

Campinas, 23 de Maio de 1996.



BANCA EXAMINADORA

TITULARES:

Profa. Dra. REGINA CÉLIA SPADARI-BRATFISCH Profa. Regina

ProfaDra. ALBA REGINA MONTEIRO DE S. BRITO Alba Monteiro

Prof. Dr. ANTONIO DE MELO CABRAL Antonio de Melo Cabral

Prof. Dr. LOUIS ALLEN BARKER Louis Allen Barker

Prof. Dr. EDUARDO MOACIR KRIEGER Eduardo Moacir Krieger

SUPLENTE

Prof. Dr. RUI ERRERIAS MACIEL _____

Prof. Dr. BENEDITO HONÓRIO MACHADO _____

Aprovada

Angelina Zanesco

**EFEITO DA DESNERVAÇÃO SINO- AÓRTICA SOBRE A
SENSIBILIDADE A AGONISTAS β -ADRENÉRGICOS DE
ÁTRIOS DIREITOS ISOLADOS DE RATOS**

**Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do título de Doutor em Ciências na
área de Fisiologia.**

Campinas, 1996



9609784

Angelina Zanesco

**EFEITO DA DESNERVAÇÃO SINO- AÓRTICA SOBRE A
SENSIBILIDADE A AGONISTAS β -ADRENÉRGICOS DE
ÁTRIOS DIREITOS ISOLADOS DE RATOS**

Foi entregue a redação final
da obra (Tese) (a) candidato a)
Angelina Zanesco
e aprovada pela Comissão Julgadora.
[Assinatura]
23/05/96

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do título de Doutor em Ciências na
área de Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Célia Spadari-
Bratfisch.

Campinas, 1996

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

Z16e Zanesco, Angelina
Efeito da desnervação sino-aórtica sobre a sensibilidade a agonistas β -adrenérgicos de átrios direitos isolados de ratos / Angelina Zanesco. -- Campinas, SP : [s.n.]. 1996.

Orientador: Regina Célia Spadari-Bratfisch
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Hipertensão. 2. Pressão arterial. *3. Noradrenalina.
4. Rato como animal de laboratório. 5. Receptores de substâncias endógenas. I. Spadari-Bratfisch, Regina Célia. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Parte dos resultados apresentados nesta dissertação foram obtidos no Laboratório de Adrenoceptores do Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, com apoio financeiro CAPES-PICD, UNESP. Outra parte da pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Farmacologia Analítica do “Department of Pharmacology and Experimental Therapeutics”, Louisiana State University Medical Center, através do Programa de Doutorado Sanduíche, elaborado pelo Governo Brasileiro e subsidiado pelo CNPQ.

DEDICO

**À minha filha, Ana Paula, e ao meu marido,
André Luís, por suas vidas mudadas...**

“IN MEMORIUM”

**Otacília Magalhães Carneiro, uma amiga
sempre presente em minha vida, onde quer que
esteja....**

Meu pai, que me ensinou o valor da Escola.

AGRADECIMENTOS

Pelo constante apoio na execução deste trabalho agradeço aos:

- Departamento de Educação Física, em nome do Prof. Dr. Luíz Alberto Lorenzetto, do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista,

- Departamento de Fisiologia e Biofísica, em nome da Profa. Dra. Elenice A. M. Ferrari, Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas,

- Department of Pharmacology, in name of Joseph Moerschbaecher, PhD., Louisiana State University Medical Center.

Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior, Programa Institucional de Capacitação Docente (CAPES- PICD), Fundação da UNESP (FUNDUNESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Apoio ao Ensino e à Pesquisa (FAEP) pelo apoio financeiro.

Prof. Dra. Regina Celia Spadari-Bratfisch por dar-me a oportunidade de crescer, tanto pessoal quanto profissionalmente.

Prof. Dr. Louis Allen Barker “who taught me how **Pharmacology can be fun...**”

Prof. Dr. Eduardo Moacyr Krieger que me ensinou quão importante é conhecer o nosso primeiro instrumento de trabalho: o polígrafo, e despertou meu interesse pela hipertensão.

Dr. Edson Moreira quem me mostrou pela primeira vez, como fazer denervação sino-aórtica.

Prof. Dr. Benedito Honório Machado e sua técnica de laboratório, que me ajudaram a tornar-me independente na execução da desnervação sino-aórtica.

Prof. Kurt Varner for friendly advice and kind attention.

Prof. Dennis Paul e Mrs. Lerna Minor who taught me how to perform radioligand experiments.

Ao Prof. Dr. Elisardo Vasquez pela confiança e pela oportunidade dada.

Ao amigo Cabral e sua família pela vida compartilhada no berço do Jazz.

Vandi pela valiosa amizade e pela ajuda diária no laboratório.

Prof. Everardo Magalhães Carneiro e Prof. Dr. José Roberto Moreira de Azevedo, verdadeiros amigos.

Profa. Dra. Eliete Luciano e Profa. Dra. Maria Alice Rostom de Mello, pela amizade.

Aos amigos do laboratório de Biodinâmica...

Aos amigos de todas as horas, em especial Zezé, Edson, Fernanda e Luiz.

Meu irmão, Jose Antonio Zanesco e sua família, pelas cartas recebidas a cada semana na América e por compartilharmos os bons e maus momentos de nossas vidas...

Minha mãe que com sua vida simples ensinou-me os princípios básicos da existência: justiça, honestidade e o bom comportamento, este último eu não consegui apreender muito bem...

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	vi
LISTA DAS FIGURAS	x
LISTA DAS TABELAS	xii
RESUMO	01
INTRODUÇÃO	03
1- TEORIA DROGA-RECEPTOR	04
2- AS CATECOLAMINAS E OS ADRENOCEPTORES	16
3- SENSIBILIDADE ÀS CATECOLAMINAS	19
3.1- SISTEMAS DE RECAPTAÇÃO E METABOLIZAÇÃO DAS CATECOLAMINAS	20
3.2- AFINIDADE DE AGONISTAS	21
3.3- DESSENSIBILIZAÇÃO DO RECEPTOR	22
3.3.1- DESACOPLAMENTO	22
3.3.2- SEQUESTRO	23
3.3.3- <i>DOWN-REGULATION</i>	24
3.4- <i>UP-REGULATION</i> DO RECEPTOR	24
4- REFLEXO BAROCEPTOR.....	25
5- EFEITO DA DESNERVAÇÃO SINO-AÓRTICA (DSA) NA RESPOSTA ÀS CATECOLAMINAS	27
OBJETIVO	30
MATERIAL E MÉTODOS	31
1- PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	31
2- EXPERIMENTOS FUNCIONAIS USANDO ÁTRIO DIREITO ISOLADO	32

3- OBTENÇÃO E ANÁLISE DAS CURVAS CONCENTRAÇÃO- EFEITO	33
4- EXPERIMENTOS USANDO O RADIOLIGANTE: ¹²⁵ IODOCIANOPINDOLOL (¹²⁵ ICYP)	36
5- ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
6- FÁRMACOS	38
RESULTADOS	39
1- EVOLUÇÃO TEMPORAL DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA E FREQUÊNCIA CARDÍACA EM RATOS COM CIRURGIA SIMULADA OU DESNERVAÇÃO SINO- AÓRTICA	39
2- EVOLUÇÃO TEMPORAL DA SENSIBILIDADE DA RESPOSTA β - ADRENÉRGICA E A PARTICIPAÇÃO DOS SISTEMAS DE RECAPTAÇÃO DAS CATECOLAMINAS	40
3- EFEITO DA DESNERVAÇÃO SINO-AÓRTICA SOBRE A RESPOSTA CRONOTRÓPICA AO ISOPROTERENOL, NORADRENALINA E PRENALTEROL	50
4- CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DOS ADRENOCEPORES β QUE MEDEIAM O CRONOTROPISMO	53
5- EFEITO DA DESNERVAÇÃO SINO-AÓRTICA (DSA) SOBRE A LIGAÇÃO DO ¹²⁵ IODOCIANOPINDOLOL (¹²⁵ ICYP)	59
6- EFEITO DA DESNERVAÇÃO SINO-AÓRTICA NA AFINIDADE (pK_d) E NA EFICÁCIA (τ) DO PRENALTEROL	61
DISCUSSÃO	64
CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
ABSTRACT	82

LISTA DAS FIGURAS

- Figura 1. Efeito do bloqueio dos sistemas de recaptção neuronal e extraneuronal, denominado nas figuras de *uptake*, na resposta cronotrópica à noradrenalina (NA) em átrios direitos isolados 1, 3, 7, 15 e 30 dias após cirurgia simulada 42
- Figura 2. Efeito do bloqueio dos sistemas de recaptção neuronal e extraneuronal, denominado nas figuras de *uptake*, na resposta cronotrópica à noradrenalina (NA) em átrios direitos isolados 1, 3, 7, 15 e 30 dias após desnervação sino-aórtica. 43
- Figura 3. Efeito do bloqueio dos sistemas de recaptção neuronal e extraneuronal, denominado nas figuras de *uptake*, na resposta cronotrópica ao isoproterenol (ISO) em átrios direitos isolados 1, 3, 7, 15 e 30 dias após cirurgia simulada..... 46
- Figura 4. Efeito do bloqueio dos sistemas de recaptção neuronal e extraneuronal, denominado nas figuras de *uptake*, na resposta cronotrópica ao isoproterenol (ISO) em átrios direitos isolados 1, 3, 7, 15 e 30 dias após desnervação sino-aórtica. 47
- Figura 5. Evolução temporal da sensibilidade à noradrenalina (NA) em átrios direitos de ratos submetidos à desnervação sino-aórtica, após bloqueio dos sistemas de recaptção neuronal e extraneuronal. 48
- Figura 6. Evolução temporal da sensibilidade ao isoproterenol (ISO) em átrios direitos de ratos submetidos à desnervação sino-aórtica, após bloqueio dos sistemas de recaptção neuronal e extraneuronal 49
- Figura 7. Curvas concentração-efeito para a resposta cronotrópica ao isoproterenol (ISO) e prenalterol (PREN) em átrios direitos isolados de animais controle (A), sham-operados (B) ou DSA (C). 52
- Figura 8. Curvas concentração-efeito à noradrenalina (NA) em átrios direitos isolados de animais controle (naive), com cirurgia simulada (sham) ou DSA..... 52
- Figura 9. Curvas de inibição ao prenalterol (PREN) na presença de 100 pM de ¹²⁵I-CYP em preparações de membranas atriais obtidas de animais controle (naive), com cirurgia simulada (sham) ou DSA..... 49
- Figura 10. Antagonismo da resposta cronotrópica ao isoproterenol (ISO) pelo CGP 20712A em átrios direitos isolados de ratos controles..... 53
- Figura 11. Antagonismo da resposta cronotrópica à noradrenalina (NA) pelo CGP 20712A em átrios direitos isolados de ratos controles 54
- Figura 12. Antagonismo da resposta cronotrópica ao isoproterenol (ISO) pelo ICI 118,551 em átrios direitos isolados de ratos controles 54

