

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Alexandre Reis Taveira de Souza

Estresse e Sensibilidade às Catecolaminas em Átrio de Cobaia

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Alexandre Reis Taveira de
Souza
e aprovada pela Comissão Julgadora.

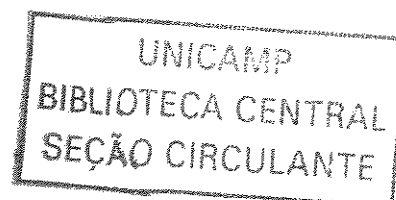
Tese apresentada ao Instituto de Biologia para
Obtenção do Título de Mestre em Biologia
Funcional e Molecular, na Área de Fisiologia

R. C.

Orientadora: Prof. Dra. Regina Célia Spadari-Bratfisch

Campinas
2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL



UNIDADE	B0
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	So 89e
V	
TOMBO BCI	48669
PROC.	16-837102
C	☐ ☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	30/04/02
Nº CPD	

CM00166920-4

BIB ID 238383

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

So89e **Souza, Alexandre Reis Taveira de**
 Estresse e sensibilidade às catecolaminas em átrio de cobaia/
 Alexandre Reis Taveira de Souza. - - Campinas, SP. [s.n.], 2001.
 69f: illus.

Orientadora: Regina Célia Spadari-Bratfisch
 Dissertação(mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia.

1. Stress. 2. Átrio. 3. Catecolaminas. I. Spadari-Bratfisch.
 Regina Célia. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
 Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 10/10/2001

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Regina Célia Spadari-Bratfisch (Orientadora)

.....*R.C.*.....

Profª Drª Dora Maria Grassi-Kassisse

.....*D. Grassi-Kassisse*.....

Prof Dr Luiz Carlos Marques Vanderlei

.....*Luiz Carlos M. Vanderlei*.....

Profª Drª Marta Helena Krieger

.....

06081700000

Às mulheres da minha vida:
Solange e Thaiana

DEDICO

AGRADECIMENTOS

São muitos e é com imenso prazer que serão feitos.

Primeiramente a meus pais, Dalvares Barros de Mattos Júnior e Solange Reis de Souza, pessoas sem as quais nada disso seria possível.

A minha mãe, pelo trabalho árduo, a fim de prover-me estudos da melhor qualidade durante toda a vida.

Ao Professor Doutor Carlos Alberto da Silva, quem primeiro me mostrou o mundo científico, fazendo despertar o interesse pela pós-graduação e pela Fisiologia.

À Professora Doutora Maria Luíza Ozores-Polacow, que em parceria com o Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva, orientou-me na Iniciação Científica.

À Professora Doutora Regina Célia Spadari-Bratfisch, que orientou-me neste trabalho com paciência e confiança, mesmo nos momentos mais difíceis.

À colega Iraídes Nunes Coutinho, pelo auxílio precioso em vários momentos no decorrer deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Estudos do Estresse, no Departamento de Biologia Funcional e Molecular da Unicamp.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Biologia Funcional e Molecular da Unicamp.

A meu grande amigo Ricardo Henrique dos Santos Cota, pelo apoio constante e incondicional.

À Doutora Elisabete Bryan, pela grande força dada em inúmeros momentos da minha vida.

A Renata Coutinho Barillari, por tantos bons momentos, e tanto apoio.

A minha filha Thaiana, que sempre me lembra, com sua doce e constante presença, o quão maravilhosa é a vida.

Finalmente, àquele sem o qual realmente nada seria possível...DEUS.

P.S.: É praticamente impossível lembrar aqui de todos os que tiveram participação direta ou indireta no desenvolver deste trabalho. Entretanto, sou grato a todos.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	vii
Lista de Tabelas	viii
Lista de Figuras	ix
Resumo	xi
Abstract	xii
1. Introdução	1
2. Objetivos	9
3. Material e Métodos	10
3.1. Animais	10
3.2. Grupos Experimentais	10
3.2.1. Controle	10
3.2.2. Estresse Único, por Natação	10
3.2.3. Estresse Repetido, por Natação	11
3.2.4. Estresse Repetido, por Choques nas Patas	11
3.3. Isolamento do Átrio Direito	12
3.4. Análise de Sensibilidade a Agonistas β Adrenérgicos	13
3.5. Fármacos e Soluções	13
3.5.1. TA2005	14
3.6. Análise Estatística	14
4. Resultados	16
4.1. Estresse Único, por Natação	16
4.2. Estresse Repetido, por Natação	18
4.3. Estresse Repetido, por Choques nas Patas	24
5. Discussão	40
6. Conclusões	46
7. Referências Bibliográficas	47
8. Anexo	57

LISTA DE ABREVIACÕES

μM – micromolar

ACTH – hormônio adreno cortico trópico

ADR – adrenalina

AMP – adenosina monofosfato

ARK – quinase do adrenoceptor

cDNA – molécula complementar de ácido desóxiribonucleico

EC_{50} – dose que produz 50% da resposta

gf – grama força

G_i – proteína G inibitória

G_s – proteína G estimulatória

ISO – isoprenalina

M – molar

mA – miliampére

nM – nanomolar

NOR – noradrenalina

pD_2 – logaritmo negativo da dose que produz 50% da resposta

PKA – proteína quinase A

PKC – proteína quinase C

R^2 – coeficiente de correlação linear

Sy.x – desvio padrão das distâncias verticais dos pontos da linha

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito da isoprenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a estresse por natação (sessão única de 50 minutos de duração).....	17
Tabela 2: Efeito da noradrenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a estresse por natação (sessão única de 50 minutos de duração).....	19
Tabela 3: Efeito da adrenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a estresse por natação (sessão única de 50 minutos de duração).....	20
Tabela 4: Efeito da isoprenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a estresse por natação (5, 15 e 30 minutos de duração).....	21
Tabela 5: Efeito da noradrenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a estresse por natação (5, 15 e 30 minutos de duração).....	22
Tabela 6: Efeito da adrenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a estresse por natação (5, 15 e 30 minutos de duração).....	23
Tabela 7: Efeito da isoprenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a estresse repetido por choque nas patas.....	25
Tabela 8: Efeito da noradrenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a estresse repetido por choque nas patas.....	26
Tabela 9: Efeito da adrenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a estresse repetido por choque nas patas.....	27
Tabela 10: Efeito do TA2005 em átrios direitos de cobaias controle e submetidas a estresse por choque nas patas (3 sessões de 30 minutos de duração cada), na presença ou não de CGP20712A, ou de ICI118.551.....	32
Tabela 11: Análise computacional das curvas concentração/efeito ao TA2005, em animais controle ou submetidos a três sessões de choques nas patas, na ausência de antagonista.....	33
Tabela 12: Análise computacional das curvas concentração/efeito ao TA2005, em animais controle ou submetidos a três sessões de choques nas patas, na presença do antagonista ICI118.551.....	35
Tabela 13: Análise computacional das curvas concentração/efeito ao TA2005, em animais controle ou submetidos a três sessões de choques nas patas, na presença do antagonista CGP20712A.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Curvas concentração/efeito à isoprenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a sessão única de natação de 50 minutos de duração.....	17
Figura 2 - Curvas concentração/efeito à noradrenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a sessão única de natação de 50 minutos de duração.....	19
Figura 3 - Curvas concentração/efeito à adrenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a sessão única de natação de 50 minutos de duração.....	20
Figura 4: Curvas concentração/efeito à isoprenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a três sessões de natação com 5, 15 e 30 minutos de duração, aplicadas em dias consecutivos.....	21
Figura 5: Curvas concentração/efeito à noradrenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a três sessões de natação com 5, 15 e 30 minutos de duração, aplicadas em dias consecutivos.....	22
Figura 6: Curvas concentração/efeito à adrenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a três sessões de natação com 5, 15 e 30 minutos de duração, aplicadas em dias consecutivos.....	23
Figura 7: Curvas concentração/efeito à isoprenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle, submetidas a três sessões de choques nas patas com 5, 15 e 30 minutos de duração e a três sessões de choques nas patas de 30 minutos de duração cada, aplicadas em dias consecutivos.....	25
Figura 8: Curvas concentração/efeito à noradrenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle, submetidas a três sessões de choques nas patas com 5, 15 e 30 minutos de duração e a três sessões de choques nas patas de 30 minutos de duração cada, aplicadas em dias consecutivos.....	26
Figura 9: Curvas concentração/efeito à adrenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle, submetidas a três sessões de choques nas patas com 5, 15 e 30 minutos de duração e a três sessões de choques nas patas de 30 minutos de duração cada, aplicadas em dias consecutivos.....	27
Figura 10: Curvas concentração/efeito ao TA2005 em átrios direitos isolados de cobaias controle, na presença e na ausência do antagonista ICI118,551, na concentração 50 nM.....	34
Figura 11: Curvas concentração/efeito ao TA2005 em átrios direitos isolados de cobaias controle, na presença e na ausência do antagonista CGP20712A, na concentração 10 nM.....	34

Figura 12: Curvas concentração/efeito ao TA2005 em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a três sessões de choques nas patas de 30 minutos de duração cada, aplicadas em dias consecutivos.....37

Figura 13: Curvas concentração/efeito ao TA2005 em átrios direitos isolados de cobaias submetidas a três sessões de choques nas patas de 30 minutos de duração cada, aplicadas em dias consecutivos, na presença e na ausência do antagonista ICI 118,551, na concentração 50 nM..... 38

Figura 14: Curvas concentração/efeito ao TA2005 em átrios direitos isolados de cobaias submetidas a três sessões de choques nas patas de 30 minutos de duração cada, aplicadas em dias consecutivos, na presença e na ausência do antagonista CGP 20712A, na concentração 10 nM.....38

Figura 15: Curvas concentração/efeito ao TA2005 em átrios direitos isolados de cobaias controles na presença e na ausência do antagonista ICI 118.551, na concentração 50 nM, e submetidas a três sessões de choques nas patas de 30 minutos de duração cada, aplicadas em dias consecutivos, na presença do mesmo antagonista.....39

Figura 16: Curvas concentração/efeito ao TA2005 em átrios direitos isolados de cobaias controles, na presença e na ausência do antagonista CGP 20712A, na concentração 10 nM, e submetidas a três sessões de choques nas patas de 30 minutos de duração cada, aplicadas em dias consecutivos, na presença do mesmo antagonista.....39

RESUMO

Considerando que tecidos isolados de ratos submetidos a estresse apresentam alterações de sensibilidade às catecolaminas, os objetivos deste trabalho foram verificar se tecidos isolados de cobaias submetidas aos mesmos protocolos experimentais também apresentam alterações similares, levando-se em conta que a proporção de subtipos de adrenoreceptores difere entre átrios direitos das duas espécies.

Nossos resultados mostraram que o estresse por natação ou por choque nas patas induziu alterações na sensibilidade aos efeitos cronotrópicos das catecolaminas, cujas características dependem da intensidade do agente estressor. Átrios direitos de cobaias e de ratos submetidos a estresse por natação apresentaram supersensibilidade à isoprenalina, o que poderia ser causado por redução na captação extraneuronal do agonista. No entanto, cobaias mostraram subsensibilidade à noradrenalina, após uma sessão de natação, o que só ocorre em ratos após a terceira sessão. Nós sugerimos que os mecanismos envolvidos neste processo poderiam ser similares àqueles descritos em ratos, ou seja, diminuição da resposta mediada por adrenoreceptores do subtipo β_1 e/ou aumento da eficiência da captação neuronal do agonista.

Estresse por choques nas patas determinou alterações semelhantes em átrios direitos de ratos e de cobaias, com supersensibilidade à isoprenalina e subsensibilidade à noradrenalina, sugerindo dessensibilização dos adrenoreceptores do subtipo β_1 , acompanhado de aumento da participação do subtipo β_2 na resposta. A análise computacional dos dados e o uso de agonista seletivo para o subtipo β_2 de adrenoreceptores não confirmaram esta hipótese.

ABSTRACT

Considering that isolated tissues of stressed rats show alterations on sensitivity to catecholamines, the objectives of this work was to verify whether isolated tissues from guinea-pigs submitted to the same experimental protocols also show similar alterations.

Our results show that the swimming or footshock stress induce sensitivity alterations of the chronotropic response to catecholamines, which features depend on the intensity of the stressor agent. Right atria from guinea-pigs and rats submitted to swimming stress shows supersensitivity to isoproterenol, probably due to a reduction of the extraneuronal uptake of the agonist. However, atria from guinea-pigs show subsensitivity to norepinephrine after one swimming session, whereas atria from rats only shows subsensitivity to noradrenaline after the third swimming session. We suggest that the mechanisms involved in this process could be similar to those described in rats, i.e., increase in the agonist neuronal uptake efficiency.

Footshock stress induced similar alterations in rats and guinea-pigs right atria; supersensitivity to isoproterenol and subsensitivity to norepinephrine, suggesting β_1 -adrenoceptor desensitization and increase in the β_2 -adrenoceptor participation in the response. The analysis of data performed by Graph Pad Prism on the response to TA2005 did not confirm this hypothesis.

1. INTRODUÇÃO

Sob efeito de agentes agressores externos e/ou internos a integridade ou o equilíbrio orgânico podem ser ameaçados, colocando em risco a vida do indivíduo. Como defesa, 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.

Essas adaptações, que mantêm a homeostase, são provocadas pela atuação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e foram descritas e denominadas em 1936, por SELYE, como “Síndrome Geral de Adaptação”.

SELYE chegou a essa denominação realizando experimentos que tinham por objetivo a caracterização do efeito de hormônios ovarianos. Observou que em ratos 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, 1936; DUARTE, 1986; SAPOLSKY, 1990).

Os estudos de SELYE passaram então a ser realizados com as substâncias que eram utilizadas no preparo dos extratos hormonais. O formol, um desses produtos, quando injetado nos animais, produziu alterações semelhantes às observadas anteriormente. A utilização de outros agentes, como calor, frio, agentes biológicos, irradiações e exercícios, produziram os mesmos efeitos iniciais (DUARTE, 1986).

Baseando-se nestas experiências, SELYE descreveu a “Síndrome Geral da 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 estivesse adaptado. Esse estágio seria seguido pela fase de resistência, se o estímulo fosse mantido ou repetido, ocorrendo, nessa fase, o desenvolvimento de mecanismos

adaptativos. Se essa adaptação não ocorresse, o estágio seguinte seria o de exaustão, tornando o organismo susceptível a vários distúrbios patológicos (SELYE, 1936; VAN de KAR et al, 1991).

Inicialmente, a Síndrome Geral de Adaptação foi descrita como uma reação geral e inespecífica (SELYE, 1936). Contudo, a evolução dos estudos sobre estresse evidenciou seu caráter específico (MASON, 1968a; MASON, 1968b; KRULICH et al., 1974; HENNESSY et al., 1979; HERD, 1991) e a influência de características genéticas (MARPLE et al., 1972), do sexo (LESCOAT et al., 1970; ANISCHENKO & GUDKOVA, 1992; PARÉ & REDEI, 1993), da idade (RIEGLE, 1973) e, principalmente, da percepção individual do agente como sendo estressor, o que depende de experiências prévias vividas pelo animal e da novidade ou previsibilidade do estímulo (VOGEL & JENSH, 1988; GRIFFIN, 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 nervosa, ativa ou inibe o eixo hipotálamo-hipófise (ELIOT, 1992), promovendo alterações na secreção de vários hormônios, tais como o hormônio do crescimento (KRULICH et al., 1974; SEGGIE & BROWN, 1975; LUGER et al., 1988), hormônio luteinizante (KRULICH et al., 1974; EUKER et al., 1975), hormônio folículo-estimulante (KRULICH et al., 1974), prolactina (SEGGIE & BROWN, 1975; EUKER et al., 1975; KANT et al., 1983; BÁNKY et al., 1994) e tireotropina (MILLS & CHIR, 1985).

