórios dos esteróides sexuais, os quais exerceriam influência regulatória recíproca no subtipo β_2 em relação aos subtipos β_3 e β_1 .

Nossos resultados também mostraram que na fase de proestro ocorre dessensibilização da resposta à epinefrina (Figuras 4 e 5, Tabela 2). Em adipócitos de ratos, o estímulo da lipólise exercido pelas catecolaminas se deve à sua interação com receptores β -adrenérgicos (LAFONTAN et al., 1997). Mas, a interação das catecolaminas endógenas com adrenoceptores α_2 causa um efeito oposto, uma vez que estes adrenoceptores inibem a adenilil ciclase por meio de uma proteína G_i (GALITZKY et al., 1993; LANGIN et al., 1996). O efeito final da ação da epinefrina seria dependente da proporção dos subtipos de adrenoceptores, incluindo o subtipo α_2 . Portanto, um aumento da resposta inibitória mediada por adrenoceptores α_2 poderia ser o responsável pela grande dessensibilização da resposta lipolítica à epinefrina observada em proestro.

A influência dos esteróides gonadais sobre a população de adrenoceptores α_2 já foi demonstrada anteriormente em adipócitos de suínos tratados com testosterona (LAFONTAN & BERLAN, 1993; COUTINHO et al., 1993), e em tecido vascular de ratas tratadas com 17- β -estradiol (AUSTIN & CHESS-WILLIAMS, 1995).

Além disso, há variações do padrão de expressão genética para os subtipos de adrenoceptores e a modulação da atividade lipolítica dependendo da localização anatômica do depósito de gordura, fazendo com que o tecido apresente respostas diferenciadas na dependência de sua localização (TAVERNIER et al., 1995; REBUFFÉ-SCRIVE et al., 1985) e do grau de

obesidade (VAN HARMELEN et al., 1997). Por exemplo, o efeito máximo da isoprenalina induzindo síntese intracelular de AMPc e liberação de glicerol é similar em adipócitos do omento e do tecido adiposo subcutâneo humano. A epinefrina causou aumento de aproximadamente duas vezes nas concentrações intracelulares de AMPc em adipócitos omentais, mas nenhum efeito é observado em células do tecido adiposo subcutâneo. Isto sugere que a inibição da lipólise, e do acúmulo de AMPc, via adrenoceptor α_2 são menos pronunciadas em adipócitos omentais que em subcutâneos, o que pode ser devido a diferenças no número de receptores entre os dois tecidos (VIKMAN et al., 1996). Neste, a atividade intrínseca da norepinefrina aumenta e se iguala à da isoprenalina quando na presença de um antagonista adrenérgico α_2 (VAN HARMELEN et al., 1997).

A idade é outro fator que parece alterar a expressão dos diferentes subtipos de adrenoceptores em células adiposas. O número de adrenoceptores β é menor em ratos adultos quando comparado com ratos jovens (KOBATAKE et al., 1991; COUTINHO et al., 1993), enquanto o número de sítios de ligação do adrenoceptor α_2 é maior, e esta característica está relacionada com concentrações de andrógenos (KOBATAKE et al., 1991).

Nossos resultados mostram que, durante o proestro, a lipólise estimulada pelo d-AMPc e pela epinefrina em adipócitos isolados do tecido perigonadal foi significativamente menor do que nas outras fases do ciclo. Também foi menor, nesta fase, a sensibilidade das células adiposas à epinefrina sugerindo então, uma maior participação do adrenoceptor α_2 .

Assim sendo, podemos concluir que durante o ciclo estral de ratas ocorrem oscilações da resposta aos agonistas adrenérgicos refletindo a proporção da participação dos diferentes subtipos de adrenocetores na resposta lipolítica de adipócitos perigonadais. Outro mecanismo envolvido com estas oscilações, compreende variações da sensibilidade da lipase hormônio sensível ao AMPc.