Figura 13. Antagonismo da resposta cronotrópica à noradrenalina (NA) pelo ICI 118,551 em átrios direitos isolados de ratos controles.	55
Figura 14. Regressão de Schild para o antagonismo do isoproterenol (ISO) e noradrenalina (NA) pelo CGP 20712A (CGP) ou pelo ICI 118,551 (ICI)	57
Figura 15. Antagonismo da resposta cronotrópica ao isoproterenol (ISO) pelo CGP 20712A (10 nM) em átrios direitos isolados de ratos submetidos à cirurgia simulada (sham) ou (A) ou DSA (B).....	58
Figura 16. Curvas de saturação ao ¹²⁵ I-Cianopindolol (¹²⁵ ICYP) em membranas atriais obtidas de animais controle (naive) , ou sete dias após a cirurgia simulada (sham) ou à desnervação sino-aórtica (DSA).	60

LISTA DAS TABELAS

TABELA 1. Evolução temporal da pressão arterial média e frequência cardíaca de ratos em diferentes períodos após a cirurgia simulada (sham) ou desnervação sino-aórtica (DSA).	39
TABELA 2. Efeito do bloqueio dos sistemas neuronal e extraneuronal na sensibilidade à noradrenalina em átrios direitos de ratos.	41
TABELA 3. Efeito do bloqueio dos sistemas neuronal e extraneuronal sobre a sensibilidade ao isoproterenol em átrios direitos de ratos.....	45
TABELA 4. Parâmetros obtidos das curvas concentração-efeito para a resposta cronotrópica ao isoproterenol (ISO), à noradrenalina (NE) e ao prenalterol (PREN) em átrios direitos isolados.	51
TABELA 5. Estimativas dos valores de pK_B do CGP 20712A e ICI 118,551 em átrios direitos isolados de ratos controles, frente ao isoproterenol (ISO) ou noradrenalina (NA)	56
TABELA 6. Parâmetros obtidos das curvas de saturação ao ^{125}I -cianopindolol (^{125}I CYP) em membranas atriais de animais controles, com cirurgia simulada (sham) e com desnervação sino-aórtica (DSA)	61
TABELA 7. Efeito da desnervação sino-aórtica (DSA) na afinidade (pK_d) e na eficácia (τ) do Prenalterol.	62

RESUMO

A desnervação sino-aórtica (DSA), ao interromper a aferência neuronal dos barorreceptores aórticos e carotídeos, libera o sistema nervoso simpático de uma fonte primária de inibição e causa imediatamente, hipertensão e taquicardia. A hipertensão pode persistir por alguns meses e caracteriza-se por extrema labilidade da pressão arterial. Enquanto que a taquicardia é transitória e dura cerca de duas semanas.

Este estudo foi realizado para determinar o efeito da DSA na sensibilidade da resposta cronotrópica a agonistas β -adrenérgicos em átrios direitos de ratos. Os átrios direitos foram isolados 1, 3, 7, 15 e 30 dias após a cirurgia simulada ou a DSA, e curvas concentração-efeito aos agonistas plenos isoproterenol (ISO) e noradrenalina (NA) foram obtidas. O agonista parcial, prenalterol (PREN) foi utilizado somente em tecidos obtidos sete dias após a cirurgia.

Os resultados dos estudos para determinar se a DSA produzia alterações nos sistemas de recaptação neuronal e extraneuronal, mostraram que a DSA não afetava esses sistemas de metabolização. A DSA causou diminuição na sensibilidade da resposta cronotrópica ao ISO e à NA de cerca de 3 a 4 vezes, a nível da pEC_{50} , sem mudanças na resposta máxima. Subsensibilidade foi observada para os dois agonistas ISO e NA no terceiro e sétimo dias após a DSA., enquanto que no décimo-quinto dia foi observada subsensibilidade somente para a NA. Os tecidos atriais não foram subsensíveis tanto no primeiro quanto no trigésimo dias após a DSA.

Análise dos subtipos de adrenoceptores β , que estariam mediando a resposta cronotrópica, a afinidade e a eficácia a agonistas e a densidade dos sítios ligantes desses adrenoceptores foram determinadas.

A DSA causou uma diminuição na sensibilidade e na resposta máxima ao agonista parcial, PREN. Essas alterações foram associadas à diminuição na eficácia, sem mudança na afinidade do agonista.

Os resultados dos estudos com antagonistas seletivos β_1 e β_2 mostraram que a população que está mediando a resposta cronotrópica às catecolaminas é homogênea β_1 em átrios direitos isolados de ratos controles e com DSA.

DSA não induziu o aparecimento de adrenoceptores β_2 funcionais. Os resultados dos experimentos com radioligante ^{125}I -cianopindolol ($^{125}\text{ICYP}$) confirmaram e mostraram que a DSA produziu diminuição no número de sítios receptores β -adrenérgicos, sem mudanças na afinidade tanto ao $^{125}\text{ICYP}$ quanto ao PREN.

Concluindo a DSA induziu uma diminuição na sensibilidade a agonistas em átrios direitos isolados que parece ser devida à *down-regulation* dos adrenoceptores β_1 .

INTRODUÇÃO

Esta dissertação descreve os efeitos da desnervação sino-aórtica (DSA) sobre a resposta cronotrópica às catecolaminas em átrios direitos isolados de ratos. Inicialmente testamos se a diminuição na potência dos agonistas em ativar os adrenoceptores β atriais em ratos com DSA, era devida à redução do número desses adrenoceptores. Esta hipótese foi testada pela aplicação da análise quantitativa da teoria droga-receptor sobre os dados obtidos em experimentos funcionais nos quais o efeito da DSA na resposta cronotrópica ao isoproterenol (ISO) e à noradrenalina (NA) foi determinado em átrios direitos isolados de ratos em diferentes períodos após a cirurgia. Adicionalmente, curvas concentração-efeito foram obtidas para o agonista parcial prenalterol (PREN) em átrios direitos de ratos submetidos a falsa cirurgia e à DSA após sete dias. Os resultados destes experimentos permitiram avaliar os efeitos da DSA na sensibilidade do tecido atrial através da análise da afinidade e da eficácia dos agonistas usados. O uso de antagonistas competitivos permitiu também identificar o subtipo de adrenoceptor β envolvido na resposta cronotrópica. O efeito da DSA na densidade dos adrenoceptores β foi determinado por meio de experimentos usando radioligantes, onde as afinidades do agonista PREN e do antagonista 125 I-CYP para os sítios receptores foram determinadas.

1- TEORIA DROGA-RECEPTOR

"Perhaps no other interaction between a small molecule and a receptor is as shrouded in mystery as the interaction that results in a physiological response (KENAKIN, 1993)."

Empiricamente, a relação entre a concentração de um agonista e a resposta que ele produz é dada pela equação:

$$E = E_{\max}[A]/([A] + EC_{50}) \quad (1)$$

Onde E corresponde ao efeito observado, E_{\max} é a resposta máxima produzida pelo agonista, [A] é a concentração do agonista e EC_{50} é a medida da potência do agonista, e é definida como a concentração do agonista que produz metade da E_{\max} . EC_{50} corresponde também à medida da sensibilidade do tecido ao agonista.

CLARK (1926) foi o primeiro a estudar quantitativamente a interação droga-receptor. Este autor propôs que a interação das drogas com seus receptores farmacológicos obedecia à lei de Langmuir (LANGMUIR, 1918). De acordo com essa teoria, a ocupação do receptor (R) pelo ligante (L) obedece à lei de ação das massas, ou seja:



onde, k_1 é a constante de associação para a formação do complexo LR e k_{-1} é a constante de dissociação de LR. Assumindo que a interação entre L e R é bimolecular; que $[L] \gg [R]$; e no equilíbrio, $\delta[L]/\delta t = 0$; então:

$$k_1[L][R] = k_{-1}[LR] \quad (3)$$

e a constante de dissociação no equilíbrio, K_d , é dada por:

$$K_d = k_{-1}/k_1 = [L][R]/[LR] \quad (4)$$

A concentração total de receptores $[R_T]$ é a soma de $([R] + [LR])$, onde $[R]$ corresponde à concentração de receptores livres e $[LR]$ a concentração de receptores ligados. Definindo $[R]$ como $([R_T] - [LR])$, substituindo na equação 4 e rearranjando os termos, a fração de $[R_T]$ ocupada por L será:

$$[LR]/[R_T] = [L]/([L] + K_d) \quad (5)$$

CLARK (1926) acreditava que a magnitude do efeito farmacológico de um agonista, A , era diretamente proporcional ao número de receptores ocupados pela droga, e que a resposta máxima era obtida somente quando todos os receptores eram ocupados. Assim,

$$E/E_{\max} = [AR]/[R_T] = ([A]/[A] + K_d) \quad (6)$$

Onde E é o efeito observado e E_{\max} é a resposta ou efeito máximo. A concentração de um agonista que produz metade da resposta máxima, EC_{50} , corresponderia ao K_d daquele agonista para o receptor que estava mediando a resposta e deveria ser independente do tecido no qual o receptor estava localizado. Como o valor de K_d descreve a interação entre o ligante (o agonista) e o sítio de ligação (o receptor), a determinação do valor K_d de um agonista para seu receptor deveria fornecer um método prático na classificação dos receptores.

Em 1937, CLARK reconheceu que a ação das drogas dependia sobretudo de dois fatores: da ligação da droga com o receptor e da capacidade da droga em produzir uma resposta após a ligação. No entanto, CLARK (1937) não direcionou seus estudos, para a avaliação quantitativa do segundo fator, relacionado à capacidade da droga desencadear uma resposta após sua ligação com o receptor.