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

As catecolaminas exercem sua ação por meio de interação com receptores específicos, localizados na membrana plasmática das células de diferentes tecidos, modulando inúmeras respostas fisiológicas. AHLQUIST (1948) classificou esses receptores em α e β , com base nas potências de vários agonistas. Os adrenoceptores α foram caracterizados pela seguinte série de potências relativas: adrenalina > noradrenalina >> isoprenalina, enquanto a série de potências definida para os adrenoceptores β foi: isoprenalina > adrenalina > noradrenalina (STILES et al., 1984).

Verificou-se, posteriormente, que 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., 1994; STROSBURG, 1995). Estas diferenças permitiram a identificação de dois subtipos de adrenoceptores α (BOYAJIAN & LESLIE, 1987; HAN et al., 1987). Os adrenoceptores α_1 atuam modulando os níveis de fosfatidil inositol e o fluxo celular de íons cálcio. Os adrenoceptores α_2 , através da ativação de uma proteína G_i , produzem inibição da adenilil ciclase, com consequente redução nos níveis intracelulares de AMP cíclico (FAIN & GARCIA-SÁINZ, 1980; LIMBIRD, 1984; HOMCY & GRAHAM, 1985).

Os adrenoceptores β foram classificados em três subtipos (LANDS et al., 1967a; LANDS et al., 1967b; SANO et al., 1993). Os estudos de biologia molecular permitiram a clonagem do cDNA dos adrenoceptores β_1 (FRIELLE et al., 1987), β_2 (DIXON et al., 1986) e β_3 (EMORINE et al., 1989). Os três subtipos de adrenoceptores β atuam através do acúmulo de AMP cíclico, como resultado da ativação da enzima adenilil ciclase por uma proteína G_s (LEFKOWITZ et al., 1982; LIMBIRD, 1984; STILES & LEFKOWITZ, 1984; STILES et al., 1984). O aumento na concentração de AMP cíclico estimula enzimas do tipo quinase A, as quais desencadeiam as respostas fisiológicas subsequentes (BERRIDGE, 1985). Atualmente, em virtude das semelhanças de diferenças entre os subtipos,

consideram-se três tipos de adrenoceptores: α_1 , α_2 e β , cada um deles podendo ser subdividido em tres subtipos (BYLUND et al., 1998).

Os adrenoceptores β são proteínas constituídas 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 às 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., 1987; STRADER et al., 1989; JASPER & INSEL, 1992; COLLINS, 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, que é hidrofóbica (DIXON et al., 1987).

Os locais identificados como fundamentais para essa ligação são dois resíduos de aspartato e dois resíduos de serina. Os resíduos de aspartato estão localizados nas segunda (Asp⁷⁹) e na terceira (Asp¹¹³) hélices transmembrana, enquanto que os dois resíduos de serina estão localizados na quinta hélice (Ser²⁰⁴ e Ser²⁰⁷; STRADER et al., 1989; TOTA et al., 1991; JASPER & INSEL, 1992; COLLINS, 1993) da região transmembrana.

A ligação do agonista produz alterações conformacionais no receptor, promovendo a sua interação com uma segunda proteína, denominada proteína G (COLLINS, 1993).

KOBILKA et al. (1988), usando quimeras de adrenoceptores α_2 e β_2 , propuseram que a quinta e a sexta hélices da região transmembrana, juntamente com a terceira alça citoplasmática, seriam as regiões responsáveis pelo acoplamento do receptor ocupado à proteína G. Além disso, HAUSDORFF et al. (1990b) demonstraram que a porção carboxila terminal da terceira alça citoplasmática no adrenoceptor β_2 também seria importante no acoplamento do receptor à proteína G.

As regiões citoplasmáticas dos receptores possuem grande importância funcional, pois, além do acoplamento entre o receptor e 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., 1990a; LEFKOWITZ et al., 1990).

A dessensibilização é um estado de diminuição da resposta celular que ocorre após a exposição a agonistas, hormônios ou drogas (STILES et al., 1984), visando finalizar ou atenuar a resposta (LOHSE, 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, 1983; SIBLEY & LEFKOWITZ, 1985; LOHSE, 1993). O desacoplamento entre o receptor e a proteína G é um mecanismo que ocorre rapidamente, como consequência da fosforilação do receptor (LOHSE, 1993). Este processo seria devido à ação de proteínas quinases A (PKA) e C (PKC; HAUSDORFF et al., 1990a; ZHOU & FISHMAN, 1991; LOHSE, 1993), e pela ação de uma proteína quinase específica do adrenoceptor β (β ARK), que produziria fosforilação do receptor β -adrenérgico somente quando ele estivesse ocupado por agonistas (BENOVIC et al., 1989; BENOVIC et al., 1991).

A fosforilação do receptor pela β ARK não produziria alterações na capacidade do receptor em ativar a proteína G. Contudo, a indução desse processo aumentaria a afinidade do receptor por outra proteína, denominada β -arrestina, que ao ligar-se ao receptor, impediria a sua interação com a proteína G, produzindo o fenômeno de dessensibilização (LOHSE et al., 1990b; LOHSE et al., 1992).

Os locais de fosforilação do receptor pela β ARK seriam 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., 1987; HAUSDORFF et al., 1990a; LEFKOWITZ et al., 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, 1983; LOHSE, 1993).

O sequestro do receptor e a sua fosforilação pela PKA ou pela β 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., 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., 1989; LOHSE et al., 1990a; LOHSE, 1993).

Além dos mecanismos de fosforilação e sequestro, a dessensibilização pode ser produzida pela redução do 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, 1993; COLLINS et al., 1991). A redução do número de receptores pode ser consequência de um aumento na sua degradação e/ou da diminuição de sua síntese (LOHSE, 1993; BOUVIER et al., 1989).

Ao contrário da “down-regulation”, a ação de antagonistas (HEDBERG et al., 1986) ou hormônios (DAVIES & LEFKOWITZ, 1984; WILLIAMS et al., 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.

Em situações de estresse, os adrenoceptores são ativados pela noradrenalina, liberada principalmente pelas terminações nervosas simpáticas, e pela adrenalina, liberada pela medula da adrenal. Além disso, ocorre aumento dos níveis plasmáticos de glicocorticóides e de progesterona, liberados pelo córtex adrenal (MARCONDES, 1998).

Inúmeros autores demonstraram que ocorrem alterações na sensibilidade às catecolaminas em tecidos isolados de ratos submetidos a estresse. As características destas alterações dependem do agente estressor, do paradigma experimental, e do sexo do animal. Em átrios direitos isolados de ratos submetidos a uma ou três sessões de natação, foi possível observar alterações relacionadas à inibição dos sistemas de metabolização das catecolaminas (SPADARI et al., 1988) e à alteração na constante de afinidade de antagonistas pelos receptores adrenérgicos (SPADARI & DE MORAES, 1988), o que sugere alterações na estrutura dos adrenoceptores. Os autores propuseram que ambos os mecanismos seriam dependentes do aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona, induzido pela exposição ao estímulo estressor, com base na observação que a adrenalectomia bilateral impediu o aparecimento de tais alterações (SPADARI et al., 1988; SPADARI & DE MORAES, 1988).

Por outro lado, BASSANI & DE MORAES (1988) demonstraram que, em átrios direitos de ratos submetidos a choques nas patas, ocorria também subsensibilidade da resposta a agonistas seletivos para adrenoceptores β_1 as quais foram atribuídas a alterações conformacionais nos adrenoceptores. Mas, além disso havia aumento da sensibilidade a agonistas não seletivos, demonstrando assim a ocorrência de aumento da resposta mediada pelo subtipo β_2 . Posteriormente, SPADARI-BRATFISCH et al. (1999) confirmaram que, em ratas sacrificadas no diestro, havia aumento da sensibilidade ao agonista seletivo para adrenoceptores β_2 , TA2005, o qual era cancelado pelo antagonista seletivo para adrenoceptores β_2 , ICI188551 mas não por CGP20712A, um antagonista seletivo para o subtipo β_1 .

Em fêmeas, tanto MARCONDES et al. (1996), utilizando estresse por natação, quanto VANDERLEI et al. (1996), que utilizaram estresse por choque nas patas, observaram que, após três sessões de estresse, quando as ratas eram sacrificadas em diestro, o tecido atrial apresentou alterações de sensibilidade semelhantes àquelas descritas em machos. Contudo, quando o sacrifício ocorreu em estro, não foram observadas alterações de sensibilidade, neste tecido, às catecolaminas. Os autores concluíram que as alterações de sensibilidade do tecido

atrial, observadas em ratas submetidas a estresse por natação ou choque nas patas, são dependentes das fases do ciclo estral, além de confirmarem que tais alterações ocorrem na vigência de níveis plasmáticos elevados de corticosterona (MARCONDES, 1995; MARCONDES, 1998).

Vários outros autores também relataram alterações de sensibilidade adrenérgica em tecidos isolados de animais submetidos a estresse por frio, restrição alimentar, exercício físico, imobilização, natação ou choque nas patas (U'PRICHARD & KVETNANSKY, 1980; NOMURA et al., 1981; BASSANI & DE MORAES, 1987 a, b; SPADARI & DE MORAES, 1988).

Em átrios direitos isolados de ratos, a população de adrenoceptores mediando a resposta cronotrópica às catecolaminas é formada principalmente pelo subtipo β_1 enquanto que o subtipo β_2 contribui com apenas uma pequena proporção da resposta à adrenalina (KAUMANN, 1986).

Em átrio de cobaia, por outro lado, estudos funcionais (VOSS et al., 1992; VOSS et al., 1994) e de "binding" de compostos radioativos (JOHANSSON & PERSSON, 1983; O'DONNELL & WANSTALL et al., 1985; MOLENAAR & SUMMERS, 1987) indicam que ambos os subtipos contribuem para a resposta cronotrópica às catecolaminas. Embora o principal subtipo também seja o adrenoceptor β_1 , esta resposta também pode ser eliciada pela estimulação de adrenoceptores β_2 . Os subtipos estariam presentes na proporção de 75% e 25%, respectivamente (MOLENAAR & SUMMERS, 1987).

Um estudo realizado por MOLENAAR et al. (1987) mapeou a distribuição dos subtipos de adrenoceptores em coração de cobaia e confirmou a presença de adrenoceptores β_1 e β_2 neste órgão, com predominância do subtipo β_1 .

Neste contexto, este trabalho teve o objetivo de verificar se os paradigmas de estresse empregados anteriormente, e que causaram alterações de sensibilidade da resposta às catecolaminas em tecidos isolados de ratos, causariam alterações semelhantes em átrios direitos de cobaias, levando-se em conta as diferenças na proporção de adrenoceptores entre as duas espécies apontadas acima.

2. OBJETIVOS

- 1 - Estudar a sensibilidade aos efeitos cronotrópicos das catecolaminas de átrios direitos isolados de cobaias (*Cavia porcellus*) machos submetidos a diferentes condições de estresse;
- 2 - analisar o efeito do TA2005 (agonista seletivo de adrenoceptores β_2) sobre os átrios direitos desses animais;
- 3 - analisar o antagonismo dos efeitos do TA2005 por antagonistas competitivos e seletivos para os subtipos de adrenoceptores β_1 (CGP20712A) ou β_2 (ICI118,551); e
- 4 - comparar os resultados obtidos no presente trabalho, com aqueles relatados em átrios direitos de ratos submetidos a condições semelhantes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizadas cobaias (*Cavia porcellus*) adultos, machos, pesando entre 400 e 500 gramas, que foram gentilmente doados pelo Laboratório de Referência Animal - LARA, do Ministério da Agricultura. Os animais foram alojados em grupos de cinco, em caixas de polietileno (100x70x70cm), com ciclo de 12 horas de claro/ 12 horas de escuro, sendo as luzes acesas às 6:30 h. Água e ração Nutricobaia[®] (Purina) para cobaias foram oferecidas "ad libitum", sendo que à água de beber foi adicionado o suplemento alimentar Vitagold[®] (Tortuga S.A.), à concentração de 2 ml/L, a fim de garantir o fornecimento de vitamina C aos animais.

Os animais foram tratados de acordo com os princípios para uso de animais em pesquisa e educação aceitos internacionalmente.

3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

3.2.1. Controle.

Os animais do grupo controle não sofreram nenhum tipo de manipulação, com exceção daquelas necessárias para a sua manutenção. Após pelo menos uma semana de permanência no biotério, esses animais foram sacrificados por concussão cerebral e imediata secção dos vasos cervicais e da medula espinhal, e seus átrios direitos isolados para análise de sensibilidade a agonistas de receptores β .

3.2.2. Estresse único, por natação.

Os animais deste grupo foram submetidos a uma sessão de natação, sendo para isso colocados individualmente em um tanque de cimento medindo 100x80x80 cm, contendo água aquecida a 35°C +/- 1°C, a uma profundidade de 35 cm. A sessão teve duração de 50 minutos. Imediatamente após terem sido retirados do tanque de natação os animais foram sacrificados da mesma forma que no grupo controle.

3.2.3. Estresse repetido, por natação.

Os animais deste grupo foram submetidos a três sessões de natação, em dias consecutivos, com duração de 5, 15 e 30 minutos, respectivamente, sendo que após a última sessão os mesmos foram sacrificados da mesma forma que no grupo controle.

3.2.4. Estresse repetido, por choque nas patas.

Os animais deste grupo foram submetidos a três sessões de choques nas patas, em dias consecutivos, sendo que após a última sessão os mesmos foram sacrificados da mesma forma que no grupo controle. A duração de cada sessão foi de 5, 15 e 30 minutos em um primeiro protocolo e três sessões de 30 minutos cada, em outro. A sessão de choque foi aplicada em uma câmara de acrílico com 26 cm de comprimento, 21 cm de largura e 26 cm de altura, sendo sua base constituída de barras de metal com 0,3 cm de diâmetro, com espaçamento de 1 cm entre elas, por onde o choque elétrico era aplicado. A corrente foi controlada por sistema computadorizado construído no Departamento de Engenharia Biomédica da Universidade Estadual de Campinas. Cada animal recebeu 120 choques com intensidade de 1,0 mA e duração de um segundo. Os pulsos foram separados por intervalos randomizados variando de 5 a 25 segundos, com intervalo médio de 15 segundos (HOFFMAN & FLESHLER, 1962).

3.3. ISOLAMENTO DO ÁTRIO DIREITO

As sessões de estresse ocorreram sempre entre 7:30 e 11:00 h. O coração foi rapidamente removido, o átrio direito foi excisado, assegurando-se que o nodo sinoatrial permanecesse intacto, e preparado para registro isométrico das contrações espontâneas, sob tensão diastólica de 0,5 gf, em uma cuba para órgão isolado, contendo 40 mL de solução de Krebs-Henseleit, com a seguinte composição química, em mM: NaCl, 115,0; KCl, 4,6; CaCl₂ 2H₂O, 2,5; KH₂PO₄, 1,2; MgSO₄ 7H₂O, 2,5; NaHCO₃, 25,0; glicose, 11,0; ácido ascórbico 0,11, piruvato de Na, 2,0; Ca EDTA, 0,5 (MOLENAR & SUMMERS, 1987).