CONCLUSÃO

Durante o ciclo estral de ratas ocorrem oscilações da resposta aos agonistas adrenérgicos refletindo variações da proporção da participação dos diferentes subtipos de adrenoceptores na resposta lipolítica de adipócitos perigonadais. Um dos mecanismos envolvidos com estas oscilações, compreende variações da sensibilidade da lipase hormônio sensível ao AMPc.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALQUIST, R.P. A study of adrenotropic receptors. **Am. J. Physiol.**, v. 153, p. 586-600, 1948.
- ARNER, P. Adrenergic receptor function in fat cells. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 55, p. 228S-236S, 1992.
- AUSTIN, C.; CHESS-WILLIAMS, R. The influence of 17-beta-oestradiol and natural oestrous cycle on alpha-adrenoceptor mediated responses of the cardiovascular system in the rat. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 47, n. 80, p. 656-60, August, 1995.
- AXELROD, J.; REISINE, T.D. Stress hormones: their interaction and regulation. **Science**, v. 224, n. 4648, p. 452-459, 1984.
- BEATO, M. Gene regulation by steroid hormones. **Cell**, v. 56, p. 335-344, February, 1989.
- BOULET, A.P.; FORTIER, M.A. Sex steroid regulation of β -adrenergic sensitive adenylate cyclase in rabbit myometrial cells in primary culture. **Life Sci.**, v. 42, p. 829-840, December, 1987.
- BOULOUMIÉ, A., et al. In vivo up-regulation of adipocyte α_2 -adrenoceptors by androgens is consequence of direct action on fat cells. **Am. Physiol. Society**, p.C926-C931, October, 1994.
- BOUSQUET-MÉLOU, A., et al. Pregnancy modifies the α_2 - β -adrenergic receptor functional balance in rabbit fat cells. **J. Lipid Res.**, v. 40, p. 267-274, 1999.
- BOWEN, W.P.; FLINT, D.J.; VERNON, R.G. Regional and interspecific differences in the ligand binding properties of β -adrenergic receptors of individual white adipose tissue depots in the sheep and rat. **Biochem. Pharmacol.**, v. 44, p. 681-686, 1992.
- 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.
- BUTCHER, R.L.; COLLINS, W.E.; FUGO, N.W. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 β throughout the 4-day estrous cycle of the rat. **Endocrinology**, v. 94, p. 1704-1708, 1974.

- BYLUND, D.B., et al. Adrenoceptors. **The IUPHAR Receptor Compendium**, 1998.
- CAREY, G.B. Mechanisms regulating adipocyte lipolysis. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 441, p. 157-170, 1998.
- CARPÉNÉ, C., et al. Selective reduction of α_2 -adrenergic responsiveness in hamster adipose tissue during prolonged starvation. **Am. J. Physiol.**, v. 259, p. E80-E88, 1990.
- CARPÉNÉ, C.; BERLAN, M.; LAFONTAN, M. Influence of development and reduction of fat stores on the antilipolytic α_2 -adrenoceptor in hamster adipocytes: comparison with adenosine and β -adrenergic lipolytic response. **J. Lipid Res.**, v. 24, p. 766-774, 1983.
- CHAUDRY, A., et al. Differential interaction of β_1 and β_3 adrenergic receptors with Gi in rat adipocytes. **Cell. Signalling**, v. 6, p. 457-465, 1994.
- COUTINHO, L.L., et al. α_2 adrenergic receptor activity in porcine adipocytes is androgen and age/cell size dependent. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 2, p. 333-339, 1993.
- DAVIES, A.O.; LEFKOWITZ, R.J. Regulation of β -adrenergic receptors by steroid hormones. **Ann. Rev. Physiol.**, v. 46, p. 119-30, 1984.
- DESLYPERE, J.P.; VERDONCK, L.; VERMEULEN, A. Fat tissue: a steroid reservoir and site of steroid metabolism. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 61, n. 3, p. 564-70, September, 1985.
- DI GIROLAMO, M.; NEWBY, F.D.; LOVEJOY, J. **FASEB J.** v. 6, n.7, p. 2405-12, April, 1992.
- DOLE, V.P.; MEINERTZ, H. Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. **J. Biol. Chem.**, v. 235, p. 2595-2599, 1960.
- 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.
- DUPON, C.; KIM, M.H. Peripheral plasma levels of testosterone, androstenedione and oestradiol during the rat oestrous cycle. **J. Endocr.**, v. 59, n. 3, p. 653-654, May, 1973.
- EINSPANIER, R., et al. Characterization and localization of β_2 -adrenergic receptors in the bovine oviduct: indication for progesterone-mediated expression. **Endocrinology**, v. 140, n. 6, p. 2679-84, June, 1999.