ARIENS (1954) introduziu o conceito de atividade intrínseca como um fator de proporcionalidade entre a resposta do tecido e a ocupação do receptor. Ele propôs que a resposta biológica deveria ser dividida em dois parâmetros independentes: afinidade, que descreve a ligação da droga com o receptor e é governado pela lei da ação das massas, e atividade intrínseca, α , que era relacionada com a habilidade da droga induzir um efeito após ligar-se ao receptor:

$$E = \alpha E_{\max} [A] / ([A] + K_d) \quad (7)$$

Assim, atividade intrínseca foi definida como a propriedade de um agonista produzir um efeito por unidade do complexo fármaco-receptor. O valor numérico da atividade intrínseca variava de zero (para antagonistas) até a unidade (para agonistas plenos). Drogas com valores intermediários de α eram agonistas parciais ou dualistas, isto é, esses agentes possuíam as propriedades tanto de agonista como de antagonista. ARIENS (1954), assim como CLARK (1937), também assumiu que para se obter a resposta máxima era necessário que todos os receptores fossem ocupados. O modelo de Ariens forneceu bases racionais para definir agonistas plenos, agonistas parciais e antagonistas. No entanto, a atividade intrínseca dos agonistas parecia variar entre os tecidos.

STEPHENSON (1956) expandiu os conceitos da teoria droga-receptor previamente apresentados por CLARK (1926; 1937) e ARIENS (1954) introduzindo o

conceito de que a resposta farmacológica não precisava ser linearmente proporcional à ocupação dos receptores. Em seu modelo, o efeito inicial de uma droga após ligar-se ao receptor era a geração de um estímulo, S , que levava uma resposta fisiológica, $E = f(S)$. A habilidade de uma droga produzir um estímulo foi definida como eficácia, e . Eficácia foi considerado um parâmetro referente à droga e drogas diferentes pareciam diferir quanto à sua eficácia. FURCHGOTT (1966) modificou o modelo de STEPHENSON (1956) levando em consideração as observações de que a eficácia de um agonista variava entre os tecidos. FURCHGOTT (1966) redefiniu o termo eficácia (e) elaborado por Stephenson como:

$$e = \varepsilon[R_T] \quad (8)$$

Onde ε é a atividade intrínseca ou eficácia, um parâmetro droga dependente e que é definido como a habilidade de uma droga em produzir um estímulo; e $[R_T]$ é a população de receptores funcionais. Estímulo (S), que não possui dimensão, foi definido como o produto da eficácia pela ocupação fracional:

$$S = \varepsilon[R_T]\{[A]/([A] + K_d)\} \quad (9)$$

Assumiu-se que a relação funcional entre S e a resposta fracional, E/E_{max} , era hiperbólica e definiu-se arbitrariamente como:

$$E/E_{max} = S/(S + 1) \quad (10)$$

Respostas equivalentes produzidas por diferentes drogas ocorreriam quando os estímulos que elas produzissem fossem iguais.

Dessa maneira, os conceitos de “agonistas de alta eficácia”, “baixa eficácia” e “receptores de reserva” foram introduzidos a partir dos estudos de STEPHENSON (1956) e de FURCHGOTT (1966). Drogas com alta eficácia ou também chamados agonistas plenos, seriam aquelas que poderiam produzir o efeito máximo ocupando

somente pequena porção da população total de receptores presentes num dado tecido. Neste caso, o agonista pleno teria uma reserva de receptores, e assim a potência, EC_{50} , seria numericamente menor que a afinidade, K_d (BESSE & FURCHGOTT, 1976). Por outro lado, agonistas com baixa eficácia ou agonistas parciais precisariam ocupar todos ou grande parte dos receptores presentes no tecido para produzir a resposta máxima, e esta seria inferior à resposta máxima que o tecido poderia produzir frente a agonistas plenos. Assim, para agonistas de baixa eficácia não haveria receptores de reserva e a EC_{50} aproximar-se-ia do valor de K_d . A EC_{50} de um agonista seria determinada pela sua afinidade pelo receptor, pela fração de receptores e pela sua eficácia intrínseca. Eficácia, diferente de atividade intrínseca, é determinada por dois parâmetros: resposta máxima e potência.

O modelo de Stephenson/Furchgott forneceu as bases para a determinação da afinidade dos agonistas e suas eficácias relativas. Análises das curvas concentração-efeito para agonistas de alta e de baixa eficácia permitem-nos a estimativa da afinidade aparente para agonistas de baixa eficácia (STEPHENSON, 1956; BARLOW *et al.*, 1967). A estimativa da afinidade aparente de agonistas de alta eficácia pode ser obtida pela análise dos dados obtidos nas curvas concentração-efeito antes e após alquilação irreverssível de uma fração dos receptores que medeiam a resposta (FURCHGOTT, 1966). As bases teóricas para a estimativa da afinidade de agonistas parciais são apresentadas abaixo. A equação 11 é a expressão da hipótese nula, segundo a qual respostas equivalentes produzidas por um agonistas de alta eficácia, A, e por um agonista de baixa eficácia, P, determinariam estímulos equivalentes, $S_A = S_P$.

$$\varepsilon_A[R_T]\{[A]/([A] + K_A)\} = \varepsilon_P[R_T]\{[P]/([P] + K_P)\} \quad (11)$$

Rearranjando a equação 11 teremos a equação que é usada para estimar a afinidade do agonista:

$$[A] = (K_A / ((\epsilon_A / \epsilon_P) - 1)) + ((K_P / ((\epsilon_P / \epsilon_A) - 1)) \cdot [A] / [P]) \quad (12)$$

Esta equação é aplicada para comparar a ação de dois agonistas (A e P) em um mesmo tecido. Obtidas as estimativas das concentrações de A e P produzindo respostas equivalentes constrói-se a regressão de [A] em [A]/[P]. O coeficiente angular, ou a inclinação da reta de regressão corresponde à afinidade estimada do agonista parcial:

$$K_P = \text{inclinação} / ((\epsilon_P / \epsilon_A) - 1) \quad (13)$$

Este modelo somente fornece uma estimativa razoável do valor K_d de um agonista de baixa eficácia quando $\epsilon_P \ll \epsilon_A$. Esta é a limitação do método; eficácia, *per se*, não pode ser medida e a eficácia relativa somente pode ser obtida se houver uma estimativa independente da afinidade. Modificações subsequentes do modelo de Stephenson/Furchgott permitiram maior facilidade na análise dos dados.

Um refinamento do modelo de Stephenson/Furchgott para a ação dos agonistas foi introduzido por BLACK & LEFF (1983). O modelo originou de observações experimentais, onde a maior parte das curvas concentração-efeito obtidas eram de natureza hiperbólica. Aqueles autores assumiram que o efeito farmacológico, E, seria uma função de AR, $f(AR)$. Neste caso o complexo [AR] seria dado pelo rearranjo da equação 6:

$$AR = [A][R_T] / ([A] + K_d) \quad (14)$$

e a relação entre E e AR seria hiperbólica:

$$E = E_{\text{max-t}} [AR] / (K_E + [AR]) \quad (15)$$

Onde $E_{\max-t}$ é a resposta máxima do tecido, K_E é a concentração de AR que produz a metade da resposta máxima. Definindo AR em termos da equação 11 temos:

$$E = \{E_{\max-t} [A]([R_T]/K_E)\}/\{K_d + [A](1 + ([R_T]/K_E))\} \quad (16)$$

O termo $[R_T]/K_E$ descreve a eficiência do sinal de transdução celular, τ , que é uma definição operacional de eficácia. Substituindo τ por $[R_T]/K_E$ temos:

$$E = \{E_{\max-t} [A]\tau\}/\{K_d + [A](1 + \tau)\} \quad (17)$$

O termo τ é análogo à eficácia (ϵ) definida por Stephenson; é um fator dependente tanto do tecido quanto da droga (agonista) e é uma função da resposta máxima e da potência do agonista. A relação entre a resposta máxima produzida pelo agonista e τ é dada por:

$$\text{assíptota} = E_{\max-t} \cdot (\tau/\tau + 1) \quad (18)$$

A relação entre potência e τ é dada por:

$$EC_{50} = K_d/(1 + \tau) \quad (19)$$

A equação 17 somente pode ser usada para obter-se uma estimativa da afinidade do agonista parcial se a sua resposta máxima for menor do que aquela que o tecido pode apresentar, $E_{\max-t}$, (BLACK *et al.*, 1985). Satisfeita esta condição dados das curvas concentração-efeito para agonistas de baixa eficácia podem ser analisados diretamente pela equação 17, obtendo-se assim estimativas do valor de τ e de K_d , através da obtenção da resposta máxima na mesma preparação, $E_{\max-t}$, pelo uso de um agonista de alta eficácia.

Este modelo tem algumas vantagens sobre o modelo de Stephenson/Furchgott no qual curvas concentração-efeito completas não precisam ser obtidas para ambos os agonistas, o de baixa e o de alta eficácia. Além disso, os dados podem ser analisados

pela aplicação direta do modelo básico, sem necessidade do uso de transformações lineares, que muitas vezes distorcem os dados levando a erros. No entanto, a caracterização dos receptores pelo uso de agonistas é limitada pelo fato de que um receptor específico pode interagir com mais do que uma proteína transdutora, e que um determinado complexo agonista-receptor pode ter diferentes afinidades por diferentes proteínas transdutoras (KENAKIN, 1993). Este problema não acontece com o uso de antagonistas competitivos.

Um antagonista competitivo verdadeiro tem afinidade mas não tem eficácia. GADDUM (1937) foi o primeiro a definir os princípios de um antagonismo competitivo simples ao mostrar que um antagonista competitivo simples era aquele que deslocava para a direita a curva concentração-efeito, a um determinado agonista, sem afetar a resposta máxima. Além disso, o mesmo autor demonstrou que a magnitude desse deslocamento era função da concentração do antagonista, [B], e da afinidade, K_B , do antagonista pelo receptor. A EC_{50} do agonista na presença do antagonista seria modificada pelo termo $(1 + [B]/K_B)$. A resposta ao agonista em presença do antagonista seria dada por:

$$E = E_{\max}[A]/([A] + EC_{50}(1 + [B]/K_B)) \quad (20)$$

Pela equação 20, pode-se observar que um antagonista competitivo simples modifica somente a potência do agonista, a EC_{50} .