O líquido de incubação foi mantido a 36,5 +/- 0,1°C com auxílio de uma bomba de perfusão, e saturado com 95%O₂ - 5%CO₂ (pH = 7,4).

Para registro das contrações espontâneas o tecido foi conectado a um transdutor isométrico de tensão (Narco Biosystem, F-60), o qual encontrava-se conectado a um polígrafo Narco Biosystem, modelo Narcotrace, de 4 canais.

As preparações foram incubadas até a obtenção de uma frequência estável de batimentos espontâneos. Cerca de 15% dos átrios, em cada grupo experimental, que apresentaram irregularidades rítmicas ou que não estabilizaram sua frequência após 60 minutos de incubação, foram descartados. Durante o período de estabilização o líquido de incubação foi substituído em intervalos de 15 minutos.

3.4. ANÁLISE DE SENSIBILIDADE A AGONISTAS β ADRENÉRGICOS

Foram obtidas curvas concentração/efeito à adrenalina, noradrenalina, isoproterenol e TA2005, nas quais analisamos o efeito cronotrópico dessas drogas nos átrios direitos. Para a obtenção destas curvas foi utilizado o método cumulativo (VAN ROSSUM, 1963). O efeito máximo foi determinado quando três concentrações sucessivas e crescentes do agonista não alteraram a resposta obtida com a concentração imediatamente anterior.

A sensibilidade do átrio direito aos agonistas foi avaliada pela determinação do valor pD_2 . Este corresponde ao logaritmo negativo da concentração molar do agonista que determina um efeito correspondente a 50% do efeito máximo, em experimentos individuais. Os valores pD_2 foram expressos como médias aritméticas, com seus respectivos erro padrão da média. As variações de sensibilidade foram estimadas pelos quocientes dos valores pD_2 .

Nos experimentos realizados na presença dos antagonistas ICI118,551 e CGP20712A, estes foram adicionados às cubas onde os átrios se encontravam após a estabilização da frequência de batimentos espontâneos, sendo deixados atuando durante uma hora, após o que iniciaram-se as curvas concentração/efeito aos agonistas, sem a troca das soluções presentes nas cubas.

3.5. FÁRMACOS E SOLUÇÕES

Para a solução de Krebs-Henseleit foram utilizados sais de padrão analítico (A.C.S.) e água desionizada.

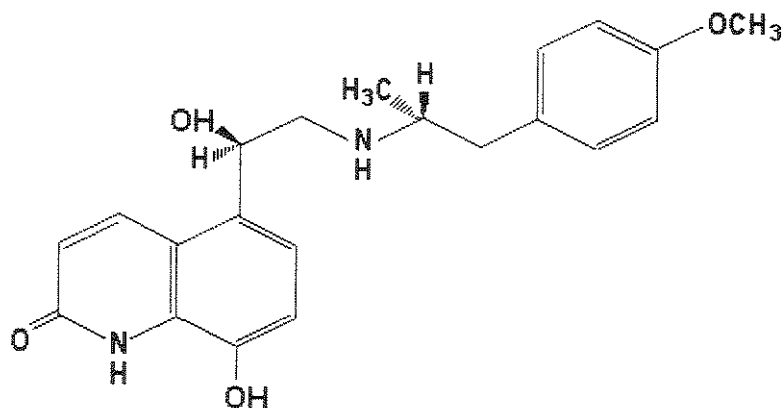
Os fármacos utilizados foram (-) adrenalina, (-) isoprenalina e (-) noradrenalina, adquiridos da Sigma Chemical Co.; CGP20712A ($C_{24}H_{29}F_3N_4O_8S$) e ICI118,551 ($C_{17}H_{27}NO_2.HCl$) foram adquiridos da Research Biochemicals International (RBI). O TA2005 foi gentilmente cedido pelo Dr. L. A. Barker.

As soluções-estoque foram preparadas em solução aquosa de ácido ascórbico a 2% e armazenadas a $-20^{\circ}C$, por uma semana. As diluições foram feitas em solução de Krebs-Henseleit imediatamente antes do uso, sendo descartadas em seguida.

5.1. TA2005

O TA2005 é um componente relativamente novo, com potente ação broncodilatadora, que apresenta uma forte ligação com o adrenoceptor β_2 . As bases moleculares envolvidas na ligação do TA2005 ao adrenoceptor β_2 parecem ser diferentes daquelas observadas na isoprenalina, sendo provável que o mecanismo de ativação seja diferente (VOSS et al., 1992).

A seguir, a fórmula estrutural do TA2005 ($C_{21}H_{25}N_2O_4Cl$).



3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados empregando-se o teste "t" de Student ou análise de variância, seguido do teste de Scheffé (ZAR, 1984), utilizando o programa Systat, (Systat, Inc.). As análises de regressão linear, não

linear, os gráficos e os cálculos matemáticos foram feitos com o auxílio do programa GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.).

4. RESULTADOS

Os resultados referentes a cada tipo de estresse serão apresentados e comentados separadamente, analisando as respostas máximas e valores pD_2 dos agonistas, considerados como sendo indicativos da sensibilidade dos tecidos.

Em cada experimento obtivemos curvas concentração/efeito aos agonistas de adrenoceptores, sendo que as variações de sensibilidade foram determinadas considerando-se os deslocamentos horizontais das mesmas.

Nas figuras a seguir o eixo das ordenadas apresenta as alterações de frequência de batimentos em resposta às diferentes doses do agonista. O eixo das abcissas representa as doses do agonista, expressas em logaritmo negativo da concentração molar.

Nenhum dos procedimentos induziu alterações na frequência de batimentos espontâneos dos átrios direitos isolados de cobaias.

4.1. Estresse Único, por Natação

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos em experimentos com isoprenalina como agonista. Podemos observar a ocorrência de supersensibilidade ao agonista em átrios direitos dos animais submetidos à condição estressora, quando comparados com o grupo controle, com a curva concentração/efeito apresentando um deslocamento paralelo à esquerda, de 2.3 vezes. Nesse protocolo experimental a resposta máxima dos átrios ao agonista de adrenoceptores β não se alterou. A figura 1 ilustra esses resultados.

Tabela 1: Efeito da isoprenalina em átrios direitos isolados de cobaias controles e submetidas a estresse por natação (sessão única de 50 minutos de duração).

	n^a	Frequência Inicial^b (bat/min)	Resposta Máxima^b (bat/min)	pD₂^{b, c}
Controle	6	170 ± 3	138 ± 9	8,08 ± 0,10
Natação	5	178 ± 8	148 ± 12	8,45 ± 0,04*

a - número de experimentos em cada grupo

b - valores médios seguidos dos respectivos erros padrão das médias

c - logaritmo negativo da concentração molar do agonista que produz 50% da resposta máxima

* - diferença estatisticamente significativa em relação ao controle; $p < 0,05$, teste "t" de Student

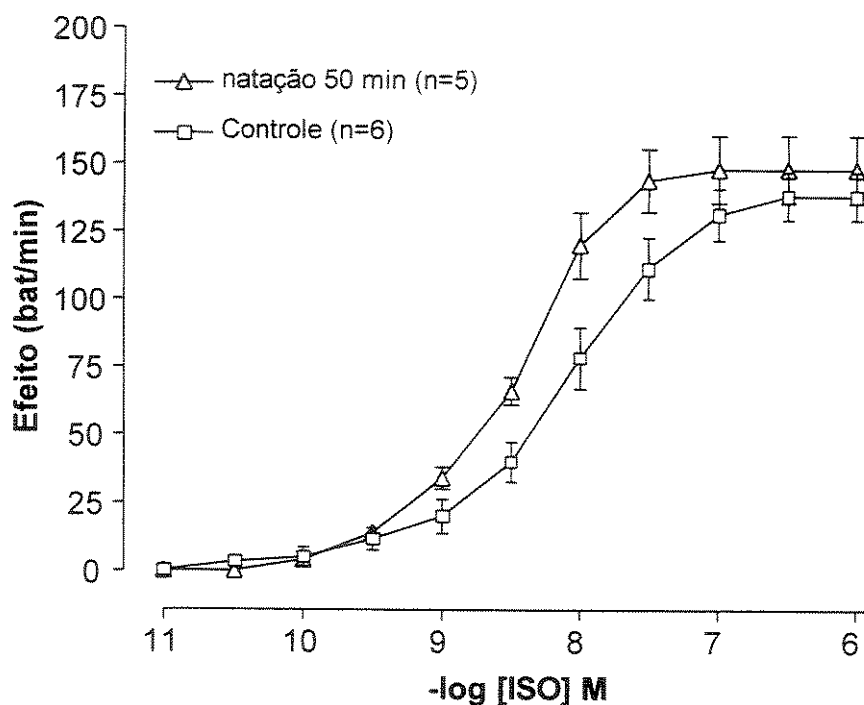


Figura 1: Curvas concentração/efeito à isoprenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a sessão única de natação de 50 minutos de duração.

Na Tabela 2 podemos observar a ocorrência de subsensibilidade à noradrenalina em átrios direitos de cobaias submetidas à condição estressora, quando comparados com o grupo controle, não apresentando diferença na resposta máxima ao agonista seletivo de adrenoceptores β_1 , enquanto observamos um deslocamento à direita de 8,5 vezes (Figura 2). Entretanto, não houve alteração estatisticamente significativa de sensibilidade para a adrenalina (Tabela 3, Figura 3), uma vez que tanto a resposta máxima quanto o valor pD_2 deste agonista de adrenoceptores não apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle.

4.2. Estresse Repetido, por Natação.

Na Tabela 4 podemos observar que não ocorreu nenhuma alteração de sensibilidade à isoprenalina em átrios direitos isolados de cobaias submetidas a três sessões de natação, quando comparados com o grupo controle (Figura 4). Entretanto, houve subsensibilidade à noradrenalina em átrios direitos de cobaias submetidas ao estresse, quando comparados com o grupo controle, com um deslocamento à direita de 11 vezes nas curvas concentração/efeito (Figura 5 e Tabela 5). Nesses dois protocolos também não encontramos diferenças significativas nas respostas máximas dos átrios aos agonistas de adrenoceptores.

Tabela 2: Efeito da noradrenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a estresse por natação (sessão única de 50 minutos de duração).

	n^a	Frequência Inicial ^b (bat/min)	Resposta Máxima ^b (bat/min)	$pD_2^{b, c}$
Controle	7	176 ± 6	130 ± 5	$7,28 \pm 0,17$
Natação	6	200 ± 9	143 ± 7	$6,35 \pm 0,18^*$

a - número de experimentos em cada grupo

b - valores médios seguidos dos respectivos erros padrão das médias

c - logaritmo negativo da concentração molar do agonista que produz 50% da resposta máxima

* - diferença estatisticamente significativa em relação ao controle; $p < 0,05$, teste "t" de Student

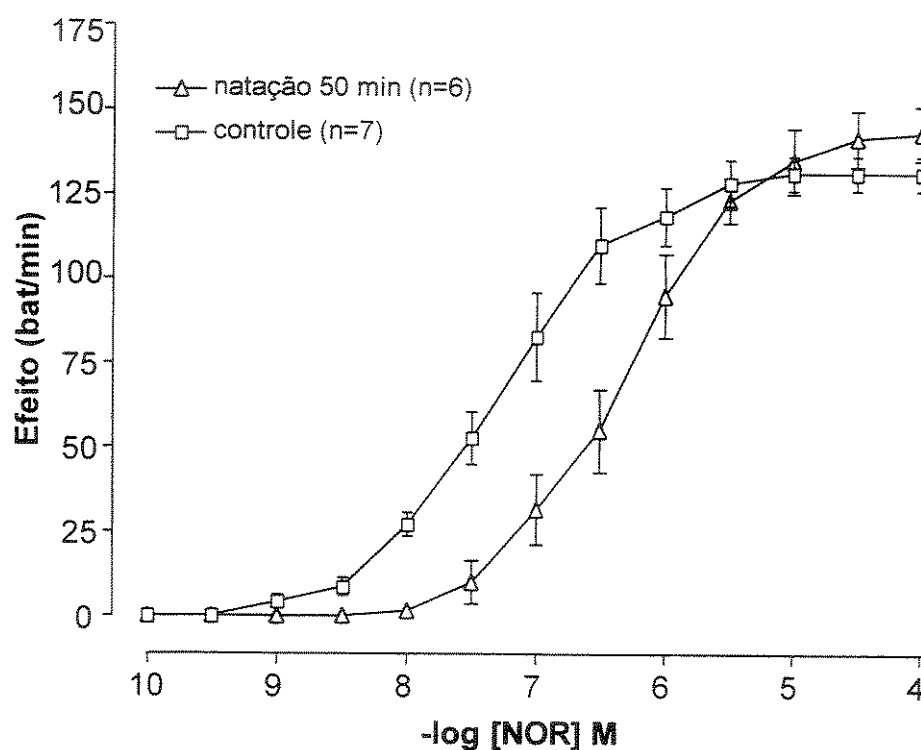


Figura 2: Curvas concentração/efeito à noradrenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a sessão única de natação de 50 minutos de duração.

Tabela 3: Efeito da adrenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a estresse por natação (sessão única de 50 minutos de duração).

	n^a	Frequência Inicial ^b (bat/min)	Resposta Máxima ^b (bat/min)	$pD_2^{b, c}$
Controle	7	167 ± 2	137 ± 7	$6,52 \pm 0,08$
Natação	6	192 ± 9	145 ± 10	$6,49 \pm 0,14$

a - número de experimentos em cada grupo

b - valores médios seguidos dos respectivos erros padrão das médias

c - logaritmo negativo da concentração molar do agonista que produz 50% da resposta máxima

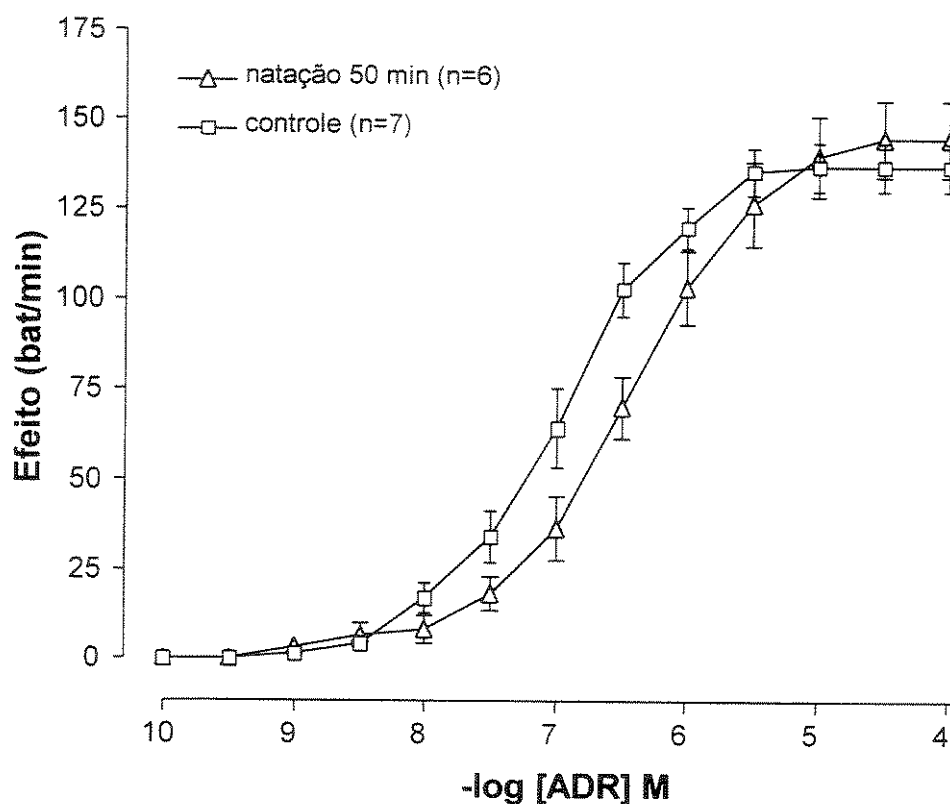


Figura 3: Curvas concentração/efeito à adrenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a sessão única de natação de 50 minutos de duração.