- ELBERS, J.M., et al. Changes in fat cell size and in vitro lipolytic activity of abdominal and gluteal adipocytes after one-year cross-sex hormone administration in transsexuais. **Metabolism**, v. 48, n. 11, p. 1371-7, november, 1999.
- EMORINE, L.J., et al. Molecular characterization of the human β_3 -adrenergic receptor. **Science**, v. 245, p. 1118-1121, 1989.
- EMORINE, L.J., et al. Structure of the gene for human β_2 -adrenergic receptor: expression and promoter characterization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 6995-6966, 1987.
- FAIN, J.N.; GARCIA-SAINZ, J.A. Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. **J. Lipid Res.**, v. 24, n. 8, p. 945-66, August, 1983.
- FAINTRENIE, G.; GÉLOËN, A. Alpha 1-adrenergic regulation of lactate production by white adipocytes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 277, p. 235-238, 1996.
- FREEMAN, M.E. . **The Physiology of Reproduction**: The ovarian cycle of the rat. New York: E. Knobil & J. Neil (Ed.), 1988.
- FRIELLE, T., et al. Cloning of the cDNA for the human β_1 -adrenergic receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 7920-7924, 1987.
- GALITZKY, J., et al. Role of vascular alpha2 adrenoceptors in regulating lipid mobilization from human adipose tissue. **J. Clin. Invest.** v. 91, p. 1997-2003, 1993.
- GAUTHIER, C., et al. Functional β_3 -adrenoceptor in the human heart. **J. Clin. Invest.**, v. 98, p. 556-562, 1996.
- GERMACK, R., et al. β -adrenoceptor subtype expression and function in rat white adipocytes. **Br. J. Pharmacol.**, v. 120, p. 201-210, January, 1997.
- GILMAN, A.G. G proteins: transducers of receptor-generated signals. **Ann. Ver. Biochem.**, v. 56, p. 615-649, 1987.
- GIUDICELLI, Y., et al. Modulation by sex hormones of the membranous transducing system regulating fatty acid mobilization in adipose tissue. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 48, n. 1, p. 91-100, January, 1993.
- GIUDICELLI, Y.; AGLI, B.; LACASA, D. Beta-adrenergic receptor desensitization in rat adipocyte membranes. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 585, p. 85-93, 1979.

- GRANNEMAN, J.G.; LAHNERS, K.N.; CHAUDRY, A. Molecular cloning and expression of the rat β_3 -adrenergic receptor. **Mol. Pharmacol.**, v. 40, p. 895-899, 1991.
- GRASSI-KASSISSE, D.M.; GÉLÖEN, A. **GERLI Congress**, 4 and 5 of may, 2000. Caractérisation du sous-type des récepteurs α_1 - adrénergiques des adipocytes blancs.
- GRAY, J.M.; DUDLEY, S.D.; WADE, G.N. In vivo cell nuclear binding of 17 β - [3 H] estradiol in rat adipose tissues. **Am. Physiol. Society**, p. E43-E46, 1981.
- HOAR, W.S. **General and Comparative Physiology**. 2nd ed. New Jersey: Prentice-Hall International, ed., 1975.
- HOLLENGA, C., et al. Discrepances in lipolytic activities by beta-adrenoceptor agonists in human and rat adipocytes. **Horm. Metab. Res.**, v. 22, n. 1, p. 17-21, January, 1990.
- HOLZBAUER, M.; YODIM, M.B.H. The oestrous cycle and monoamine oxidase activity. **Br. J. Pharmacol.**, v. 48, p. 600-608, 1973.
- HOUSSAY, B. **Fisiologia Humana**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1980.
- IVERSEN, L.L.; SALT, P.J. Inhibition of catecholamine Uptake-2 by steroids in the isolated rat heart. **Br. J. Pharmacol.**, v. 40, p. 528-30, November, 1970.
- KAUMANN, A.J. (-)- CGP 12177- induced increase of human atrial contraction through a putative third β -adrenoceptor. **Br. J. Pharmacol.**, v. 117, p. 93-98, 1996.
- KAUMANN, A.J. Four β -adrenoceptor subtypes in the mammalian heart. **TIPS.**, v. 18, p. 71-76, 1997.
- KAUMANN, A.J. Is there a third heart β -adrenoceptor? **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 10, p. 316-320, 1989.
- KAUMANN, A.J.; MOLENNAR, P. Differences between the third cardiac β -adrenoceptor in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 118, p. 2085-2098, August, 1996.
- KOBATAKE, T., et al. Age-related changes in adrenergic α_1 , α_2 and β receptors of rat white fat cell membranes: an analysis using [3 H] bunazosin as a novel ligand for the α_1 adrenoceptor. **J. Lipid Res.**, v. 32, p. 191-196, 1991.
- KOBILKA, B.K., et al. cDNA for the human β_2 -adrenergic receptor: a protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose

chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet derived growth factor. **Proc. Natl. Acad. USA**, v. 84, p. 46-50, 1987.

KOTWICA, J.; BOGACKI, M. Physiological importance of dopamine as a noradrenaline precursor in the corpus luteum. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl.**, v. 26, p. S29-35, April, 1999.

KOTWICA, J.; SHARZYNSKI, D.; JAROSZEWSKI, J. Involvement of beta adrenoceptors in the regulation of luteal function in cattle. **Br. Vet. J.**, v. 147, n. 3, p. 189-196, May/June, 1991.

KRALL, J.F., et al. Demonstration of adrenergic catecholamine receptors in rat myometrium and their regulation by sex steroid hormones. **Life Sci.**, v. 23, p. 1073-1082, 1978.

LACASA, D., et al. Influence of ovariectomy and regional fat distribution on the membranous transducing system controlling lipolysis in rat fat cells. **Endocrinology**, v. 128, n. 2, p. 747-753, February, 1991.

LAFONTAN, M., et al. Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. **Hum. Reprod.**, v. 12, n. 1, p. 6-20, October, 1997.

LAFONTAN, M.; BERLAN, M. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. **J. Lipid Res.**, v. 34, p. 1057-1091, July, 1993.

LANDS, A.M. et al. Differentiation of receptors systems activated by sympathomimetic amines. **Nature**, v. 241, p. 597-598, 1967b.

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.

LANGER, S. Z.; SHEPPERSON, N. B.; MASSINGHAM, R. Preferential noradrenergic innervation of alpha-adrenergic receptors in vascular smooth muscle. **Hypertension**, v. 3, n. 3, p. 1112-8, May-June, 1981.

LANGIN, D.; HOLM, C.; LAFONTAN, M. Adipocyte hormone-sensitive lipase: a major regulator of lipid metabolism. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 55, p. 93-109, 1996.

LARGE, V., et al. Decrease expression and function of adipocyte hormone-sensitive lipase in subcutaneous fat cells of obese subjects. **J. Lipid Res.**, v. 40, p. 2059-2065, November, 1999.

LARGE, V., et al. Hormone-sensitive lipase expression and activity in relation to lipolysis in human fat cells. **J. Lipid Res.**, v. 39, p. 1688-1695, August, 1998.

- 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.
- LI, H., et al. Enhanced responses to 17 β -estradiol in rat hearts treated with isoproterenol: involvement of a cyclic AMP-dependent pathway. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 293, n. 2, p. 592-598, January, 2000.
- LOHSE, J.M. Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1179, p. 171-188, 1993.
- LONG, J.A.; EVANS, H.M. The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena. **Mem. Univ. Calif.**, v. 6, p. 1-148, 1922.
- MACHIDA, C.A., et al. Molecular cloning and expression of the rat β_1 receptor gene. **J. Biol. Chem.** v. 265, p. 12960-12965, March, 1990.
- MALAYER, J.R.; GORSKI, J. An integrated model of estrogen receptor action. **Domest. Anim. Endoc.**, v. 10, n. 3, p. 159-177, 1993.
- MANDL, A.M. The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. **J. Exp. Biol.**, v. 28, p. 576-584, 1951.
- MARCHETTI, B. LABRIE, F. Hormonal regulation of beta-adrenergic receptors in the rat mammary gland during the estrous cycle and lactation: role of Sex steroids and prolactin. **Endocrinology**, v. 126, n. 1, p. 575-81, January, 1990.
- MARCONDES, F.K., et al. Stress-induced subsensitivity to catecholamines depends on the estrous cycle. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 74, p. 663-669, 1996.
- MARRONE, B.B. Gonadal hormones and body temperature in rats: effects of estrous cycle, castration and steroid replacement. **Physiol. Behav.**, v. 17, p. 419-425, 1976.
- MARSDEN, P.J.; MURDOCH, A.; TAYLOR, R. Adipocyte insulin action during the normal menstrual cycle. **Hum. Reprod.**, v. 11, n. 5, p. 968-74, May, 1996.
- MAURIÈGE, P., et al. Heterogenous distribution of β - and α_2 - adrenoceptor binding sites in human fat cells from various deposits: functional consequences. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 7, p. 156-165, 1987.
- McNELL, R.L.; MERSMANN, H.J. Distribution and quantification of β_{11} , β_{22} and β_{33} -adrenergic receptor subtype transcripts in porcine tissues. **J. Anim. Sci.**, v. 77, n. 3, p. 611-21, March, 1999.