ARUNLAKSHAMA & SCHILD (1959) descreveram um modelo quantitativo para analisar o antagonismo competitivo. Para respostas equivalentes obtidas na ausência e na presença do antagonista foi definida uma igualdade a partir das equações (1) e (20):

$$E_{\max}[A]/([A] + EC_{50}) = E_{\max}[A']/([A'] + EC_{50}(1 + [B]/K_B)) \quad (21)$$

cujo rearranjo torna:

$$[A']/[A] - 1 = [B]/K_B \quad (22)$$

onde [A] e [A'] respectivamente, são as concentrações do agonista que produzem respostas equivalentes na ausência e na presença de uma concentração conhecida do antagonista, [B], que possui afinidade, K_B , para o receptor. A equação 23 é a forma mais comumente escrita para expressar esta relação (ARUNLAKSHANA & SCHILD, 1959):

$$\log (CR - 1) = \log[B] - \log K_B \quad (23)$$

onde CR corresponde à razão das concentrações $[A']/[A]$. Essa equação é conhecida como "Equação de Schild".

Curvas concentração-efeito para o agonista, A, são geradas na ausência e na presença de diversas concentrações do antagonista, B. A regressão do $\log (CR - 1)$ sobre o $\log [B]$ fornecerá, se B for um antagonista competitivo simples, uma linha reta com coeficiente angular que não difere estatisticamente da unidade. O intercepto desta linha reta no eixo das abscissas dará o valor de $-\log K_B$, que corresponde à afinidade do antagonista pela população de receptores que está mediando a resposta. No antagonismo competitivo simples, ou seja, nas situações em que uma população homogênea de receptores está mediando a resposta, o valor K_B para qualquer antagonista deve ser independente do agonista usado. No entanto, valores de coeficiente angular estatisticamente diferentes da unidade, sugerem a existência de diferentes mecanismos de antagonismo e/ou que o equilíbrio entre o agonista ou antagonista e o receptor não foi atingido (KENAKIN, 1982; 1990; 1993).

A regressão de Schild é um instrumento farmacológico clássico extremamente poderoso na classificação das drogas e dos receptores em estudos funcionais com

tecidos isolados. A aplicação da análise de Schild por diversos investigadores mostrou-se valiosa tanto na caracterização dos receptores como na descoberta de subtipos de receptores envolvidos em diferentes respostas. Exemplos disso são a classificação dos receptores para histamina, acetilcolina, catecolaminas e opióides, como também para outros neurotransmissores e hormônios (ARUNLAKSHANA & SCHILD, 1959; BLACK *et al.*, 1972; BLINKS, 1967; KOSTERLITZ & WATT, 1968). Regressões de Schild não lineares e variações do valor K_B de antagonistas que dependiam do agonista usado foram achados importantes que permitiram a caracterização dos subtipos de adrenoceptores β (FURCHGOTT, 1972).

As informações citadas até aqui ilustram a utilidade de experimentos funcionais em obter parâmetros relacionados à eficácia operacional de agonistas, ou relacionados à afinidade de agonistas e/ou antagonistas. No entanto, os resultados de experimentos funcionais não fornecem informações sobre o número de receptores presentes num tecido. O desenvolvimento de experimentos usando radioligantes permitiu que esta importante informação fosse obtida.

Estudos usando radioligantes foram primeiramente empregados para identificar e caracterizar os sítios receptores em vários tecidos. Os principais parâmetros que podem ser determinados com esses experimentos são a densidade de uma dada classe de sítios de receptores (B_{max}) e a afinidade (K_d) do ligante pelo sítio de ligação do receptor. As afinidades obtidas em experimentos com radioligantes podem ser comparadas com aquelas obtidas em estudos funcionais (SCHWARZ, 1992).

Os mesmos fundamentos conceituais mostrados acima nas equações 2 até 6 podem ser aplicados para descrever as interações quantitativas entre radioligantes e receptores. Para que os resultados obtidos tenham validade prática em experimentos

deste tipo, é necessário dispor de um ligante de alta afinidade, L^* , e de alta especificidade radioativa. A alta afinidade é necessária para que o isolamento do complexo L^*R seja completo, ou seja, a constante de dissociação (k_{-1}) deve ser numericamente inexpressiva. A alta especificidade radioativa é necessária para permitir a detecção do complexo L^*R em baixas concentrações, na faixa de femtomoles.

Assume-se que os sítios ligantes do receptor, por definição, sejam em número finito, e que a ligação seja, portanto, saturável, obedecendo à Lei de Langmuir. Além disso o ligante interagiria com uma classe de sítos de ligação. Portanto, a interação ligante-receptor pode ser descrita como:

$$B = B_{\max} [L]/([L] + K_d) \quad (24)$$

Em geral, existem dois tipos de experimentos que utilizam ligantes radioativos para determinar os valores de B_{\max} e K_d . O primeiro deles é o experimento de saturação, que mede diretamente a produção de L^*R . Em estudos usando o método de saturação, os receptores da membrana, isolados por ultracentrifugação, são incubados com concentrações crescentes de L^* por um período de tempo no qual o equilíbrio entre L^* e R é atingido. O complexo L^*R formado é isolado por filtração a vácuo e a quantidade desse complexo é determinada pela leitura das emissões de ondas radioativas, do tipo β ou γ , dependendo do isótopo escolhido. Como a preparação usada em experimentos de radioligantes, é uma solução homogeneizada das proteínas acopladas à membrana, contendo receptores e outros sítios ligantes, a ligação do L^* pode ocorrer em diferentes sítios presentes na preparação. Consequentemente, na prática, a preparação é incubada com L^* sozinho para obter estimativas da ligação total (todos os sítios ligantes) e, em paralelo, obtém-se

estimativas de L^* em presença de uma alta concentração de um ligante não radioativo, que deve ser quimicamente diferente do ligante radioativo e que tenha alta afinidade pelo sítio receptor. O ligante não radioativo, competirá com L^* pelo receptor de interesse mas, devido à sua composição química diferente, não deslocará o ligante radioativo de outros sítios não específicos. A diferença entre o valor total obtido e o valor das ligações não específicas definirá a ligação específica. Esta última reflete a população dos receptores a ser estudada. As ligações específicas podem ser estimadas por modelos matemáticos que assumem que as ligações em sítios específicos é saturável enquanto que as ligações inespecíficas não são saturáveis e são uma função linear da concentração do ligante radioativo (BYLUND & YAMAMURA, 1990). A análise da ligação específica pela equação 24 permite uma estimativa dos valores de B_{max} e de K_d .

No segundo tipo de experimento com radioligantes mede-se a afinidade do ligante pelo receptor por meio da curva de deslocamento ou experimentos de competição. Neste tipo de experimentos uma concentração fixa do ligante radioativo de afinidade conhecida (K_{d-L^*}) é equilibrada com os receptores de membrana na ausência e na presença de várias concentrações de um ligante não radioativo, que compete pelo mesmo receptor. Como as concentrações crescentes do ligante não radioativo deslocam proporcionalmente L^* , a radioatividade medida associada com o receptor fica reduzida, gerando uma curva de inibição. A concentração do ligante não radioativo que produz 50% de inibição da ligação específica, IC_{50} , é obtida pela análise dos dados através da equação 1. A relação entre a IC_{50} e os valores K_d do ligante não radioativo é dada pela equação abaixo (CHENG & PRUSOFF, 1973):

$$K_d = IC_{50} / (1 + ([L^*] / K_{d(L^*)})) \quad (25)$$

Os experimentos de competição permitem uma estimativa dos valores K_d de agentes que tem baixa afinidade ou que não estão disponíveis na forma de isótopo.

Neste trabalho nós utilizamos tanto experimentos funcionais quanto experimentos com radioligantes para determinar os efeitos da desnervação sino-aórtica sobre os adrenoceptores β atriais de ratos.

2- AS CATECOLAMINAS E OS ADRENOCEPTORES

Os mediadores endógenos do sistema nervoso simpático são a noradrenalina, liberada dos terminais nervosos pós-ganglionares, e a noradrenalina e adrenalina, liberadas da medula adrenal.

As catecolaminas endógenas, adrenalina e noradrenalina, modulam a pressão arterial através de, no mínimo, quatro mecanismos: 1- ações no sistema nervoso central; 2- controle direto no tônus vascular; 3- modulação do fluxo de sódio no túbulo proximal renal e, por último, alteração da liberação de renina e do sistema renina-angiotensina-aldosterona (BERNE & LEVY, 1990, GUYTON, 1993).

As catecolaminas iniciam suas ações por interação com receptores de membrana, denominados adrenoceptores. A sua ligação com os adrenoceptores é rápida, reversível, saturável e estereoseletiva. A ocupação dos adrenoceptores pelas catecolaminas leva à formação de segundos mensageiros intracelulares que desencadeiam a resposta fisiológica.

Os adrenoceptores foram inicialmente divididos em duas grandes categorias, α e β (AHLQUIST, 1948), os quais foram posteriormente classificados em subtipos com base em suas propriedades farmacológicas de serem estimulados ou bloqueados, por

drogas seletivas e também por sequenciamento dos aminoácidos que partilham em sua estrutura proteica. Os subtipos de adrenoceptores atualmente conhecidos são α_1 , α_2 , β_1 , β_2 e β_3 . Estes subtipos podem ser subdivididos ainda mais em: α_{2a} e α_{2b} , e α_{1a} e α_{1b} , e talvez outros (LANDS *et al.*, 1967, LANGER, 1974, BERTHELSON & PETTINGER, 1977, STARKE, 1981, HAN *et al.*, 1987, REGAN *et al.*, 1988, McGRATH & WILSON, 1988, HAN & MINNEMAN, 1990, FORD *et al.*, 1994).

Os adrenoceptores α_1 , ao estimularem a fosfolipase C, levam a um aumento na degradação do ácido aracdônico (AA), formando o fosfatidil inositol (IP3) e o diacilglicerol (DAG). Há também evidências de que os adrenoceptores α_1 podem se acoplar ao metabolismo do ácido aracdônico, possivelmente via uma fosfolipase A, e a canais de cálcio, através de mecanismo desconhecido (MINNEMAN, 1988). Os adrenoceptores α_2 parecem mediar a resposta fisiológica através da inibição da adenilil ciclase e os adrenoceptores β_1 , β_2 e β_3 medeiam a resposta através da estimulação da adenilil ciclase (EMORINE *et al.*, 1989, 1994).