Tabela 4: Efeito da isoprenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a estresse por natação (5, 15 e 30 minutos de duração).

	n ^a	Frequência Inicial ^b (bat/min)	Resposta Máxima ^b (bat/min)	PD ₂ ^{b, c}
Controle	6	170 ± 3	138 ± 9	8,08 ± 0,10
Natação	6	180 ± 7	135 ± 12	8,14 ± 0,10

a - número de experimentos

b - valores médios seguidos dos respectivos erros padrão das médias

c - logaritmo negativo da concentração molar do agonista que produz 50% da resposta máxima

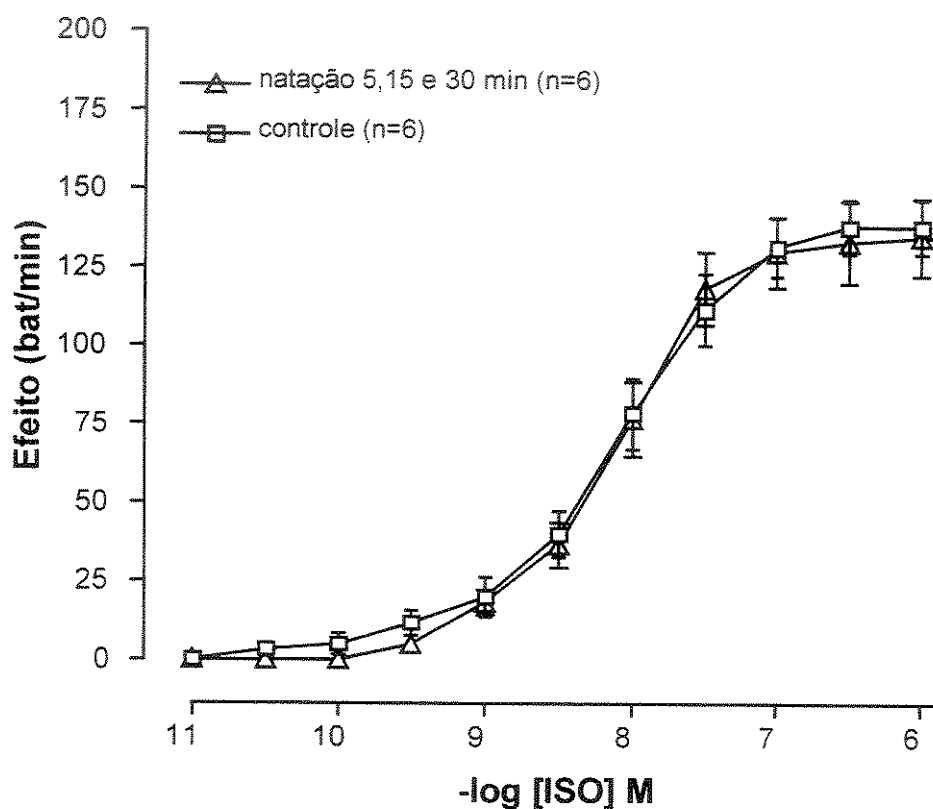


Figura 4: Curvas concentração/efeito à isoprenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a três sessões de natação com 5, 15 e 30 minutos de duração, aplicadas em dias consecutivos.

Tabela 5: Efeito da noradrenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a estresse por natação (5, 15 e 30 minutos de duração).

	n ^a	Frequência Inicial ^b (bat/min)	Resposta Máxima ^b (bat/min)	pD ₂ ^{b, c}
Controle	7	176 ± 6	130 ± 5	7,28 ± 0,17
Natação	7	176 ± 7	136 ± 8	6,24 ± 0,10*

a - número de experimentos

b - valores médios seguidos dos respectivos erros padrão das médias

c - logaritmo negativo da concentração molar do agonista que produz 50% da resposta máxima

* - diferença estatisticamente significativa em relação ao controle; p<0,05, teste "t" de Student

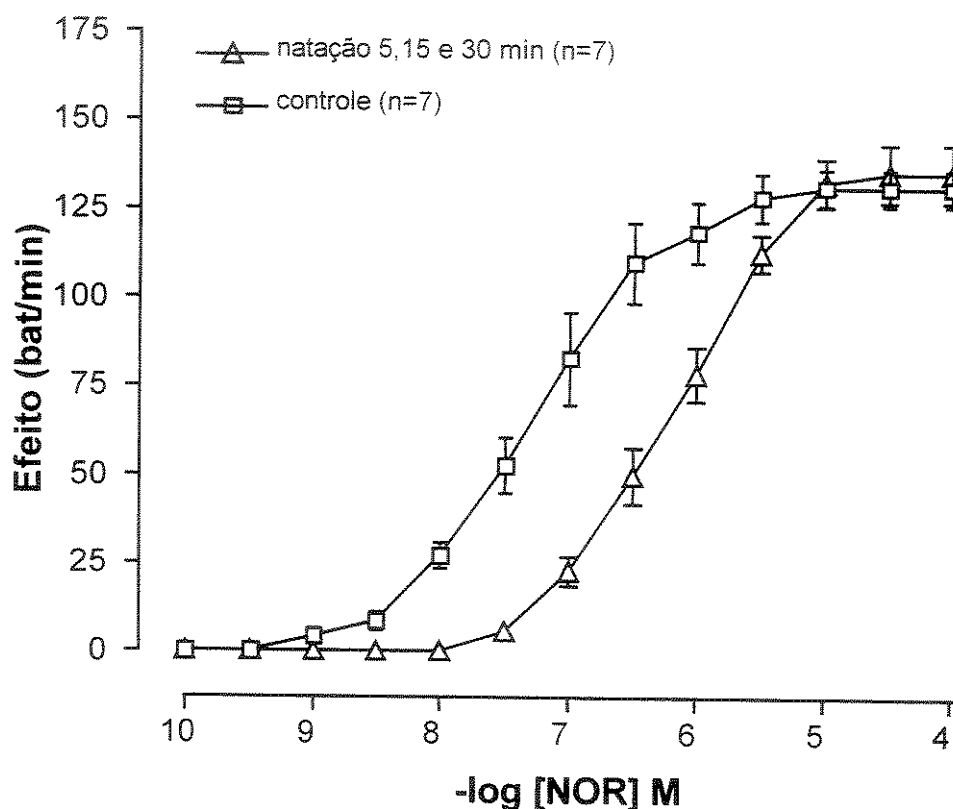


Figura 5: Curvas concentração/efeito à noradrenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a três sessões de natação com 5, 15 e 30 minutos de duração, aplicadas em dias consecutivos.

A Tabela 6 mostra os resultados obtidos em experimentos com adrenalina como agonista e podemos observar que não ocorreu nenhuma alteração significativa de sensibilidade em átrios direitos isolados de cobaias submetidas a três sessões de natação, quando comparados com o grupo controle. A Figura 6 ilustra esses resultados.

Tabela 6: Efeito da adrenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a estresse por natação (5, 15 e 30 minutos de duração).

	n^a	Frequência Inicial^b (bat/min)	Resposta Máxima^b (bat/min)	PD₂^{b, c}
Controle	7	167 ± 2	137 ± 7	6,52 ± 0,08
Natação	7	173 ± 6	133 ± 6	6,46 ± 0,16

a - número de experimentos

b - valores médios seguidos dos respectivos erros padrão das médias

c - logaritmo negativo da concentração molar do agonista que produz 50% da resposta máxima

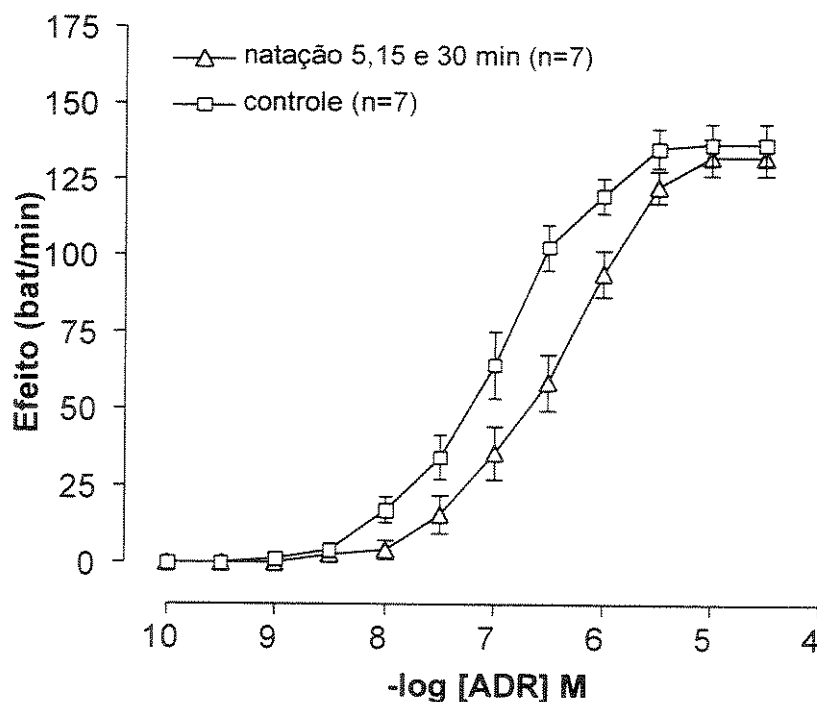


Figura 6: Curvas concentração/efeito à adrenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a três sessões de natação com 5, 15 e 30 minutos de duração, aplicadas em dias consecutivos.

4.3. Estresse Repetido, por Choques nas Patas.

Átrios direitos isolados de cobaias submetidas a estresse repetido por choques nas patas apresentaram supersensibilidade à isoprenalina, independente da duração de cada sessão, sendo que no grupo que foi submetido a sessões de 5, 15 e 30 minutos ocorreu um deslocamento à esquerda, da curva concentração/efeito à isoprenalina da ordem de 8,7 vezes, enquanto que em átrios de cobaias submetidas a três sessões de trinta minutos cada, o deslocamento foi de 5,8 vezes, quando comparado com o grupo controle (Figura 7 e Tabela 7). A diferença de deslocamento das curvas concentração/efeito entre os dois grupos de animais estressados não foi significativa. Também não houve alteração nos valores de resposta máxima à isoprenalina ($p > 0,05$; Tabela 7).

Quando o agonista utilizado foi a noradrenalina observamos subsensibilidade nos dois grupos, sendo que no grupo submetido a sessões de 5, 15 e 30 minutos ocorreu um deslocamento à direita da curva concentração/efeito de 7,4 vezes e no grupo submetido a três sessões de trinta minutos o deslocamento foi de 5,6 vezes, quando comparados com o grupo controle (Figura 8 e Tabela 8), novamente sem ocorrer diferença entre os grupos submetidos a estresse. Também não houve alteração na resposta máxima.

Os resultados obtidos em experimentos com adrenalina como agonista mostraram que não houve qualquer alteração de sensibilidade em átrios direitos de cobaias submetidas à condição estressora, em nenhum dos dois grupos estudados quando comparados com o grupo controle. Os resultados encontram-se expressos na Tabela 9 e na Figura 9.

Tabela 7: Efeito da isoprenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a estresse repetido por choque nas patas.

	n ^a	Frequência Inicial ^b (bat/min)	Resposta Máxima ^b (bat/min)	pD ₂ ^{b, c}
Controle	6	170 ± 3	138 ± 9	8,08 ± 0,10
Choque 5, 15, 30	5	186 ± 14	110 ± 8	9,02 ± 0,30*
Choque 30, 30, 30	6	205 ± 12	110 ± 12	8,84 ± 0,20*

a - número de experimentos

b - valores médios seguidos dos respectivos erros padrão das médias

c - logaritmo negativo da concentração molar do agonista que produz 50% da resposta máxima

* - diferença estatisticamente significativa em relação ao controle; p<0,05, ANOVA e teste de Scheffé

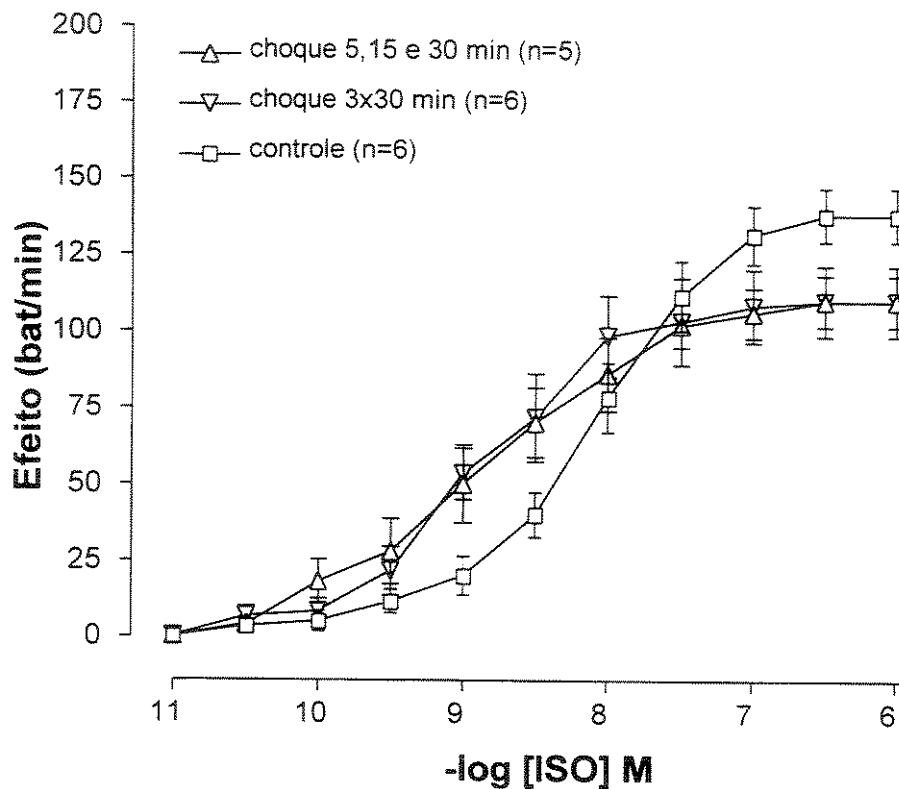


Figura 7: Curvas concentração/efeito à isoprenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle, submetidas a três sessões de choques nas patas com 5, 15 e 30 minutos de duração e a três sessões de choques nas patas de 30 minutos de duração cada, aplicadas em dias consecutivos.