- NAFTOLIN, F.; BROWN-GRANT, K.; CORNER, C.S. Plasma and pituitary luteinizing hormone and peripheral plasma oestradiol concentrations in the normal oestrous cycle of the rat after experimental manipulation of the cycle. **J. Endocr.**, v. 53, p. 17-30, 1972.
- NAHMIAS, C., et al. Molecular characterization of the mouse β_3 -adrenergic receptor: relationship with the atypical receptor of adipocytes. **EMBO J.**, v. 10, p. 3721-3727, 1991.
- 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 cycles in the rat. **Biol. Reprod.**, v. 20, p. 659-670, 1979.
- NIMMO, A.J., et al. The presence of beta-adrenoceptors in rat endometrium is dependent on circulating oestrogen. **J. Endocrinol.**, v. 122, n.2, p. R1-4, August, 1989.
- OHSAKA, Y., et al. Comparison of atypical β_3 -adrenoceptor agonists with their respective metabolic activities in rat white adipocytes. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 77, n. 1, p. 41-51, May, 1998.
- PECQUERY, R.; LENEVEU, M.C.; GIUDICELLI, Y. Estradiol treatment decreases the lipolytic responses of hamster white adipocytes through a reduction in the activity of the adenylate cyclase catalytic subunit. **Endocrinology**, v. 118, n. 6, p. 2210-6, June, 1986.
- PECQUERY, R.; LENEVEU, M.C.; GIUDICELLI, Y. Influence of androgenic status on the α_2/β -adrenergic control of lipolysis in white fat cells: predominant α_2 -antilipolytic response in testosterone-treated-castrated hamsters. **Endocrinology**, v. 122, n. 6, p. 2590-2596, 1988.
- PEDERSEN, S.B., et al. Identification of steroid receptors in human adipose tissue. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 26, n. 12, p. 1051-6, December, 1996.
- PEDERSEN, S.B., et al. Nuclear estradiol binding in rat adipocytes. Regional variations and regulatory influences of hormones. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1093, p. 80-86, 1991.
- PREITNER, F., et al. Metabolic response to various beta-adrenoceptor agonists in β_3 -adrenoceptor knockout mice: evidence for a new beta-adrenergic receptor in brown adipose tissue. **Br. J. Pharmacol.**, v. 124, n. 8, p. 1684-8, August, 1998.
- REBOURCET, M.C.; CARPÉNÉ, C.; LAVAU, M. Evidence of functional α_2 -adrenergic receptors in adult-rat adipocytes by using the agonist UK 14304. **Biochem. J.**, v. 252, p. 679-682, 1988.