Os adrenoceptores pertencem a uma super família de receptores de membrana estreitamente relacionados e que são acoplados às proteínas G. Fazem parte dessa família, além dos adrenoceptores, os receptores muscarínicos, os receptores de histamina H_2 , os receptores de serotonina, 5-HT_{1c} e o fotoreceptor rodopsina (LEFKOWITZ & CARON, 1988). Todas essas proteínas receptoras compartilham uma estrutura peptídica comum na qual a porção amino terminal (N), no lado extracelular da membrana, é conectada à uma cadeia carboxílica terminal (C), no lado intracelular da membrana, por sete domínios transmembrana. O tamanho relativo das cadeias N- e C-terminais e da terceira alça intracelular varia consideravelmente de receptor para

receptor (RAYMOND *et al.*, 1990, BIRNBAUMER, 1992). A terceira alça intracelular dos adrenoceptores β é o sítio de acoplamento desses receptores com a proteína G.

A estimulação dos adrenoceptores β ativa uma proteína G, denominada Gs. As proteínas G são heterotrímeros consistindo de uma subunidade hidrofílica α , e duas subunidades hidrofóbicas β e γ . Existem, no mínimo, vinte distintas proteínas G, baseadas na presença de isoformas da subunidade α : quatro isoformas de Gs; três de proteínas Gi; duas isoformas de Go; uma Gz; duas Gq e duas transducinas. Destas, somente oito foram purificadas livres e não associadas a outros elementos da membrana. Na ausência de agonista, quando a proteína G está na forma inativa, uma molécula de guanosina difosfato (GDP) encontra-se ligada à subunidade α e formam um complexo associado às subunidades β e γ . Na presença do agonista, o receptor ativado interage com a proteína G e induz a troca de GDP por GTP na subunidade α . Após ligar-se ao GTP, a subunidade α dissocia-se das subunidades $\beta\gamma$ e torna-se ativada. A subunidade α permanece livre até que ocorra a hidrólise de GTP e a formação novamente de GDP, levando a sua reassociação com as subunidades $\beta\gamma$ (BIRNBAUMER, 1990, 1992). A subunidade α da proteína Gs quando ativada leva à estimulação da adenilil ciclase (RODBELL, 1980, GILMAN, 1987). Recentes experimentos feitos em coração isolado sugerem que Gs pode ter uma segunda função através da ativação direta de canais de cálcio do tipo L (YATANI *et al.*, 1987). Gs é irreversivelmente ativada pela toxina da cólera, mas não pela toxina da pertussis (BIRNBAUMER, 1992).

Diferente dos receptores acoplados às proteínas G ou da própria proteína G, os seus efetores não constituem uma super família e são os menos compreendidos

dentro da cadeia de eventos celulares que caracterizam a transdução do sinal celular evocado pelo agonista. Os sistemas efetores incluem a adenilil ciclase, as fosfolipases C e A2 e possivelmente, a fosfolipase D. Várias classes de canais iônicos são também considerados pertencentes ao sistema de efetores, incluindo K_{ATP} e K_{ACh} , canais de cálcio voltagem-dependentes, canais catiônicos monovalentes não seletivos, como os canais do marca passo cardíaco que conduzem correntes denominados I_f (YATANI *et al.*, 1990). Conseqüentemente, a ativação de receptores acoplados à proteína G por agonistas pode desencadear não somente mudanças nas concentrações intracelulares de AMP (adenosina monofosfato) e GMP (guanosina monofosfato) cíclicos, IP_3 , DAG, AA, e Ca^{2+} , mas também no potencial de membrana, que por si só é um potente regulador da função celular.

As catecolaminas podem aumentar a frequência cardíaca e a força de contração através dos adrenoceptores β_1 e β_2 (MINNEMAN & MOLINOFF, 1980, BRYAN *et al.*, 1981). A frequência de batimentos sinoatriais é intensificada pela noradrenalina através dos adrenoceptores β_1 e pela adrenalina através dos adrenoceptores β_1 e β_2 (LANDS *et al.*, 1967, CARLSSON *et al.*, 1972).

3- SENSIBILIDADE ÀS CATECOLAMINAS

A sensibilidade dos tecidos às catecolaminas é afetada por diferentes mecanismos. Estes incluem mudanças na atividade dos processos de transporte e metabolização das catecolaminas levando ao término de suas ações na junção efetora, alterações na afinidade e/ou no número dos adrenoceptores β , mudanças no sistema de acoplamento entre o receptor e a proteína G, e mudanças em outras enzimas que

medeiam etapas celulares após o receptor (CALLIA & DE MORAES, 1984, JUBERG *et al.*, 1985, BASSANI & DE MORAES, 1987, 1988, BRODDE, 1987, SPADARI & DE MORAES, 1988, RODRIGUES *et al.*, 1995, MARCONDES *et al.*, no prelo, VANDERLEI *et al.*, no prelo).

3.1- SISTEMAS DE RECAPTAÇÃO E METABOLIZAÇÃO DAS CATECOLAMINAS

As ações biológicas da noradrenalina e da adrenalina são limitadas pela sua remoção do fluido extracelular o que impede a interação com os adrenoceptores. O transporte ativo por carreadores e subsequente acúmulo das catecolaminas pelos neurônios simpáticos é a primeira etapa na finalização de suas ações, especialmente em tecidos densamente inervados (TRENDELENBURG, 1978; 1980; 1984; 1990; 1991). Duas enzimas desempenham importante papel na captação e metabolização dessas aminas, após serem recapturadas por transporte ativo do meio extracelular: monoamino oxidase (MAO) e catechol-O-metiltransferase (COMT) (AXELROD, 1966, KOPIN, 1972).

Esses sistemas de recaptção e metabolização de catecolaminas foram divididos fundamentalmente em dois distintos sistemas: sistema de recaptção neuronal, denominado *uptake*₁ e sistema de metabolização extraneuronal, *uptake*₂. Ambos foram identificados e bem descritos em termos de suas localizações e propriedades bioquímicas (IVERSEN 1965, BURGEN & IVERSEN, 1965, CALLINGHAM & BURGEN, 1966).

O sistema de recaptção neuronal representa a primeira e mais importante etapa no controle das ações do neurotransmissor, noradrenalina, quando liberado. Este sistema remove a noradrenalina da biofase sináptica e transporta a amina para dentro do axoplasma onde esta é então, desaminada pela MAO mitocondrial ou tomada

novamente pelas vesículas de estocagem para ser reutilizada (IVERSEN, 1965, 1975, LEFKOWITZ *et al.*, 1990, TRENDELENBURG 1990, 1991). O sistema de transporte através da membrana axoplasmática é um processo dependente de sódio e pode ser bloqueado seletivamente por cocaína e antidepressivos tricíclicos, como imipramina (LESTER *et al.*, 1994). Este sistema de transporte tem maior afinidade pela noradrenalina do que pela adrenalina. O agonista β adrenérgico sintético isoproterenol não é substrato para esse sistema (HOFFMAN & LEFKOWITZ, 1996).

O sistema de recaptção extraneuronal também chamado de sistema não neuronal de transporte de catecolaminas, está associado ao metabolismo dessas aminas pela ação da enzima COMT. Apresenta baixa afinidade pela a noradrenalina, maior afinidade pela adrenalina, e grande afinidade pelo isoproterenol (SALT, 1972, HERTING & SUKO, 1972, BONISH & TRENDELENBURG, 1974, IVERSEN, 1975, TRENDELENBURG, 1980, 1990, 1991). A recaptção extraneuronal é seletivamente bloqueada pela corticosterona e 17- β -hidroxi-estradiol e metabólitos das catecolaminas como a metanefrina e a normetanefrina.

3.2- AFINIDADE DE AGONISTAS

Alterações na afinidade de um agonista pelo seu receptor podem ser observadas quando: 1- um tecido cuja população de receptores era homogênea passa a apresentar após um tratamento experimental, uma população heterogênea de receptores; 2- mudanças na informação pós transcricional para a síntese do receptor resultam em alterações em sua configuração química; 3- ocorrem alterações na proteína transdutora ; 4- a composição lipídica da membrana, onde o receptor está inserido, é alterada de modo a produzir alterações da afinidade tanto para agonistas

quanto para antagonistas, uma vez que a sua posição espacial na membrana influencia sua propriedade ligante (KENAKIN, 1993).

3.3- DESSENSIBILIZAÇÃO DO RECEPTOR

O termo dessensibilização é definido como um estado de responsividade reduzida de uma célula ao agonista, e geralmente ocorre após exposição da célula ao próprio agonista, ou a outros hormônios (STILES *et al.*, 1984, SIBLEY & LEFKOWITZ, 1985). A dessensibilização pode ser causada por processos distintos mas interrelacionados: desacoplamento entre a proteína G e o receptor, sequestro, ou *down-regulation* (HARDEN, 1983, SIBLEY & LEFKOWITZ, 1985, SCHWINN *et al.*, 1992).

3.3.1- DESACOPLAMENTO. O desacoplamento entre a proteína G e o receptor ocorre dentro de segundos a minutos após a exposição da célula a agonistas e resulta do processo de fosforilação do receptor em sua porção intracelular. Este processo tem sido bem caracterizado no fotoreceptor, rodopsina, onde a luz estimula a rodopsina quinase, que catalisa a fosforilação dos resíduos de serina e treonina na porção C terminal da rodopsina, o que aumenta sua afinidade por uma proteína denominada arrestina. Esta proteína, por sua vez impede a ligação da rodopsina com a transducina.

Diferentes proteínas quinases, como a proteína quinase A (PKA), proteína quinase C (PKC) e proteína quinase do adrenoceptor β (β ARK) parecem desempenhar importante papel na regulação e na dessensibilização dos adrenoceptores β (BENOVIC *et al.*, 1986, 1988). Assim, quando a adenilil ciclase é estimulada pelos hormônios ou agonistas, os níveis celulares de AMP cíclico aumentam, proteínas quinases dependentes de AMPc são ativadas e o receptor pode ser fosforilado e dessensibilizado.

Diversas abordagens metodológicas foram usadas para detectar os sítios de atuação da β ARK. Estes estudos sugerem que os resíduos de serina e treonina localizados ou na cadeia C-terminal ou na terceira alça citoplasmática do receptor seriam os possíveis sítios de fosforilação pela β ARK. A terceira alça intracelular do receptor β parece ser requerida para o acoplamento do receptor com sua proteína Gs (SCHWINN *et al.*, 1992).