Tabela 8: Efeito da noradrenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a estresse repetido por choque nas patas.

	n ^a	Frequência Inicial ^b (bat/min)	Resposta Máxima ^b (bat/min)	pD ₂ ^{b, c}
Controle	7	176 ± 6	130 ± 5	7,28 ± 0,17
Choque 5, 15, 30	5	186 ± 10	120 ± 13	6,41 ± 0,10*
Choque 30, 30, 30	6	175 ± 8	142 ± 5	6,53 ± 0,10*

a - número de experimentos

b - valores médios seguidos dos respectivos erros padrão das médias

c - logaritmo negativo da concentração molar do agonista que produz 50% da resposta máxima

* - diferença estatisticamente significativa em relação ao controle; p<0,05, ANOVA e teste de Scheffé

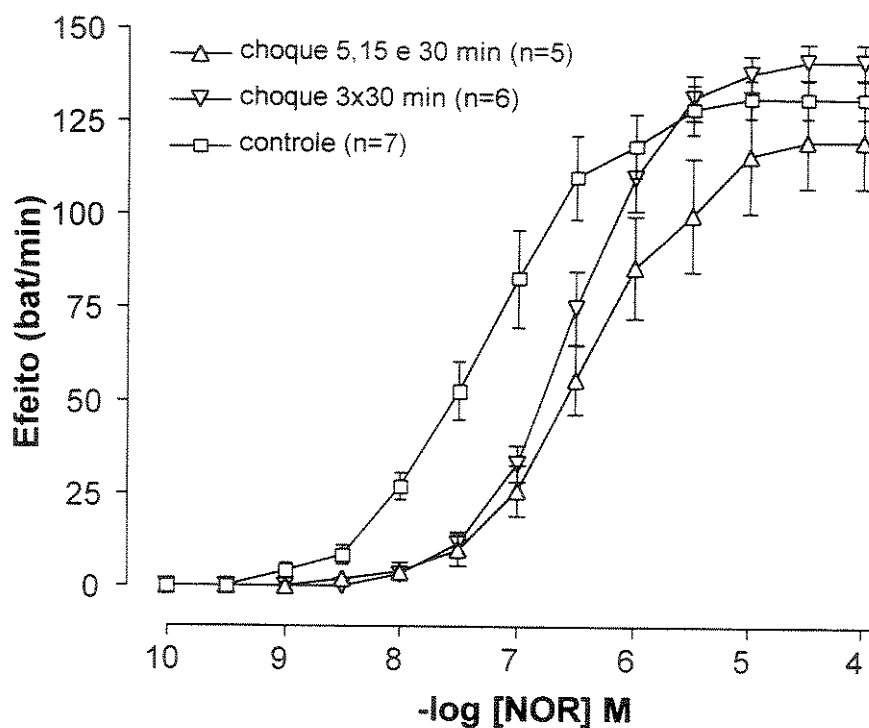


Figura 8: Curvas concentração/efeito à noradrenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle, submetidas a três sessões de choques nas patas com 5, 15 e 30 minutos de duração e a três sessões de choques nas patas de 30 minutos de duração cada, aplicadas em dias consecutivos.

Tabela 9: Efeito da adrenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a estresse repetido por choque nas patas.

	n ^a	Frequência Inicial ^b (bat/min)	Resposta Máxima ^b (bat/min)	pD ₂ ^{b, c}
Controle	7	167 ± 2	137 ± 7	6,52 ± 0,08
Choque 5, 15, 30	6	170 ± 10	115 ± 7	6,44 ± 0,10
Choque 30, 30, 30	6	203 ± 10	117 ± 10	6,77 ± 0,07

a - número de experimentos

b - valores médios seguidos dos respectivos erros padrão das médias

c - logaritmo negativo da concentração molar do agonista que produz 50% da resposta máxima

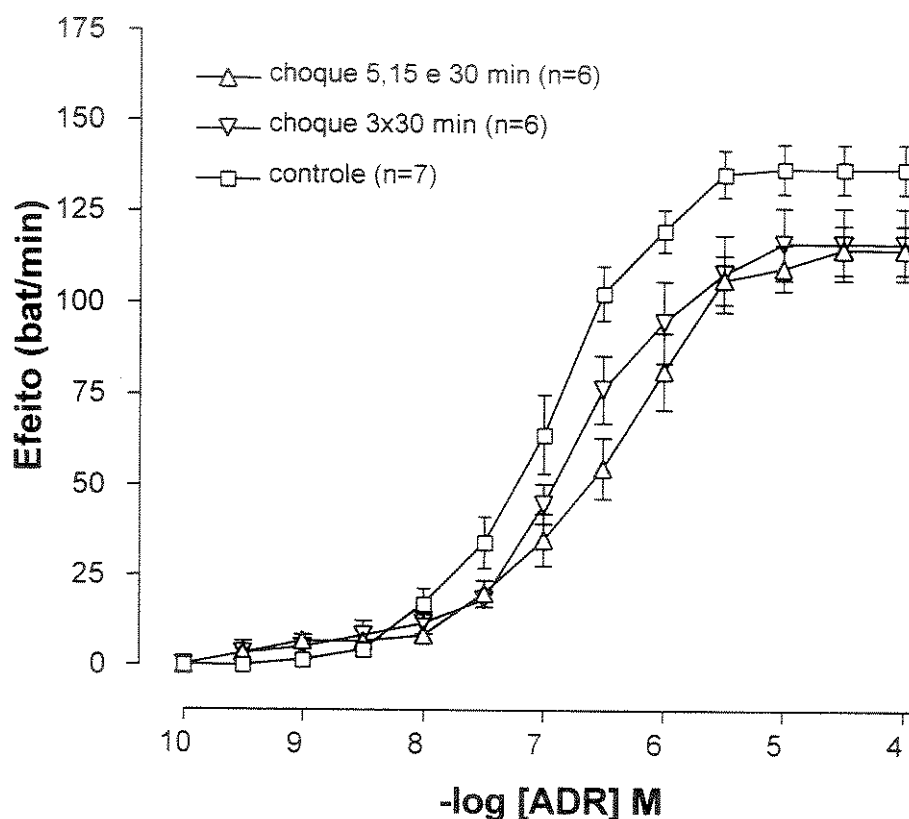


Figura 9: Curvas concentração/efeito à adrenalina em átrios direitos isolados de cobaias controle, submetidas a três sessões de choques nas patas com 5, 15 e 30 minutos de duração e a três sessões de choque nas patas de 30 minutos de duração cada, aplicadas em dias consecutivos.

Estes resultados indicam que as alterações de sensibilidade aos agonistas de adrenoreceptores β observadas em átrios direitos de cobaias são similares às aquelas demonstradas em átrios direitos de ratos (BASSANI & DE MORAES, 1988; NOURANI et al, 1992) e de ratas sacrificadas durante o diestro (VANDERLEI et al, 1996), e sugerem que, como naqueles tecidos, neste também ocorre dessensibilização da resposta mediada por adrenoreceptores β_1 , e aumento da resposta a agonistas não seletivos $\beta_1 - \beta_2$ o que poderia ser decorrente de aumento da participação de adrenoreceptores β_2 nesta resposta. Para testar tal hipótese, obtivemos curvas concentração/efeito ao composto TA2005, um agonista seletivo para adrenoreceptores β_2 , em concentrações situadas na faixa nanomolar, mas que ativa também adrenoreceptores β_1 em concentrações micromolares. Em átrios direitos de cobaias controle o composto TA2005 causou efeito cronotrópico positivo (Figuras 10 e 11), com o limiar ocorrendo na concentração de 3 nM. O efeito máximo foi obtido com a concentração de 1 μ M, e foi igual a 107 ± 13 bat/min, que corresponde a 78% do efeito máximo da isoprenalina ($p < 0,05$; Tabela 10).

A curva concentração/efeito ao composto TA2005 em átrios direitos de cobaias controles foi submetida à análise pelo programa “Prism Graph Pad”, para verificar se os dados se ajustavam melhor ao modelo que identifica a interação do agonista com um ou com dois sítios de ligação. Os dados desta análise são apresentados na Tabela 11. Os valores obtidos para a soma de quadrados, $Sy.x$ e coeficiente de correlação são semelhantes em ambos os modelos, o que torna a análise inconclusiva, embora o programa aponte a equação que descreve a interação do agonista com um sítio ligante, a que melhor se ajusta aos dados (Tabela 11). De fato, os valores obtidos com a equação para dois sítios são absurdos do ponto de vista farmacológico, pois reportam valores negativos. Em sendo aceito o modelo de interação do agonista com um sítio ligante, o valor pD_2 do TA2005 seria igual a $8,34 \pm 0,20$ ($EC_{50} = 4,54$ (1.57 – 7.51) nM) (Tabela 10). Curvas concentração/efeito ao TA2005 na presença de antagonistas seletivos para os subtipos β_1 ou β_2 de

adrenoceptores foram obtidas e submetidas à análise. Na Figura 10 podemos observar que a curva concentração/efeito ao TA2005 em átrios direitos de cobaias controles, obtida na presença de ICI118,551, foi deslocada para a direita cerca de 17,4 vezes, ao nível do pD_2 , sem diminuição da resposta máxima, indicando que o efeito do agonista seria mediado parcialmente por adrenoceptores β_2 e confirmando que, em concentrações mais altas, o agonista perde sua seletividade (Figura 10).

A aplicação do modelo matemático para análise dos dados (Tabela 12) demonstrou que, na presença de ICI118,551, que bloqueia adrenoceptores β_2 , a resposta seria mediada por uma população homogênea de adrenoceptores β_1 , cuja resposta máxima corresponde a 123 ± 10 bat/min (Tabela 10). Esta não difere estatisticamente da resposta máxima ao agonista obtida na ausência do antagonista (107 ± 13 bat/min). O valor pD_2 obtido para o TA2005 interagindo com os adrenoceptores β_1 corresponderia a $6,01 \pm 0,09$.

Quando a curva concentração/efeito ao TA2005 foi obtida na presença de CGP20712A (Figura 11), a porção inicial da curva concentração/efeito, na faixa de concentração do agonista entre 0,1 e 30 nM, não sofreu deslocamento significativo. Entretanto, a partir da concentração de 50 nM do agonista, houve deslocamento à direita da curva concentração/efeito, com redução da resposta máxima, evidenciando a característica de agonista parcial do composto TA2005, quando interage com adrenoceptores β_2 (Tabela 10). Esta curva concentração/efeito obtida na presença de CGP20712A se ajusta melhor ao modelo de dois sítios (Tabela 13), sendo os efeitos máximos da interação com o sítio de alta afinidade igual a 49 ± 5 bat/min e aquele correspondente à interação com o sítio de baixa afinidade igual a 30 ± 7 bat/min. O efeito máximo conjunto igual a 77 ± 3 bat/min, que corresponde a 56% do efeito máximo da isoprenalina. Os valores EC_{50} do TA2005 foram iguais a 3,1 (0,03 - 6,23) nM e 2,81 (-0,32 - 8,79) μ M ($pD_2 = 8,51$ e 6,55, respectivamente) para o TA2005 interagindo com adrenoceptores β_2 e β_1 , respectivamente. Estes resultados permitem concluir que em átrios direitos de cobaias controle, a população de

adrenoceptores mediando o efeito cronotrópico das catecolaminas é predominantemente β_1 e que a participação de adrenoceptores β_2 é realmente de pequena magnitude.

Na Figura 12 é possível comparar as curvas concentração/efeito ao TA2005 em átrios direitos de cobaias controles e de cobaias submetidas a estresse por choques nas patas. Embora não haja diferença estatisticamente significativa dos valores pD_2 e de efeito máximo do TA2005 entre os grupos, é possível verificar que o estresse acentua a característica bifásica da curva.

Os resultados da análise computacional apontam a equação que descreve interação do agonista com dois sítios ligantes como a que melhor representa os resultados, pois os menores valores para soma de quadrados e $Sy.x$ são aqueles obtidos com a equação que descreve interação com dois sítios. Além disso, esta apresenta melhor coeficiente de correlação (Tabela 11).

O ICI118,551 desloca as curvas concentração/efeito ao TA2005 em átrios direitos de cobaias submetidas a choque nas patas cerca de 7,9 vezes, ao nível do pD_2 , enquanto que nas curvas concentração/efeito obtidas em átrios direitos de animais controle o deslocamento foi de 17,4 vezes, sem diminuir a resposta máxima ao agonista (Figuras 13 e 15, Tabela 10). O programa computacional aponta para um sítio de interação com o TA2005, na presença de ICI118,551 (Tabela 12). Este sítio seria o adrenoceptor β_1 . Por outro lado, a curva concentração/efeito ao TA2005 na presença de CGP20712A (Figuras 14 e 16), em átrios direitos de cobaias submetidas a choques nas patas é melhor descrita pela equação para dois sítios ligantes (Tabela 13). A curva concentração/efeito é bifásica e em nenhuma das partes da curva a resposta máxima é atingida, evidenciando que provavelmente ocorre diminuição da resposta mediada por adrenoceptores β_2 e β_1 . Além disso, o deslocamento causado nas curvas dose resposta ao TA2005 pelo ICI118,551 é maior em átrios direitos de cobaias controle do que em cobaias submetidas a estresse. Como a EC_{50} do sítio de baixa afinidade (adrenoceptores β_1) não está alterada, esta diminuição de

sensibilidade parece ser devida à diminuição da resposta mediada pelo sítio de alta afinidade, o adrenoceptor β_2 (Tabela 10).

Tabela 10: Efeito do TA2005 em átrios direitos de cobaias controle e submetidas a estresse por choque nas patas (3 sessões de 30 minutos de duração cada), na presença ou não de CGP20712A, ou de IC1118,551.

	Um Sítio			Dois Sítios			
	Frequência Inicial ^b (bat/min)	EC ₅₀ ^{c, d} (nM)	Resposta Máxima ^b (bat/min)	Alta Afinidade		Baixa Afinidade	
				EC ₅₀ ^{c, d} (nM)	Resposta Máxima ^b (bat/min)	EC ₅₀ ^{c, d} (μM)	Resposta Máxima ^b (bat/min)
ICI118,551 50 nM							
Controle (7) ^a	206 ± 7	4,54 (1,57 – 7,51)	100 ± 5	—	—	—	—
Choque (5) ^a	202 ± 16	11,06 (1,51 – 20,61)	92 ± 7	—	—	—	—
CGP20712A 10 nM							
Controle (3) ^a	217 ± 12	7,69 (1,90 – 13,48)	64 ± 3	3,10 (0,03 – 6,23)	49 ± 5	2,81 (0,32 – 8,79)	30 ± 7
Choque (3) ^a	233 ± 12	84,88 * (17,02 – 152,7)	53 ± 3	8,04 * (6,66 – 22,74)	27 ± 7	1,66 (1,39 – 4,70)	33 ± 7

a - número de experimentos em cada grupo

b - valores médios seguidos dos erros padrões das médias

c - valores médios seguidos dos intervalos de confiança

d - concentração molar do agonista que produz 50% da resposta máxima

* - diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, na ausência de antagonista; $p < 0,05$, ANOVA e teste de Scheffé

Tabela 11: Análise computacional das curvas concentração/efeito ao TA2005, em cabaiais controle ou submetidos a três sessões de choques nas patas, na ausência de antagonista.