- REBUFFÉ-SCRIVE, M. Sex steroid hormones and adipose tissue metabolism in ovariectomized and adrenalectomized rats. **Acta Physiol. Scand.**, v. 129, n. 4, p. 471-7, April, 1987.
- REBUFFÉ-SCRIVE, M., et al. Fat cell metabolism in different regions in women. Effect of menstrual cycle, pregnancy, and lactation. **J. Clin. Invest.**, v. 75, n. 6, p. 1973-6, June, 1985.
- REYNISDOTTIR, S., et al. Effects of reduction on the regulation of lipolysis in adipocytes of women with upper-body obesity. **Clin. Sci.**, v. 89, n. 4, p. 421-9, October, 1995.
- ROBERTS, J.M., et al. α -adrenoceptors but not β -adrenoceptors increase in rabbit uterus with oestrogen. **Nature**, v. 270, p. 624-625, 1977.
- 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.
- RODBELL, M. Metabolism of isolated fat cells. **The J. Biol. Chem.**, v. 2, p. 375-380, 1964.
- RODRIGUES, M.L.V.; MARCONDES, F.K.; SPADARI-BRATFISH, R.C. Relationship between sensitivity to adrenaline, plasma corticosterone level and estrous cycle in rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 73, p. 602-607, 1995.
- ROSENBAUM, M., et al. Lack of β_3 -adrenergic effect on lipolysis in subcutaneous adipose tissue. **J. Clin. Endocr. Metab.**, v. 77, n. 2, p. 352-5, August, 1993.
- SAULNIER-BLACHE, J.S., et al. Androgenic regulation of adipocyte α_2 adrenoceptor expression in male and female syrian hamsters: proposed transcriptional mechanism. **Endocrinology**, v. 130, n. 1, p. 316-327, 1992.
- SHAIKI, A.A.; SHAIKI, 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, p. 37-44, 1975.
- SLAVIN, B.G.; ONG, J.M.; KERN, P.A. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. **J. Lipid Res.**, v. 35, n. 9, p. 1535-1541, September, 1994.
- SMITH, E.R.; BOWERS, C.Y.; DAVIDSON, J.M. Circulating levels of plasma gonadotropins in 4 and 5 day cycling rats. **Endocrinology**, v. 93, p. 756-758, 1973.

- SMITH, M.S.; FREMMAN, M.E.; NEILL, J. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. **Endocrinology**, v. 96, p. 219-226, 1975.
- SPADARI-BRATFISCH, R.C., et al. Pharmacological evidence for beta (2)-adrenoceptor in right atria from stressed females rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 77, n. 6, p. 432-440, 1999.
- TAOUI, M., et al. Characterization of dog fat cell adrenoceptors: variations in alpha-2 and beta adrenergic receptors distribution according to the extent of the fat deposits and the anatomical location. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 242, n. 3, p. 1041-1049, May, 1987.
- TAOUI, M., et al. Obesity modifies the adrenergic status of dog adipose tissue. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 250, n. 3, p. 1061-1066, 1989.
- TAVERNIER, G., et al. Expression of beta₃-adrenoceptors with low lipolytic action in human subcutaneous white adipocytes. **J. Lipid Res.**, v. 37, n. 1, p. 87-97, January, 1996.
- TAVERNIER, G., et al. Molecular mechanisms underlying regional variations of catecholamine-induced lipolysis in rat adipocytes. **Am. J. Physiol.**, v. 268, n.6, p. E1135-42, 1995.
- TORRES-MARQUES, E., et al. Characterization of white cell alpha_{1b}-adrenoceptors. **Mol. Pharmacol.**, v. 42, p. 403-406, 1992.
- VAN HARMELEN, V., et al. Noradrenaline-induced lipolysis in isolated mesenteric, omental and subcutaneous adipocytes from obese subjects. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 21, n. 11, p. 972-9, November, 1997.
- VANDERLEI, L.C.M., et al. Influence of the estrous cycle on the sensitivity to catecholamines in right atria from rats submitted to foot-shock stress. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 74, p. 670-678, 1996.
- VIKMAN, H.L., et al. Alpha 2A-adrenergic regulation of cyclic AMP accumulation and lipolysis in human omental and subcutaneous adipocytes. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 20, n. 2, p. 185-9, 1996.
- WEILAND, O. Eine enzymatische methode zur bestimmung von glycerin. **Biochemische Zeitschrift.**, v. 329, p. 313-319, 1957.
- WHEELDON, N.M., et al. Influence of sex-steroid hormones on the regulation of lymphocyte beta₂-adrenoceptors during the menstrual cycle. **Br. J. Pharmacol.**, v. 37, n. 6, p. 583-8, June, 1994.

- WILSON, S., et al. Agonist potency at the cloned human β_3 -adrenoceptor depends on receptor expression level and nature of assay. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 279, n. 1, p. 214-21, October, 1996.
- XIAO, R.; JI, X.; LAKATTA, E.G. Functional coupling of the β_2 -adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. **Mol. Pharmacol.**, v. 47, p. 322-329, 1995.
- YOUNG, W.C.; BOLING, J.L.; BLANDAU, R. The vaginal smear picture, sexual receptivity and time of ovulation in the albino rat. **Anat. Rec.**, v. 80, p.37-45, 1941.