Existem muitas analogias entre o complexo rodopsina-transducina e os adrenoceptores β - proteína Gs. Primeiro, no processo de adaptação à luz, a rodopsina quinase fosforila a rodopsina de maneira análoga à fosforilação catalisada pela β ARK do adrenoceptor ocupado pelo agonista. Segundo, proteínas análogas à arrestina, denominadas β -arrestinas participam do processo de dessensibilização feito pela β ARK. β -arrestina foi clonada e está presente em muitos tecidos, mais proeminentemente no cérebro, coração e pulmões (LOHSE *et al.*, 1990).

UNGERER *et al.* (1994) demonstraram em coração humano com insuficiência cardíaca uma boa correlação entre a diminuição da responsividade a β agonistas e concentração elevada de β ARK-1, sem qualquer mudança nos níveis de β ARK-2, β -arrestina-1, ou β -arrestina-2.

3.3.2- SEQUESTRO: Sequestro é um processo que envolve a mobilização do receptor da superfície celular para um compartimento intracelular ainda não identificado, e inacessível aos agonistas extracelulares hidrofílicos. Como a dessensibilização por desacoplamento, o sequestro também ocorre dentro de minutos após exposição a um agonista (SIBLEY *et al.*, 1986). Embora pareça ocorrer num período mais tardio do que o desacoplamento, os mecanismos envolvidos no

sequestro não são conhecidos. Alguns estudos sugerem que a fosforilação e o sequestro são processos inteiramente distintos e independentes (WALDO *et al.*, 1983).

3.3.3- DOWN-REGULATION. A diminuição do número ou densidade de receptores, parece ocorrer numa escala de tempo muito maior, em horas, do que o desacoplamento e sequestro. Pode ser causada ou por aumento na degradação ou por diminuição na taxa de síntese dos receptores (SCHWINN *et al.*, 1992).

Em algumas situações os adrenoceptores β são proteoliticamente degradados de modo que a sua regeneração depende de nova síntese, enquanto que em outras, eles permanecem indetectáveis por um período de tempo e então retornam aos níveis normais, sugerindo que receptores *down-regulados* podem readquirir sua capacidade de ligação após algum tempo (DOSS *et al.*, 1981). Recentemente, os mecanismos envolvidos no processo de *down-regulation* dos adrenoceptores β_2 foram elucidados e parece que uma via desse mecanismo seria a diminuição do nível de RNAm desses adrenoceptores e outra seria a sua fosforilação pela PKA (BOUVIER *et al.*, 1989).

3.4- UP-REGULATION DO RECEPTOR

Up-regulation, definida como aumento no número dos receptores ativos, pode ocorrer como resultado de um bloqueio crônico por antagonistas (HEDBERG *et al.*, 1986) ou como consequência da atuação hormonal no sistema efetor do receptor. A influência de hormônios permissivos, tais como glicocorticóides sobre os adrenoceptores β está bem estabelecida (STILES *et al.*, 1984). Os glicocorticóides atuam à nível da expressão gênica modulando a síntese do receptor. Eles parecem aumentar o número dos receptores por um aumento no nível do seu RNAm (COLLINS *et al.*, 1988). O tratamento prolongado de humanos e de animais, com antagonistas de

adrenoceptores β também pode desencadear aumento no número de adrenoceptores β funcionais, detectável após a interrupção abrupta do tratamento (BRODDE *et al.*, 1989).

Tanto *up-* como *down-regulation* dos adrenoceptores β cardíacos podem ocorrer em diferentes estados fisiológicos ou patológicos. Exemplos incluem, mudanças associadas à ontogênese, isquemia, doenças, agentes estressores e manipulações farmacológicas (CHEN *et al.*, 1979, FELDMAN, 1987, SPADARI & De MORAES, 1988, BASSANI & DE MORAES, 1988, HALL *et al.*, 1990, , BARKER *et al.*, 1990, BRODDE, 1991, LIANG *et al.*, 1991, BOHM *et al.*, 1994, CHESS-WILLIAMS *et al.*, 1994, VANDERLEI *et al.*, no prelo).

A responsividade do tecido cardíaco à estimulação β -adrenérgica pode ser regulada pela duração e intensidade da estimulação do receptor (KENAKIN & BEEK, 1982, KENAKIN & FERRIS, 1983). Estimulação crônica dos adrenoceptores β cardíacos resulta em desacoplamento do receptor da adenilil ciclase e/ou redução na densidade desses receptores (FELDMAN, 1987, STRASSER *et al.*, 1988, FELDMAN & BRISTOW, 1990, BUTTERFIELD & CHESS-WILLIAMS, 1991, KENAKIN, 1993, CHESS-WILLIAMS *et al.*, 1994).

4- REFLEXO BAROCEPTOR

Os baroceptores são os mediadores primários do sistema nervoso autônomo no controle da pressão arterial e da frequência cardíaca. Os baroceptores são terminações nervosas que respondem à deformação ou estiramento das paredes dos vasos onde estão localizadas (BROWN, 1980, FERRARIO & TAKISHITA, 1983).

Os seios carotídeos e a crossa da aorta são os locais de maior concentração dessas aferências e com maior expressão fisiológica. Os seios carotídeos são uma dilatação das artérias carótidas internas. A parede arterial dessa região é mais fina e possui maior quantidade de tecido elástico do que tecido muscular liso comparada a outras porções da parede arterial. A inervação sensorial desta área é provida pelos ramos do nervo glossofaríngeo, enquanto que a inervação dos barorreceptores aórticos é feita pelo nervo aórtico (MILNOR, 1970). As aferências dos barorreceptores terminam no núcleo do trato solitário (NTS), onde são normalmente efetuadas as respostas de inibição da descarga simpática e intensificação da resposta vagal. A estimulação dos barorreceptores aórticos e carotídeos, por aumento da pressão arterial, desencadeia reflexamente uma inibição da descarga simpática enquanto que uma queda da pressão arterial produz efeito oposto (GUYTON, 1993).

Os barorreceptores possuem importante função homeostática, pois constituem a primeira etapa dentro do sistema nervoso no controle da pressão arterial, uma vez que eles respondem às variações transitórias de pressão arterial de maneira rápida e eficiente. Os sistemas renal, humoral e tecidual que também participam no controle da pressão arterial, são mais lentos em responder efetivamente a esses estímulos (BROWN, 1980, ABOUD, 1982).

O papel dos barorreceptores na regulação da pressão arterial é demonstrado pela desnervação sino-aórtica (DSA). A descoberta por HERING, em 1927, que a desnervação sino-aórtica causava um aumento abrupto na pressão arterial e subsequente demonstração por KOCH & MIES, em 1929, que a desnervação destas áreas causava hipertensão crônica, despertou o interesse de investigadores em estudar a disfunção dos barorreceptores como possível modelo experimental de hipertensão.

Resecção dos barorreceptores aórticos e carotídeos interrompe a aferência neuronal desses receptores sensoriais no sistema nervoso central. Esta liberação do sistema nervoso simpático de uma fonte primária de inibição, imediatamente produz hipertensão e taquicardia. A hipertensão pode persistir por alguns meses (ALEXANDER *et al.*, 1980, KRIEGER *et al.*, 1980, VASQUEZ & KRIEGER, 1980) ou até um ano (KRIEGER, 1964). Em geral, a hipertensão apresenta labilidade, de modo que, registros tomados por longos períodos mostram que o animal apresenta oscilações dos valores da pressão arterial, dependentes da atividade física do animal no momento da medida. Diferente da pressão arterial, a taquicardia causada pela DSA é transitória e dura em média duas semanas (BRODY *et al.*, 1983, VASSALO *et al.*, 1985, TRAPANI *et al.*, 1986, ALPER *et al.*, 1987a,b., MACHADO, 1990, MACHADO *et al.*, 1992, MAUAD *et al.*, 1992).

5- EFEITO DA DESNERVAÇÃO SINO-AÓRTICA (DSA) NA RESPOSTA ÀS CATECOLAMINAS

Poucos estudos analisaram os efeitos da DSA sobre os adrenoceptores β . Em ratos anestesiados com hidrato de cloral (VASQUEZ & KRIEGER, 1982), e em coração isolado de ratos (CABRAL & VASQUEZ, 1984) ocorreu diminuição da resposta cronotrópica ao isoproterenol, cinco horas após DSA, período em que a taquicardia é máxima, e quatorze dias após a DSA, tempo em que a frequência cardíaca já retornou aos valores normais. Os resultados desses estudos sugerem que a DSA, assim como outros modelos experimentais de hipertensão, produzem dessensibilização e/ou *down-regulation* dos adrenoceptores β .

VASSALO *et al.* (1991) descreveram a evolução temporal das alterações de sensibilidade induzidas pela DSA na resposta inotrópica de músculo papilar em resposta a altas concentrações de isoproterenol, próximas da resposta máxima. A resposta inotrópica ao ISO foi avaliada nos tecidos obtidos de três até trinta dias após DSA. Três dias após DSA, o músculo papilar mostrou aumento da resposta contrátil ao ISO, enquanto que nenhuma alteração foi observada uma ou duas semanas após DSA. Trinta dias após DSA houve redução na resposta ao ISO. VASSALO *et al.* (1991) propuseram que o aumento da resposta inotrópica ao ISO poderia ser devido à *up-regulation* dos adrenoceptores β_1 e/ou ao aparecimento de adrenoceptores β_2 funcionais nessa preparação e que a diminuição da resposta ao ISO observada trinta dias após DSA seria devida à *down-regulation* dos adrenoceptores β_1 .

Os resultados dos estudos *in vivo*, ou em preparações de coração isolado e de músculos papilares mostraram que a desnervação sino-aórtica induz mudanças na sensibilidade de tecidos cardíacos a agonistas β -adrenérgicos. No entanto, estes estudos não incluíram uma avaliação completa dos mecanismos envolvidos nas alterações de sensibilidade aos agonistas β -adrenérgicos. Em particular, não foram consideradas possíveis mudanças induzidas pela DSA sobre os processos de recaptação neuronal e extra-neuronal das catecolaminas; as preparações empregadas não permitiram um equilíbrio adequado entre o agonista e o receptor; a população dos receptores envolvidos na resposta não foi caracterizada; e a densidade dos adrenoceptores não foi avaliada.

O objetivo deste trabalho foi analisar se após a DSA ocorrem alterações na sensibilidade da resposta cronotrópica do marca-passo cardíaco a agonistas β

adrenérgicos. Analisamos também, alguns dos mecanismos envolvidos com as alterações de sensibilidade, quando detectadas.