	Um Sítio ^b	Dois Sítios ^b
Controle (7)^a		
Sy.x	29,39	29,25
Soma de Quadrados	64800	62470
R ²	0,6212	0,6348
Melhor Equação	•	•
Choque 3x30 (5)^a		
Sy.x	28,35	28,00
Soma de Quadrados	38590	36050
R ²	0,6022	0,6283
Melhor Equação	•	•

a - número de experimentos em cada grupo

b - valores médios

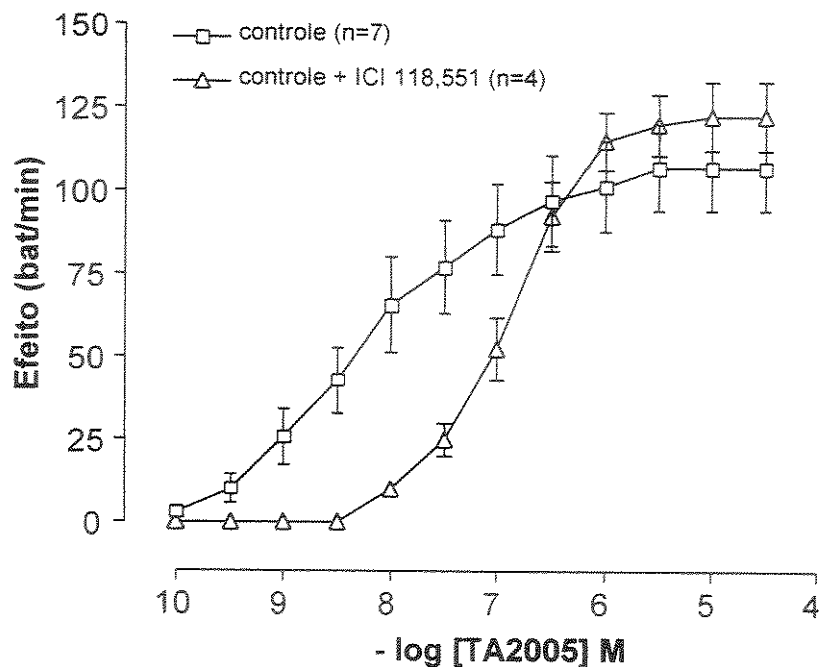


Figura 10: Curvas concentração/efeito ao TA2005 em átrios direitos isolados de cobaias controle, na presença e na ausência do antagonista ICI118.551, na concentração 50 nM.

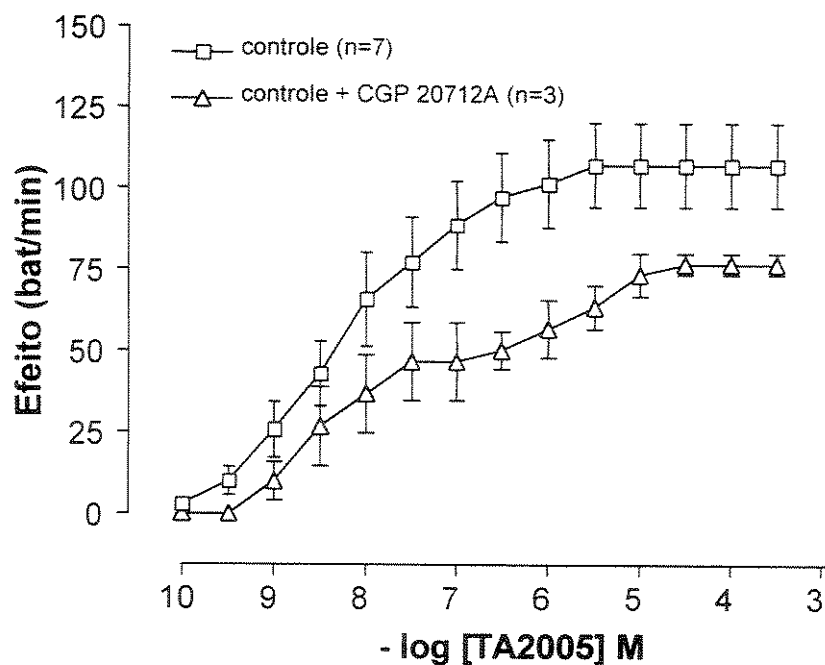


Figura 11: Curvas concentração/efeito ao TA2005 em átrios direitos isolados de cobaias controle, na presença e na ausência do antagonista CGP20712A, na concentração 10 nM.

Tabela 12: Análise computacional das curvas concentração/efeito ao TA2005, em cobaias controle ou submetidos a três sessões de choques nas patas, na presença do antagonista IC1118,551.

Controle (4)^a		Um Sítio^b	Dois Sítios^b
Sy.x		12,62	12,79
Soma de Quadrados		7323	7200
R ²		0,9479	0,9488
Melhor Equação		•	
Choque 3x30 (6)^a			
Sy.x		12,39	12,57
Soma de Quadrados		10750	10750
R ²		0,9329	0,9329
Melhor Equação		•	

a - número de experimentos em cada grupo

b - valores médios

Tabela 13: Análise computacional das curvas concentração/efeito ao TA2005, em cobaias controle ou submetidos a três sessões de choques nas patas, na presença do antagonista CGP20712A.

	Um Sítio ^b	Dois Sítios ^b
Controle (3)^a		
Sy.x	14,37	12,11
Soma de Quadrados	7639	5134
R ²	0,7603	0,8389
Melhor Equação		•
Choque 3x30 (3)^a		
Sy.x	12,07	10,44
Soma de Quadrados	5386	3814
R ²	0,7614	0,8311
Melhor Equação		•

a - número de experimentos em cada grupo

b - valores médios

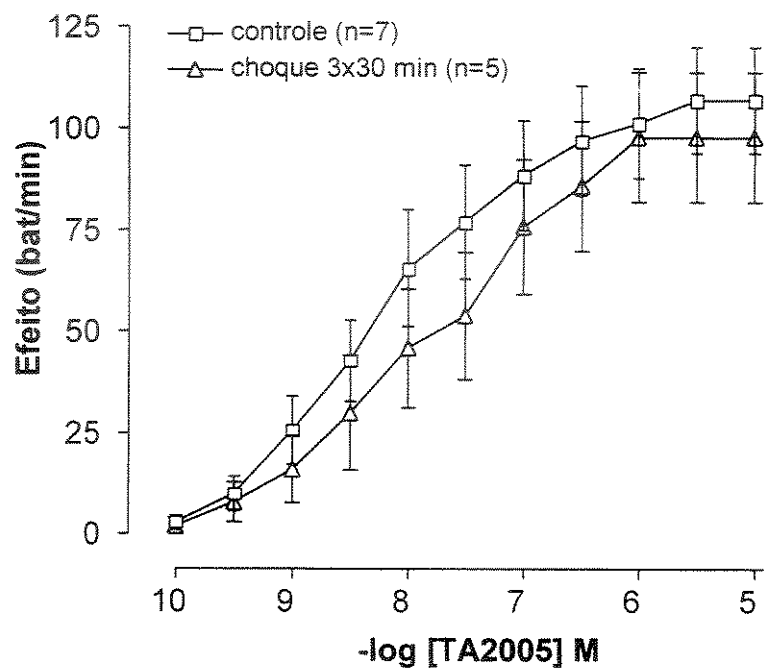


Figura 12: Curvas concentração/efeito ao TA2005 em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a três sessões de choques nas patas de 30 minutos de duração cada, aplicadas em dias consecutivos.

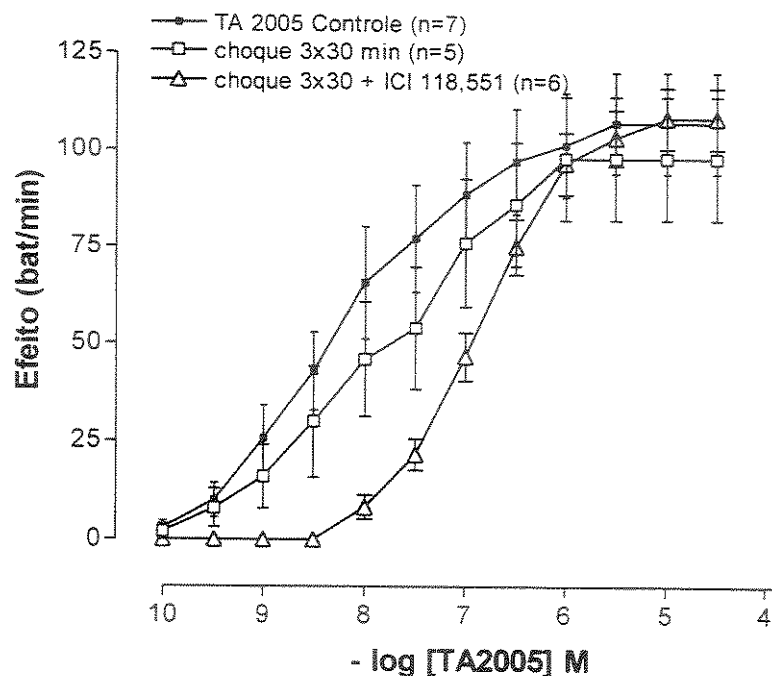


Figura 13: Curvas concentração/efeito ao TA2005 em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a três sessões de choques nas patas de 30 minutos de duração cada, aplicadas em dias consecutivos, na presença e na ausência do antagonista ICI 118,551, na concentração 50 nM.

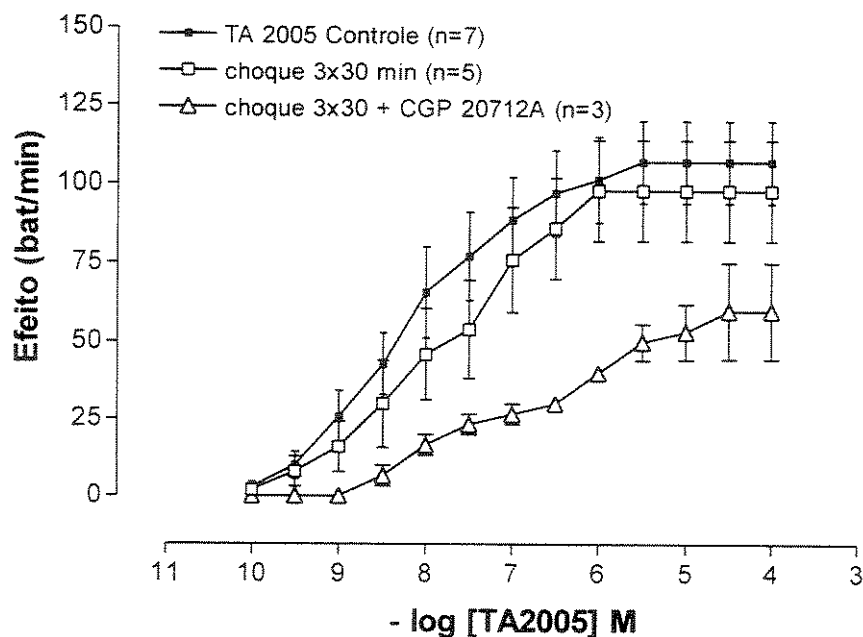


Figura 14: Curvas concentração/efeito ao TA2005 em átrios direitos isolados de cobaias controle e submetidas a três sessões de choques nas patas de 30 minutos de duração cada, aplicadas em dias consecutivos, na presença e na ausência do antagonista CGP 20712A, na concentração 10 nM.

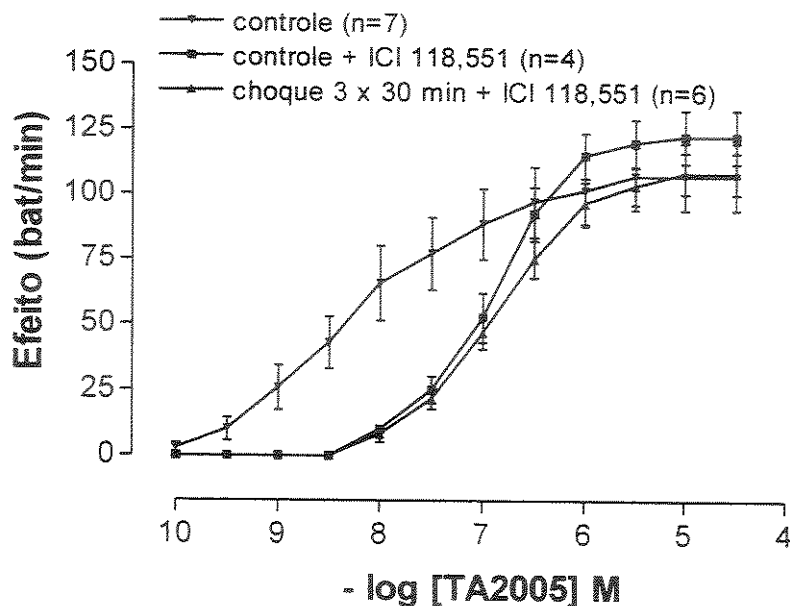


Figura 15: Curvas concentração/efeito ao TA2005 em átrios direitos isolados de cobaias controle na presença e na ausência do antagonista ICI 118,551, na concentração 50 nM, e submetidas a três sessões de choques nas patas de 30 minutos de duração cada, aplicadas em dias consecutivos, na presença do mesmo antagonista.

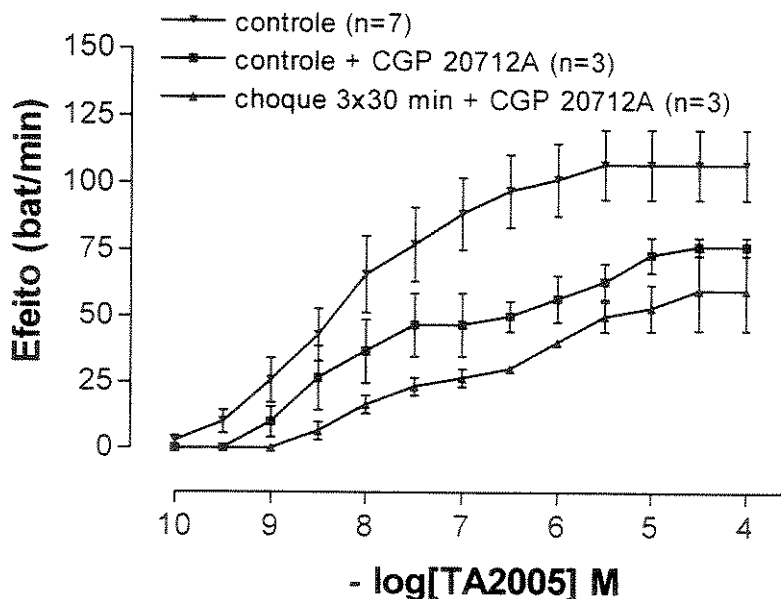


Figura 16: Curvas concentração/efeito ao TA2005 em átrios direitos isolados de cobaias controle, na presença e na ausência do antagonista CGP 20712A, na concentração 10 nM, e submetidas a três sessões de choques nas patas de 30 minutos de duração cada, aplicadas em dias consecutivos, na presença do mesmo antagonista.

5. DISCUSSÃO

O estresse é capaz de induzir alterações na sensibilidade às catecolaminas em átrios direitos isolados de ratos e este efeito está sob influência dos níveis plasmáticos de corticosterona (SPADARI et al., 1988; SPADARI & DE MORAES, 1988). Considerando que a proporção dos subtipos de receptores β -adrenérgicos mediando a resposta cronotrópica às catecolaminas em tecido cardíaco de ratos e cobaias é diferente (KAUMANN, 1986; VOSS et al, 1994), os objetivos do presente trabalho foram estudar a sensibilidade aos efeitos cronotrópicos das catecolaminas, em átrios direitos isolados de cobaias submetidas a diferentes condições de estresse e comparar os resultados obtidos no presente trabalho, com aqueles relatados em átrios direitos isolados de ratos (BASSANI & DE MORAES, 1988) e ratas (SPADARI-BRATFISCH et al., 1999) submetidos a condições semelhantes.

Os resultados aqui apresentados mostraram que o estresse por natação ou choque nas patas induziu alterações na sensibilidade de átrios direitos isolados de cobaias aos efeitos cronotrópicos das catecolaminas e que a natureza destas alterações depende do protocolo de estresse utilizado, bem como da espécie à qual pertence o animal.

Átrios direitos isolados de cobaias submetidas a uma única sessão de natação são supersensíveis aos efeitos da isoprenalina e subsensíveis à noradrenalina, sem alterações de sensibilidade à adrenalina. Átrios direitos isolados de ratos machos submetidos ao mesmo protocolo de estresse apresentam supersensibilidade à isoprenalina, mas nenhuma alteração na sensibilidade à noradrenalina ou à adrenalina (SPADARI et al., 1988). Esta supersensibilidade à isoprenalina foi atribuída à inibição da captação extraneuronal das catecolaminas causada pela corticosterona, uma vez que

esta não ocorreu em átrios direitos isolados de ratos que foram previamente adrenalectomizados ou tratados com metirapona, um inibidor da síntese de corticosterona (SPADARI et al., 1988; SPADARI & DE MORAES, 1988). Assim, a supersensibilidade à isoprenalina demonstrada neste trabalho, em átrios direitos de cobaias submetidas a uma única sessão de natação, poderia também ocorrer devido a um mecanismo similar, ou seja, inibição da captação extraneuronal, causada pelo aumento nas concentrações plasmáticas do hormônio glicocorticóide que, em cobaias, é o cortisol. Sabe-se que o estresse causa importante aumento nas concentrações plasmáticas de cortisol em cobaias (MANIN & DELOST, 1981). Assim, altas concentrações de cortisol, induzidas pelo estresse, poderiam inibir a captação extraneuronal da isoprenalina, causando supersensibilidade aos efeitos deste agonista, da mesma forma que ocorre em ratos.

No entanto, este efeito do cortisol sobre a captação extraneuronal não pode explicar a subsensibilidade à noradrenalina observada em átrios isolados de cobaias submetidas a uma ou três sessões de natação. Em átrios direitos isolados de ratos submetidos à natação, subsensibilidade à noradrenalina somente foi observada após três sessões de natação (SPADARI & DE MORAES, 1988). Esta subsensibilidade foi atribuída à “down-regulation” dos adrenoceptores β_1 , e/ou ao aumento da eficiência da captação neuronal, o principal processo de metabolização do neurotransmissor. Embora isto também possa estar ocorrendo em átrios direitos isolados de cobaias submetidas a estresse, nós não investigamos os mecanismos envolvidos na subsensibilidade aos efeitos cronotrópicos da noradrenalina.

SPADARI-BRATFISCH et al. (1999) propuseram que o recrutamento de diferentes mecanismos celulares envolvendo alterações na sensibilidade às catecolaminas depende da intensidade do estímulo indutor de estresse. Assim

sendo, em ratos, o estresse por uma única sessão de natação causaria aumento da concentração plasmática de glicocorticóides, o que inibiria o processo de captação extraneuronal causando supersensibilidade à isoprenalina. A repetição deste estresse ativaria, além deste, um segundo mecanismo envolvendo aumento da ativação do sistema de recaptação neuronal e dessensibilização da resposta mediada por adrenoreceptores β_1 , o subtipo de adrenoreceptores predominante em ratos (KAUMANN, 1986). E, estresse mais intenso, causado por choques nas patas, ativaria um terceiro mecanismo, que se somaria aos dois primeiros, e que dependeria do aumento da resposta mediada pelo subtipo β_2 de adrenoreceptores. De acordo com este ponto de vista, o estresse por natação parece ser mais aversivo às cobaias do que aos ratos, já que as alterações de sensibilidade à noradrenalina, indicativas da ativação do segundo mecanismo, aparecem em cobaias após a primeira sessão de natação, enquanto que em ratos são necessárias três sessões para o registro de tais alterações. Uma única sessão de natação, portanto, causa supersensibilidade à isoprenalina que poderia ser devida à inibição da captação extraneuronal, como ocorre em átrios direitos de ratos, e subsensibilidade à noradrenalina, que poderia ser devida a aumento da atividade do sistema de recaptação neuronal e/ou dessensibilização da resposta mediada por adrenoreceptores β_1 .

Após três sessões de natação o tecido atrial não mais apresenta supersensibilidade à isoprenalina mas permanece subsensível à noradrenalina. Neste caso, considerando que os níveis de cortisol devem continuar altos e, portanto, a captação extraneuronal inibida, devem ter sido desencadeados mecanismos pós-juncionais adaptativos que contrabalançam as altas concentrações de isoprenalina na biofase.

Portanto, nossos resultados mostram que o estresse por natação induz alterações na sensibilidade aos efeitos cronotrópicos das catecolaminas que dependem da intensidade do agente estressor. Considerando que as diferentes espécies animais parecem apresentar diferentes percepções frente a um dado agente estressor, os mecanismos celulares recrutados variariam de acordo com a espécie. Outra possibilidade seria que o cortisol seria mais potente em cobaias do que a corticosterona em ratos, para desencadear estes mecanismos.

Os átrios direitos isolados de cobaias submetidas a três sessões de choque nas patas apresentaram supersensibilidade à isoprenalina, subsensibilidade à noradrenalina e nenhuma alteração de sensibilidade à adrenalina. Estes resultados sugerem que as alterações de sensibilidade aos agonistas de adrenoceptores β são similares àquelas demonstradas em átrios direitos isolados de ratos (BASSANI e DE MORAES, 1988) e ratas (NOURANI et al., 1992; VANDERLEI et al., 1996), uma vez que o tecido atrial direito de ambas as espécies apresentou dessensibilização da resposta a agonistas seletivos para adrenoceptores β_1 e aumento da resposta ao agonista não seletivo, isoprenalina. Os resultados sugerem também que a dessensibilização da resposta mediada por adrenoceptores β_1 é acompanhada por aumento da participação de adrenoceptores β_2 e/ou inibição da captação extra-neuronal. No primeiro caso, esperar-se-ia supersensibilidade a agonistas seletivos β_2 em átrios de cobaias submetidas a estresse. Entretanto, as curvas concentração/efeito obtidas ao TA2005 não mostraram alteração significativa de sensibilidade a este composto, ao nível da EC_{50} , quando se comparam átrios direitos de cobaias controle com átrios de cobaias submetidas a estresse. Entretanto, nas menores doses, na faixa de nanomolar, o agonista é seletivo para o subtipo β_2 , e, à medida que se aumenta a concentração, o composto

TA2005 perde sua seletividade, interagindo também com adrenoceptores do subtipo β_1 . A relação entre os subtipos de adrenoceptores $\beta_1:\beta_2$ em nodo sinotrial de cobaias é de 72:28 e os adrenoceptores β_2 contribuem com 76% da resposta cronotrópica positiva ao ($\pm$)-fenoterol mas apenas com 3% da resposta à (-)-adrenalina (EMORINE et al., 1985). Adrenoceptores β_1 parecem controlar a frequência cardíaca sob condições fisiológicas normais. Ao observarmos as curvas concentração/efeito ao TA2005, verificamos que tanto em átrios de cobaias controle, como de cobaias submetidas a choques nas patas, obtivemos resposta na faixa de concentração em que o agonista interage com o subtipo β_2 . O uso de antagonista seletivo para o subtipo β_2 (ICI118,551) confirma esta hipótese. Além disso, o deslocamento causado na curva concentração/efeito ao TA2005 pelo CGP20712A (um antagonista seletivo para o subtipo β_1 de adrenoceptores) demonstra que, em átrios de cobaias controle, a resposta cronotrópica ao TA2005 também seria mediada por uma população heterogênea de adrenoceptores β_1/β_2 , com predomínio do subtipo β_1 . Esta proporção de subtipos resultaria em mascaramento da resposta mediada pelo subtipo presente em menor proporção.

Por outro lado, na presença de altas concentrações de adrenalina, por exemplo, durante estresse, os adrenoceptores β_2 participariam mais efetivamente do controle do cronotropismo cardíaco (KAUMANN, 1986; STENE-LARSEN et al., 1986; MOTOMURA et al., 1990). Em átrios direitos isolados de cobaias submetidas a estresse por choques nas patas, a característica bifásica da curva concentração/efeito ao TA2005 é mais facilmente observada. Além disso, o ICI118,551 cancela a primeira fase da curva, convertendo-a em uma curva monofásica, de modo que a resposta ao TA2005 obtida na presença de ICI118,551, reflete a interação do agonista com

a população de adrenocéptores β_1 . Quando comparamos os valores de EC_{50} do TA2005 na presença de ICI118,551 em átrios direitos de cobaias controles com átrios direitos de cobaias submetidas a estresse verificamos que não houve diferença significativa entre eles. Estes resultados sugerem que em tecido de cobaias submetidas a estresse por choques nas patas, não ocorre alteração da afinidade entre o agonista e os adrenocéptores β_1 , ou seja, que não houve alteração estrutural dos adrenocéptores β_1 presentes neste tecido. Além disso, não ocorreu também alteração da resposta máxima ao agonista parcial, sugerindo que o número de adrenocéptores β_1 não se alterou, contradizendo o que foi sugerido anteriormente. Por outro lado, quando as curvas concentração/efeito ao agonista foram obtidas na presença de CGP20712A, que bloqueia os adrenocéptores β_1 , os valores obtidos referem-se à interação do TA2005 com a população de adrenocéptores β_2 . Neste caso, os resultados apontam para subsensibilidade da resposta. Estes resultados são opostos aos observados em átrios direitos isolados de ratas submetidas ao mesmo agente estressor (SPADARI-BRATFISCH et al., 1999).

Concluindo, nossos resultados demonstram que átrios direitos isolados de cobaias e ratos submetidos aos mesmos protocolos de estresse sofrem alterações na proporção dos subtipos de adrenocéptores que medeiam a resposta ao estresse, e que estas alterações dependem da espécie do animal.

6. CONCLUSÕES

Em átrio direito de cobaia, a resposta cronotrópica às catecolaminas é mediada por uma população heterogênea de adrenoreceptores β_1/β_2 , com predomínio do subtipo β_1 . Estresse por natação não altera a população de adrenoreceptores neste tecido, mas determina alteração na sensibilidade à isoprenalina provavelmente causada por inibição da captação extraneuronal. Este processo é similar ao que ocorre em ratos. Entretanto, a subsensibilidade à noradrenalina observada em átrios direitos isolados de ratos após três sessões de natação pode ser demonstrada já após uma única sessão de natação em átrios direitos isolados de cobaias.

Após três sessões de natação a subsensibilidade à noradrenalina ainda foi observada, porém sem alterações na sensibilidade à adrenalina e à isoprenalina. Esta subsensibilidade à noradrenalina pode ser devido a um aumento da ativação do sistema de recaptação neuronal e dessensibilização da resposta mediada pelos adrenoreceptores do subtipo β_1 . Entretanto, nós não investigamos os mecanismos envolvidos neste processo. A ausência de supersensibilidade à isoprenalina pode ser atribuída a adaptações pós-juncionais, provavelmente ligadas à eficiência do sistema de captação extraneuronal, que compensariam a alta concentração de isoprenalina na biofase. Estes mecanismos também não foram investigados.

Após estresse por choque nas patas, átrios direitos isolados de cobaias apresentam supersensibilidade ao agonista β não seletivo isoproterenol, e diminuição da sensibilidade ao agonista seletivo β_2 TA2005 e à noradrenalina.

Assim sendo, estes resultados permitem concluir que há diferenças espécie-específicas nas respostas adaptativas ao estresse que ocorrem ao nível molecular, e que podem ser demonstradas em tecidos isolados de ratos e de cobaias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLQUIST, R.P. A study of adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol.*, v. 153, p. 586-600, 1948.
- ANISHCHENKO, T.G.; GUDKOVA, E.V. Sex differences in response to adrenaline in white rats. *Biull. Eksp. Biol. Med.*, v. 113, n. 6, p. 577-579, 1992.
- AXELROD, J.; REISINE, T.D., Stress hormones: their interaction and regulation. *Science*, v. 224, n. 4648, p. 452-459, 1984.
- 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, n. 1, p. 63-71, Jan 1994.
- BASSANI, R.A.; DE MORAES, S. Effects of footshock stress on the sensitivity of the isolated rat pacemaker to catecholamines. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 20, n. 3-4, p. 467-470, 1987a.
- BASSANI, R.A.; DE MORAES, S. Subsensitivity to beta-adrenoceptor agonists in right atria isolated from footshock-stressed rats. *Gen. Pharmacol.*, v. 18, n. 5, p. 473-477, 1987b.
- BASSANI, R.A.; DE MORAES, S. Effects of repeated footshock stress on the chronotropic responsiveness of the isolated pacemaker of the rat: role of β_2 adrenoceptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 246, n. 1, p. 316-321, 1988.
- BENOVIC, J.L. et al. β -adrenergic receptor kinase: primary structure delineates a multigene family. *Science*, v. 246, p. 235-240, Oct., 1989.
- BENOVIC, J.L.; ONORATO, J.J.; ARRIZA, J.L.; STONE, W.C.; LOHSE, M.; JENKINS, N.A.; GILBERT, D.J.; COPELAND, N.G.; CARON, M.G.; LEFKOWITZ, R.J. Cloning, expression, and chromosomal localization of beta-adrenergic receptor kinase 2.

- A new member of the receptor kinase family. *J. Biol. Chem.*, v. 266, n. 23, p. 14939-14946, Aug 1991.
- BERRIDGE, D.B. The molecular bases of communication within the cell. *Scientific American*, v. 253, p. 124-136, 1985.
- BOUVIER, M. et al. Two distinct pathways for cAMP-mediated down-regulation of the β_2 -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.*, v. 264, p. 16786-16792, 1989.
- BOYAJIAN, C.L.; LESLIE, F.M. Pharmacological evidence for α_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.
- BYLUND, D.B. et al. International Union of Pharmacology Nomenclature of Adrenoceptors. *Pharmacol. Rev.*, v. 46, n. 2, p. 121-136, 1994.
- BYLUND, D.B.; BOND, R.A.; CLARKE, D.E.; EIKENBURG, D.C.; HIEBLE, J.P.; LANGER, S.Z.; LEFKOWITZ, R.J.; MINNEMAN, K.P.; MOLINOFF, P.B.; ROFFOLO, R.R.; STROSBURG, A.D.; TRENDLENBURG, U.G. Adrenoceptors. In: **The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification**. Compiled by the International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification, 1998. 267 p., p.58-74.
- COLLINS, S., et al. Structure and regulation of G protein-coupled receptors. The β_2 -adrenergic receptor as a model. *Vitamins and Hormones*, v. 46, p. 1-39, 1991.
- COLLINS, S. Recent perspectives on the molecular structure and regulation of the β_2 -adrenoceptor. *Life Sci.*, v. 52, n. 26, p. 2083-2091, 1993.
- DAVIES, A.O.; LEFKOWITZ, R.J. Regulation of β -adrenergic receptors by steroid hormones. *Ann. Rev. Physiol.*, v. 46, p. 119-130, 1984.
- DIXON, R.A., et al. Cloning of the gene and cDNA for mammalian β -adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature*, v. 321, n. 1, p. 75-79, 1986.