OBJETIVO

O presente estudo foi realizado com o propósito de determinar os mecanismos envolvidos com as alterações de sensibilidade a agonistas β -adrenérgicos em átrios direitos isolados de ratos submetidos à desnervação sino-aórtica (DSA).

Experimentos funcionais e experimentos com radioligante usando tecido atrial foram conduzidos para determinar os efeitos da DSA sobre:

1. a evolução temporal da sensibilidade da resposta β -adrenérgica atrial às catecolaminas após a DSA;
2. a atividade dos sistemas de recaptção neuronal e extra-neuronal;
3. a sensibilidade aos agonistas plenos, isoproterenol e noradrenalina e ao agonista parcial, prenalterol;
4. a população funcional de adrenoceptores β -adrenérgicos que medeiam a resposta cronotrópica às catecolaminas;
5. a afinidade de agonistas e antagonistas, e
6. a densidade dos sítios ligantes dos adrenoceptores β .

MATERIAL E MÉTODOS

1- PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Ratos Wistar pesando entre 300 a 400 g foram usados em todos os experimentos. Os ratos foram alojados, pelo menos uma semana, no biotério de manutenção, em gaiolas coletivas, sob condições controladas de luminosidade (12/12 horas) e temperatura (22° C). Água e ração foram fornecidas *ad libitum*. Os animais foram divididos em três grupos experimentais: animais DSA, animais submetidos à falsa cirurgia, denominados sham, e animais controles (naive), que não sofreram qualquer manipulação cirúrgica.

Em todos os procedimentos cirúrgicos usou-se técnica asséptica e anestesia por ketamina, 50 mg/kg, i.m., e xilazina, 5 mg/kg, i.m. DSA bilateral foi realizada de acordo com KRIEGER (1964), incorporando modificações descritas por VASQUEZ & KRIEGER (1982). Após indução da anestesia, uma incisão na região mediana do pescoço foi feita para expor a artéria carótida primitiva. As fibras nervosas dos barorreceptores da aorta foram dissecadas e seccionadas. Os ramos internos e externos das carótidas foram expostos, o nervo vago, pequenos vasos e tecidos conectivos presentes foram gentilmente afastados, de modo que o nervo laringeal superior fosse ressecado e o gânglio simpático presente sobre a bifurcação removido. A falsa ou sham cirurgia consistiu dos mesmos procedimentos iniciais empregados para DSA, mas sem a desnervação.

Após DSA ou sham cirurgia, cânulas contendo salina estéril foram colocadas nas veia e artéria femorais esquerdas para subsequente administração de drogas e registro da pressão arterial e frequência cardíaca. As veias e artérias foram canuladas usando tubos esterilizados PE-50 e PE-10, respectivamente. As cânulas foram exteriorizadas na região escapular. Após a cirurgia, todos os animais foram tratados com penicilina benzatina, 100.000 unidades, i.m., para minimizar as infecções.

Vinte e quatro horas após a cirurgia, o sucesso da DSA foi avaliado pela administração de nitroprussiato de sódio, 4 µg/kg, i.v., em ratos acordados. DSA foi considerada adequada nos animais que apresentaram queda na pressão arterial diastólica em resposta ao nitroprussiato, de cerca de 30-50 mmHg, sem concomitante aumento da frequência cardíaca. Nos animais sham, a cirurgia foi considerada adequada quando os animais apresentaram taquicardia reflexa após queda da pressão arterial. Somente animais dentro desses critérios foram incluídos no presente estudo. A pressão arterial foi registrada da artéria femoral conectando-se o cateter a um transdutor de pressão Statham P23 1D (Grass Instruments, Quincy, MA) e a frequência cardíaca foi medida com um tacógrafo Grass EKG e registrada num polígrafo Grass modelo 7D.

2- EXPERIMENTOS FUNCIONAIS USANDO ÁTRIO DIREITO ISOLADO

Uma modificação dos métodos descritos por SPADARI *et al.* (1988) e BARKER *et al.* (1990) foi usada. Um, três, sete, quinze e trinta dias após a cirurgia, os animais foram anestesiados com halotano e sacrificados por secção dos vasos cervicais. Os corações foram rapidamente removidos e colocados em Krebs-Henseleit previamente

oxigenado. Os átrios direitos foram isolados e montados em câmaras de incubação de tecido (10 ml volume) contendo Krebs-Henseleit, pH 7,3 a 7,5, 34°C e aerado com 95% O₂-5% CO₂. A composição da solução de Krebs-Henseleit foi (milimolar): NaCl, 124; KCl, 4,75; MgSO₄, 1,30; CaCl₂, 2,25; NaHCO₃, 25,0; NaH₂PO₄, 0,6; glicose, 10,0; ascorbato, 0,3; EDTA, 0,03; e 17β-hidroxiestradiol, 0,005. Ascorbato e EDTA foram adicionados para evitar a oxidação das catecolaminas (HUGHES & SMITH, 1978). 17β-hidroxiestradiol foi adicionado para bloquear o sistema de recaptção e metabolização extra-neuronal das catecolaminas (SALT, 1972). O sistema de recaptção neuronal das catecolaminas foi inibido pelo tratamento com 10 μM de fenoxibenzamina (PBZ) por trinta minutos (O'DONNELL & WANSTALL, 1985). Após o tratamento com PBZ, a solução de incubação foi trocada a cada quinze minutos durante uma hora, para remover o excesso de PBZ presente no banho e permitir que a frequência de batimentos atriais retornasse aos seus valores basais. Nos estudos envolvendo a evolução temporal da sensibilidade β-adrenérgica, curvas concentração-efeito foram geradas no mesmo tecido, antes e após a inibição dos sistemas de recaptção neuronal e extraneuronal. Nos estudos subsequentes, somente tecidos obtidos de animais sete dias após a cirurgia foram usados e todas as curvas concentração-efeito foram geradas na presença de bloqueadores dos dois sistemas de recaptção das catecolaminas.

3- OBTENÇÃO E ANÁLISE DAS CURVAS CONCENTRAÇÃO-EFEITO

Curvas concentração-efeito para o efeito cronotrópico aos agonistas ISO, NA e PREN foram obtidas através do aumento cumulativo das concentrações do agonista em

meia unidade logarítmica entre doses sucessivas (VAN ROSSUM, 1963). Nos experimentos onde PREN foi usado, curvas concentração-efeito para ambos, PREN e ISO foram geradas no mesmo tecido obtido de animais sete dias após a cirurgia. Os possíveis efeitos da DSA sobre os subtipos de adrenoceptores que estariam mediando a resposta cronotrópica foram avaliados pela construção de curvas concentração-efeito para ISO e NA na ausência e então na presença de ICI 118,551, um antagonista β_2 seletivo (O'DONELL & WANSTALL, 1980) ou CGP 20 712A, um antagonista β_1 seletivo (DOOLEY *et al.*, 1986).

Todos os dados das curvas concentração-efeito foram avaliados segundo a equação:

$$E = E_{\max} / ((1 + (10^c / 10^x)^n) + \Phi) \quad (26)$$

onde E é o aumento da frequência de batimentos atriais em resposta ao agonista (efeito); E_{\max} é a resposta máxima que o agonista pode produzir; c é o logaritmo da EC_{50} , definida como a concentração do agonista que produz metade da resposta máxima; x é o logaritmo das concentrações do agonista; o exponencial, n, é o coeficiente angular ou inclinação, que define o tipo de curva concentração-efeito obtida e Φ é a resposta observada na ausência do agonista. Análise de regressão não linear para determinar os parâmetros: E_{\max} , $\log EC_{50}$ e n foi empregada usando o programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) com o valor basal dos batimentos atriais valendo zero, $\Phi =$ zero. No texto e tabelas, o parâmetro potência, que corresponde ao $-\log EC_{50}$, será expresso como pEC_{50} .

A constante de dissociação, K_d , do agonista parcial, PREN, foi estimada pelo método de BLACK *et al.* (1985). Primeiramente, os dados obtidos para o PREN e ISO foram analisados como descrito na equação 26. As respostas individuais para PREN

foram normalizadas em função da resposta máxima obtida para o ISO em cada tecido. Os dados transformados foram analisados seguindo a expressão:

$$E = E_{\max} \tau^n [10^x]^n / ((10^K + [10^x])^n + \tau^n [10^x]^n) \quad (27)$$

Onde E é a resposta fracional relativa àquela produzida pelo ISO; E_{\max} é a resposta máxima do tecido e fixada no valor da unidade; K é o logaritmo molar da constante de dissociação; τ é a eficácia definida no modelo operacional; e n e x foram definidos na equação 26. O termo τ é definido como a razão, $[R_T]/K_E$, onde $[R_T]$ é a concentração dos receptores funcionais e K_E é a concentração do complexo agonista-receptor que produz metade da resposta máxima. Os valores de n foram calculados de acordo com a equação 26, para cada curva concentração-efeito. Este método para estimativa do valor K_d do agonista somente pode ser aplicado quando a resposta máxima obtida para o agonista é menor do que a resposta máxima que o tecido é capaz de responder, o que indica tratar-se de agonista parcial (LEFF *et al.*, 1990). Duas curvas concentrações-efeito obtidas para o PREN em átrios de animais controle não foram usadas para a análise porque tiveram seus valores de E_{\max} similares àqueles obtidos para o ISO na mesma preparação. As constantes de dissociação que são registradas no texto e nas tabelas são expressas como valores de pK_d .

Em experimentos nos quais antagonistas competitivos foram usados, para caracterizar a população ativa dos adrenoceptores β , as curvas concentração-efeito foram construídas na ausência e na presença do antagonista, com um período de equilíbrio do antagonista de duas horas. Em todos os experimentos, somente uma única concentração de antagonista foi usada para cada átrio. Concentrações do agonista que produziram metade da resposta máxima na ausência, [A], e na presença,

[A'], do antagonista foram estimadas pelo uso da equação de Schild (ARUNLAKSHANA & SCHILD, 1959):

$$\log (CR-1) = n \log [B] - \log K_B \quad (28)$$

onde CR corresponde a $[A']/[A]$; n é o coeficiente angular; [B] é a concentração do antagonista. A constante de dissociação aparente da interação antagonista-receptor, K_B , foi determinada pela aplicação da regressão linear de $\log (CR - 1)$ sobre o $\log [B]$. As constantes de dissociação que são registradas no texto e nas tabelas são expressas como valores de pK_B .