- DIXON, R.A.F.; SIGAL, I.S.; CANDELORE, M.R.; REGISTER, R.B.; SCATTEGOOD, W.; RANDS, E.; STRADER, C.D. Structural features required for ligand binding to the beta-adrenergic receptor. *Mol. Pharmacol.*, v. 6, p. 3269-3275, 1987.
- DOHLMAN, H.G.; BOUVIER, M.; BENOVIC, J.L.; CARON, M.G.; LEFKOWITZ, R.J. 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, Oct 1987.
- DUARTE, GM. Fisiopatologia do exercício. In: DUARTE, GM. Ergometria – bases da reabilitação cardiovascular. Rio de Janeiro, Cultura Médica, 1986, cap 2, p. 3-6.
- ELIOT, R.S. Stress and the heart. Mechanisms, measurement, and management. *Postgrad. Med.*, v. 92, n. 5, p. 237-242, 245-248, Oct 1992.
- EMORINE, L. et al. Idiotype of catecholamine-binding proteins. *Ann. Inst. Pasteur Immunol.* v. 136C, n. 1, p. 157-168, Jan-Feb 1985.
- EMORINE, L.J., et al. Molecular characterization of the human β_3 adrenergic receptor. *Science*, v. 245, p. 1118-1121, 1989.
- 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.
- FAIN, J.N.; GARCÍA-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, Apr 1980.
- 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.
- GRIFFIN, J.F.T. Stress and immunity: a unifying concept. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 20, p. 263-312, 1989.

- HAN, C.; ABEL, P. W.; MINNEMAN, K. P. α_1 -adrenoceptor subtypes linked to different mechanisms for increasing intracellular Ca^{2+} in smooth muscle. *Nature*, v. 329, p. 333-335, Sept., 1987.
- HARDEN, T.K. Agonist-induced desensitization of the β -adrenergic receptor-linked adenylate cyclase. *Pharmacol. Rev.*, v. 35, p. 5-32, 1983.
- HAUSDORFF, W.P.; CARON, M.G.; LEFKOWITZ, R.J. Turning off the signal desensitization of β -adrenergic receptor function. *FASEB J.*, v. 4, p. 2881-2889, Aug. 1990a.
- HAUSDORFF, W.P.; HNATOWICH, M.; O'DOWD, B.F.; CARON, M.G.; LEFKOWITZ, R.J. 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 Gs. *J. Biol. Chem.*, v. 265, n. 3, p. 1388-1393, Jan 1990b.
- HAUSDORFF, W.P., et al. Phosphorylation sites on two domains of the β_2 -adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J. Biol. Chem.*, v. 264, n. 21, p. 12657-12665, 1989.
- 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.
- HENNESSY, M.B.; HEYBACH, J.P.; VERNIKOS, J.; LEVINE, S. Plasma corticosterone concentrations sensitively reflect levels of stimulus intensity in the rat. *Physiol. Behav.*, v. 22, n. 5, p. 821-825, May 1979.
- HERD, J.A. Cardiovascular response to stress. *Physiol. Rev.*, v. 71, n. 1, p. 305-330, Jan 1991.
- HOFFMAN, H.S.; FLESHLER, M. A relay sequencing device for scrambling grid schock. *J. Exp. Anim. Behav.*, v. 55, p. 329-330, 1962.

- HOMCY, C.J.; GRAHAM, R.M. Molecular characterization of adrenergic receptors. *Circ. Res.*, v. 56, n. 5, p. 635-650, May 1985.
- JASPER, J.R.; INSEL, P.A. Evolving concepts of partial agonism. The β -adrenergic receptor as a paradigm. *Biochem. Pharmacol.*, v. 43, n. 2, p. 119-130, 1992.
- JOHANSSON, L.H.; PERSSON, H. Beta 2-adrenoceptors in guinea-pig atria. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 35, n. 12, p. 804-807, Dec 1983.
- KANT, G.J.; OUGUY, E.H.; PENNINGTON, L.L.; MEYERHOFF, J.L. Graded footshock stress elevates pituitary cyclic AMP and plasma beta-endorphin, beta-LPH, corticosterona and prolactin. *Life Sci.*, v. 33, p. 2657-2663, 1983.
- KAUMANN, A.J. The beta 1-adrenoceptor antagonist CGP 20712 A unmasks beta 2-adrenoceptors activated by (-)-adrenaline in rat sinoatrial node. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, v. 332, n. 4, p. 406-409, Apr 1986.
- KOBILKA, B.K.; KOBILKA, T.S.; DANIEL, K.; REGAN, J.W.; CARON, M.G.; LEFKOWITZ, R.J. Chimeric alpha 2-.beta 2-adrenergic receptors: delineation of domains involved in effector coupling and ligand binding specificity. *Science*, v. 240, n. 4857, p. 1310-1316, Jun 1988.
- KRULICH, L.; HEFCO, E.; ILLNER, P., 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.
- LANDS, A.M.; ARNOLD, A.; Mc AULLIFF, J.P.; LUDUENA, F.P.; BROWN Jr., T.G. Differentiation of receptor system activated by sympathomimetic amines. *Nature (London)*, v. 214, p. 597-598, 1967a.
- LANDS, A.M.; LUDUENA, F.P.; BUZZO, H.J. Differentiation of receptor responsiveness to isoproterenol. *Life Sci.*, v. 6, p. 2241-2249, 1967b.

- LEFKOWITZ, R.J.; CARON, M.G.; MICHEL, T.; STADEL, J.M. Mechanisms of hormone receptor-effector coupling: the beta-adrenergic receptor and adenylate cyclase. *Fed. Proc.*, v. 41, n. 10, p. 2664-2670, Aug 1982.
- LEFKOWITZ, R.J.; HAUSDORFF, W.P.; CARON, M.G. Role of phosphorylation in desensitization of the β -adrenoceptor. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 11, p. 190-194, 1990.
- LESCOAT, G.; JÉGO, P.; BERAUD, G.; MANIEY, J. Sex influences on the response of the hypothalamo-hypophysio-adrenal axis to emotional and systemic stress in the rat. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.*, v. 164, n. 10, p. 2106-2113, 1970.
- LIMBIRD, L.E. GTP and Na⁺ modulate receptor-adenyl cyclase coupling and receptor-mediated function. *Am. J. Physiol.*, v. 247, n. 1, Pt 1 E59-68, Jul 1984.
- LOHSE, M.J. Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1179, p. 171-188, 1993.
- LOHSE, M.J.; ANDEXINGER, S.; PITCHER, J.; TRUKAWINSKI, S.; CODINA, J., FAURE, J.P.; CARON, M.G.; LEFKOWITZ, R.J. Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *J. Biol. Chem.*, v. 267, n. 12, p. 8558-8564, Apr 1992.
- LOHSE, M.J., et al. Multiple pathways of rapid β_2 -adrenergic receptor desensitization: delineation with specific inhibitors. *J. Biol. Chem.*, v. 265, n. 6, p. 3202-3209, 1990a.
- LOHSE, M.J.; BENOVIC, J.L.; CODINA, J.; CARON, M.G.; LEFKOWITZ, R.J. Beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science*, v. 248, n. 4962, p. 1547-1550, Jun 1990b.
- LUGER, A.; DEUSTER, P.A.; GOLD, P.W.; LORIAUX, D.L.; CHROUSOS, G.P. Hormonal responses to the stress of exercise. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 245, p. 273-280, 1988.

- MANIN, M.; DELOST, P. Effects of acute neurotrophic stress on peripheral metabolism of cortisol in conscious male guinea-pigs. *J. Endocrinol.* v.89, n. 3, p. 443-449, 1981.
- MARCONDES, F.K., **Influência do sexo e das fases do ciclo estral sobre a reação de estresse em ratos.** Campinas. Dissertação de mestrado. Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. 58pp, 1995.
- MARCONDES, F. K.; VANDERLEI, L.C.M.; LANZA, L.L.B.; SPADARI-BRATFISCH, R.C. Stress-induced subsensitivity to catecholamines depends on the estrous cycle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v. 74, p. 663-669, 1996.
- MARCONDES, F.K. **Influencia do ciclo estral sobre as respostas hormonais de ratas submetidas a estresse.** Campinas. Dissertação de doutorado. Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. 62pp, 1998.
- MARPLE, D.N.; ABERLE, E.D.; FORREST, J.C.; BLAKE, W.H.; JUDGE, M.D. Endocrine responses of stress susceptible and stress resistant swine to environmental stressors. *J. Anim. Sci.*, v. 35, n. 3, p.576-579, 1972.
- MASON, J.W. A review of psychoendocrine research on the pituitary-adrenal cortical system. *Psychosom. Med.*, v. 30, p.576-607, 1968a.
- MASON, J.W. A review of psychoendocrine research on the pituitary-adrenal cortical system. *Psychosom. Med.*, v. 30, p. 631-653, 1968b.
- MILLS, F.J.; CHIR, B. The endocrinology of stress. *Aviat. Space Environ. Med.*, v. 56, p. 642-650, 1985.
- MOLENAAR, P.; SUMMERS, R.J. Characterization of β_1 and β_2 adrenoceptors in guinea-pig atrium: functional and receptor binding studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 241, p. 1041-1047, 1987.
- MOLENAAR, P.; CANALE, E.; SUMMERS, R.J. Autoradiographic localization of beta-1 and beta-2 adrenoceptors in guinea pig atrium and regions of the conducting system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 241, p. 1048-1064, 1987.

- NATELSON, B.H.; TAPP, W.N.; ADAMUS, J.E., et al. Humoral indices of stress in rats. *Physiol. Behav.*, v. 26, p. 1049-1054, 1981.
- NOMURA, S.; WATANABE, M.; UKEL, N.; NAKAZAWA, T. Stress and beta-adrenergic receptor binding in rat's brain. *Brain Res.*, v.224, n. 1, p. 199-203, 1981.
- NOURANI, F.R.R.; SPADARI, R.C.; DE MORAES, S. Footshock stress-induced supersensitivity to isoprenalin 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.
- O'DONNELL, S.R.; WANSTALL, J.C. Responses to the β_2 -selective agonist procaterol of vascular and atrial preparations with different functional β -adrenoceptor populations. *Br. J. Pharmacol.*, v. 84, p. 227-235, 1985.
- PARÉ, W.P.; REDEI, E. Sex differences and stress response of WKY rats. *Physiol. Behav.*, v. 54, n. 6, p. 1179-1185, 1993.
- RIEGLE, G.D. Chronic stress effects on adrenocortical responsiveness in young and aged rats. *Neuroendocrinology*, v. 11, n. 1, p. 1-10, 1973.
- SANO, M; YOSHIMASA, T; YAGURA, T; YAMAMOTO, I. Non-homogeneous distribution of beta 1- and beta 2-adrenoceptors in various human tissues. *Life Sci.*, v. 52, n.12, p. 1063-70, 1993.
- SAPOLSKY, R.M. Stress in the wild. *Sci. Am.*, v. 262, n. 1, p.116-123, Jan 1990.
- 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.
- SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, v. 138, n. 1, p. 32, 1936.

- SIBLEY, D.R.; LEFKOWITZ, R.J. Molecular mechanisms of receptor desensitization using the β_2 -adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase system as a model. *Nature*, v. 317, p. 124-129, 1985.
- SPADARI, R.C.; DE MORAES, S. Repeated swimming stress and responsiveness of isolated rat pacemaker to chronotropic effect of noradrenaline and isoprenaline: role of adrenal corticosteroids. *Gen Pharmacol.*, v. 19, n. 4, p. 553-557, 1988.
- 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.
- SPADARI-BRATFISCH, R.C.; SANTOS, I.N.; VANDERLEI, L.C.M.; MARCONDES, F.K. Pharmacological evidence for β_2 -adrenoceptor in right atria from stressed female rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* v.77, p. 1-6, 1999.
- STENE-LARSEN, G. et al., Activation of cardiac beta 2 adrenoceptors in the human heart. *Am. J. Cardiol.*, 25 57:12 7F-10F Apr 1986.
- STILES, G.L.; CARON, M.G.; LEFKOWITZ, R.J. β -adrenergic receptors: biochemical mechanisms and physiological regulation. *Physiol. Rev.*, v. 64, n. 2, p. 661-743, 1984.
- STILES, G.L.; LEFKOWITZ, R.J. Cardiac adrenergic receptors. *Annu. Rev. Med.*, v. 35, p. 149-164, 1984.
- STRADER, C.D.; SIGAL, I.S.; DIXON, R.A.F. Structural basis of β -adrenergic receptor function. *FASEB J.*, v. 3, p. 1825-1832, 1989.
- STROSBERG, A.D. Structural and functional diversity of β -adrenergic receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 757, p. 253-260, 1995.
- TOTA, M.R.; CANDELORE, M.R.; DIXON, R.A.; STRADER, C.D. Biophysical and genetic analysis of the ligand-binding site of the beta-adrenoceptor. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 12, n. 1, p. 4-6, Jan 1991.

- U'PRICHARD, D.C.; KVETNANSKY, R. **Catecholamines and stress**. In: Catecholamines and Stress: Recent Advances. E. USDIN; R. KVETNANSKY; I.J. KOPIN (ED). Pergamon Press, New York, p.299-308, 1980.
- 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.
- VANDERLEI, L.C.M.; MARCONDES, F.K.; LANZA, L.L.B.; SPADARI-BRATFISCH, R.C. Influence of the estrous cycle on the sensitivity to catecholamines in right atria from rats submitted to footshock stress. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v.74, p. 670-678, 1996.
- VAN ROSSUM, J.M. Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of the drug parameters. *Arch. Inter. Pharmacodyn. Ther.*, v. 143, n. 3-4, p. 229-330, 1963.
- VOGEL, W.H.; JENSH, R. Chronic stress and plasma catecholamines and corticosterone levels in male rats. *Neurosci. Lett.*, v. 87, n. 1-2, p. 183-188, 1988.
- VOSS, H.P., et al. Atypical molecular pharmacology of a new long acting beta-2 adrenoceptor agonist, TA2005. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 227, p. 403-409, 1992.
- VOSS, H.P.; SHUKRULA, S.; WU, T.S.; DONNELL, D.; BAST, A. A functional beta-2 adrenoceptor-mediated chronotropic response in isolated guinea pig heart tissue: selectivity of the potent beta-2 adrenoceptor agonist TA 2005. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 271, p. 386-389, 1994.
- WILLIAMS, L.T. et al. Thyroid hormone regulation of β -adrenergic receptor number. *J. Biol. Chem.*, v. 252, n. 8, p. 2787-2789, 1977.
- ZAR, J.H. Biostatistical analysis. 2.ed. New Jersey USA: Prentice-Hall International, 1984.
- ZHOU, X.M.; FISHMAN, P.H. Desensitization of the human β_1 -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.*, v. 266, n. 12, p. 7462-7468, 1991.

8. ANEXO

XI Reunião Anual da Federação de Sociedades de **Biologia Experimental** 21 a 24 de agosto de 1996 / Caxambu - MG

XXI Congresso Brasileiro de Biofísica
XXVIII Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental
XIV Congresso Brasileiro de Fisiologia
XII Congresso Brasileiro de Investigação Clínica
XX Congresso Brasileiro de Neurociências e Comportamento

Participação

Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular
Sociedade Brasileira de Imunologia

Certificado

Certificamos que o trabalho: "11.082 - Estresse e sensibilidade às catecolaminas em cobaias" de autoria de: Souza, A.R.T., Tonani, E.C.F., Spadari-Bratfisch, R.C. foi apresentado na XI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, realizada de 21 a 24 de agosto de 1996, em Caxambu, M.G.


Comissão Organizadora