4- EXPERIMENTOS USANDO O RADIOLIGANTE:⁽¹²⁵⁾ IODOCIANOPINDOLOL (¹²⁵ ICYP)

Os átrios direitos foram obtidos como descrito acima. Para cada experimento, três átrios foram usados. As membranas foram preparadas segundo o método de JUBERG *et al.* (1985) modificado. Os átrios direitos foram rapidamente removidos e homogeneizados com um triturador de tecidos, por trinta segundos, em 10 ml de uma solução de fosfato de sódio, na concentração de 20 mM e pH igual a 7.6, contendo 154 mM de cloreto de sódio. O homogeneizado foi centrifugado a 100,000 x g por 1 hr a 4°C para isolar todos os receptores presentes na preparação. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi resuspenso em 1 ml de uma solução de sucrose, na concentração de 0,32 mM, para cada 10 mg de peso original do tecido. Essa suspensão foi estocada a -70°C, até o seu uso.

Alíquotas da suspensão de membranas (100 µl contendo 35 a 70 µg de proteína) foram incubadas em triplicatas a 37°C por 90 minutos com concentrações

crescentes de 125 ICYP (5 a 300 pM) ou uma única concentração de 125 ICYP (100 pM) na presença de várias concentrações de PREN (0,1 a 30 μ M) num volume final de 250 μ l. A solução tampão de incubação continha: HEPES, 50 mM, pH 7,5; $MgCl_2$, 4 mM; ascorbato, 0,3 mM e $EDTA(Na)_2$, 0,03mM . Triplicatas das amostras contendo propranolol (10 μ M) foram usadas para quantificar as ligações não específicas. O processo de incubação foi interrompido pela adição de 10 ml de tampão HEPES, 50 mM a 4°C, seguido por rápida filtração através de filtros de fibra de vidro (GF/B Whatman, Clifton, NJ) e uma lavagem adicional dos filtros com 10 ml de tampão HEPES. Imediatamente após a filtração, a radioatividade foi medida em um contador gama (Beckman Instruments, Modelo 9800). A concentração das proteínas foi determinada pelo método de LOWRY *et al.* (1951) usando albumina bovina como padrão.

O número aparente de sítios ligantes e a afinidade para o 125 ICYP foram determinados pela análise de regressão não linear usando a equação:

$$B = B_{max}/(1+(10^K/10^x)^n) \quad (29)$$

onde B é a quantidade dos sítios ligados, expressos como fmoles/mg de proteína; B_{max} é o número máximo de sítios ligantes presentes na preparação, e expressos como fmoles/mg de proteína; K é o logaritmo da constante de dissociação, K_d , do radioligante; x é o logaritmo da concentração do ligante na forma livre; e n é o coeficiente de Hill para a ligação do radioligante.

Os valores de IC_{50} do PREN foram determinados pela aplicação da equação 1. O valor aparente de K_d do PREN foi calculado a partir da sua IC_{50} obtida da curva de competição para o 125 ICYP usando a expressão (LEFF & DOUGALL, 1993):

$$K_{d(PREN)} = IC_{50}/\{(2 + ([ICYP]/K_{d(ICYP)})^n)^{1/n} - 1\} \quad (30)$$

onde n é o coeficiente angular da curva de inibição do PREN na ligação do 125 ICYP aos sítios receptores.

5- ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa InStat (GraphPad Software) foi usado para as análises estatísticas. Quando necessário, utilizamos análise de variância monofatorial ou bifatorial seguidas pelo teste de Bonferroni. Em alguns casos, teste t de Student para amostras pareadas ou não pareadas foi usado. Valores de $P < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significantes.

6- FÁRMACOS

(-)-Noradrenalina, (-)-isoproterenol, e 17- β -hidroxiestradiol foram fornecidos pela Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Os seguintes compostos foram gentilmente cedidos: prenalterol (Dr. Terry KENAKIN), fenoxibenzamina (Dr. Norman Robie), ICI 118,551 (ICI, Ltd), e CGP 20712A (Ciba Geigy Pharmaceuticals). 125 I-Cianopindolol, 2000 Ci/mMol, foi comprado da Amersham Life Science Inc. (Arlington Heights, IL).

RESULTADOS

1- EVOLUÇÃO TEMPORAL DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA E FREQUÊNCIA CARDÍACA EM RATOS COM CIRURGIA SIMULADA OU DESNERVAÇÃO SINO-AÓRTICA.

A tabela 1 mostra os valores de pressão arterial média (P.A.M.) e frequência cardíaca em ratos 1, 3, 7, 15 e 30 dias após a cirurgia simulada (sham) ou após a DSA.

A DSA determinou um aumento significativo dos valores de P.A.M. em todos os períodos. A frequência cardíaca apresentou-se elevada somente nos dias 1, 3 e 7 ($P < 0,05$). Aos 15 e 30 dias após a DSA, a taquicardia desaparece ($P < 0,05$).

TABELA 1.

Evolução temporal da pressão arterial média e frequência cardíaca em ratos em diferentes períodos após a cirurgia simulada (sham) ou com desnervação sino-aórtica (DSA).

GRUPO	Pressão Arterial Média (mmHg)	Frequência Cardíaca (bat/min)	N
SHAM 1 DIA	115 ± 3	387 ± 13	8
DSA 1 DIA	155 ± 4 ^a	506 ± 13 ^a	5
SHAM 3 DIAS	106 ± 3	390 ± 18	8
DSA 3 DIAS	157 ± 5 ^a	450 ± 12 ^a	5
SHAM 7 DIAS	108 ± 3	380 ± 7	8
DSA 7 DIAS	146 ± 3 ^a	450 ± 12 ^a	7
SHAM 15 DIAS	109 ± 4	370 ± 11	6
DSA 15 DIAS	141 ± 10 ^a	400 ± 5	5
SHAM 30 DIAS	105 ± 3	380 ± 14	6
DSA 30 DIAS	149 ± 9 ^a	400 ± 15	5

Os dados são médias ± E.P.M. N, número de animais.

a, $P < 0,05$, comparação dos valores obtidos em ratos com DSA e seus respectivos controles, pelo teste *t* de Student pareado.

2- EVOLUÇÃO TEMPORAL DA SENSIBILIDADE DA RESPOSTA β -ADRENÉRGICA E A PARTICIPAÇÃO DOS SISTEMAS DE RECAPTAÇÃO DAS CATECOLAMINAS

Os efeitos da DSA e cirurgia simulada sobre os sistemas de recaptção neuronal e extraneuronal às catecolaminas foram avaliados 1, 3, 7, 15 e 30 dias após. Foram obtidas curvas concentração-efeito para o ISO e NA antes e após o bloqueio *in vitro* dos dois sistemas. Os valores de pEC_{50} dos dois agonistas estão sumarizados nas tabelas 2 e 3.

O bloqueio dos sistemas de captação e metabolização da NA produziu um desvio à esquerda das curvas concentração-efeito de cerca de 6 a 9 vezes. Os valores das pEC_{50} à NA antes e após bloqueio dos sistemas neuronal e extraneuronal em átrios direitos obtidos de ratos com cirurgia simulada (sham) ou com DSA, foram estatisticamente diferentes em todos os períodos estudados ($P < 0,05$, teste *t* de Student, para amostras pareadas). No entanto, a magnitude dos desvios não foi diferente entre os grupos e nem entre os diferentes períodos decorridos após as cirurgias.

Quando os sistemas de captação neuronal e extraneuronal estavam ativos, observou-se subsensibilidade à NA em átrios direitos de ratos sacrificados no terceiro dia após a DSA. Nos dias 1, 7, 15 e 30 dias, a sensibilidade à NA em átrios direitos de ratos controles comparados àqueles submetidos à DSA, não foi estatisticamente diferente.

Após o bloqueio dos sistemas de recaptção neuronal e extraneuronal, a sensibilidade à NA estava significativamente reduzida nos dias 3, 7 e 15 após a DSA, em cerca de 3 vezes ao nível da pEC_{50} .

TABELA 2.

Efeito do bloqueio dos sistemas neuronal e extraneuronal na sensibilidade à noradrenalina em átrios direitos de ratos.

GRUPO	pEC ₅₀	pEC ₅₀	DESVIO ^a
	PRÉ	PÓS	
CONTROLE	6,45 ± 0,12	7,54 ± 0,08 ^b	12,9 ± 3,4
SHAM 1 DIA	6,38 ± 0,14	6,99 ± 0,09 ^b	4,6 ± 1,2
DSA 1 DIA	6,69 ± 0,22	7,25 ± 0,14 ^b	4,8 ± 1,7
SHAM 3 DIAS	6,77 ± 0,07	7,28 ± 0,09 ^b	3,7 ± 0,8
DSA 3 DIAS	6,29 ± 0,09 ^c	6,83 ± 0,13 ^d	4,9 ± 1,0
SHAM 7 DIAS	6,56 ± 0,08	7,42 ± 0,08 ^b	6,5 ± 1,7
DSA 7 DIAS	6,17 ± 0,18	6,91 ± 0,18 ^{b,d}	5,5 ± 0,8
SHAM 15 DIAS	7,05 ± 0,10	7,82 ± 0,15 ^b	6,5 ± 1,1
DSA 15 DIAS	6,72 ± 0,20	7,3 ± 0,10 ^{b,d}	5,2 ± 1,6
SHAM 30 DIAS	6,77 ± 0,05	7,43 ± 0,07 ^b	5,3 ± 1,4
DSA 30 DIAS	7,03 ± 0,12	7,50 ± 0,11	4,2 ± 2,0

Os dados são médias ± E.P.M. para 5 a 6 experimentos.

PRÉ - valores de pEC₅₀ obtidos quando os sistemas de recaptação e metabolização das catecolaminas estavam ativos.

PÓS - valores de pEC₅₀ obtidos quando os sistemas de recaptação e metabolização estavam bloqueados.

a, Antilogaritmo da diferença entre os valores da pEC₅₀ pré e pós bloqueio dos sistemas de recaptação.

b, P < 0,05, comparação dos valores da pEC₅₀ pré e após o bloqueio dos sistemas de recaptação, para o teste *t* de Student pareado.

c, P < 0,05, comparação dos valores da pEC₅₀ pré bloqueio entre os grupos controle, sham e DSA em seus respectivos períodos pós cirurgia.

d, P < 0,05, comparação dos valores da pEC₅₀ pós bloqueio entre os grupos controle, sham e DSA em seus respectivos períodos pós cirurgia.

SHAM - animais submetidos à cirurgia simulada.

DSA - animais submetidos à desnervação sino-aórtica.

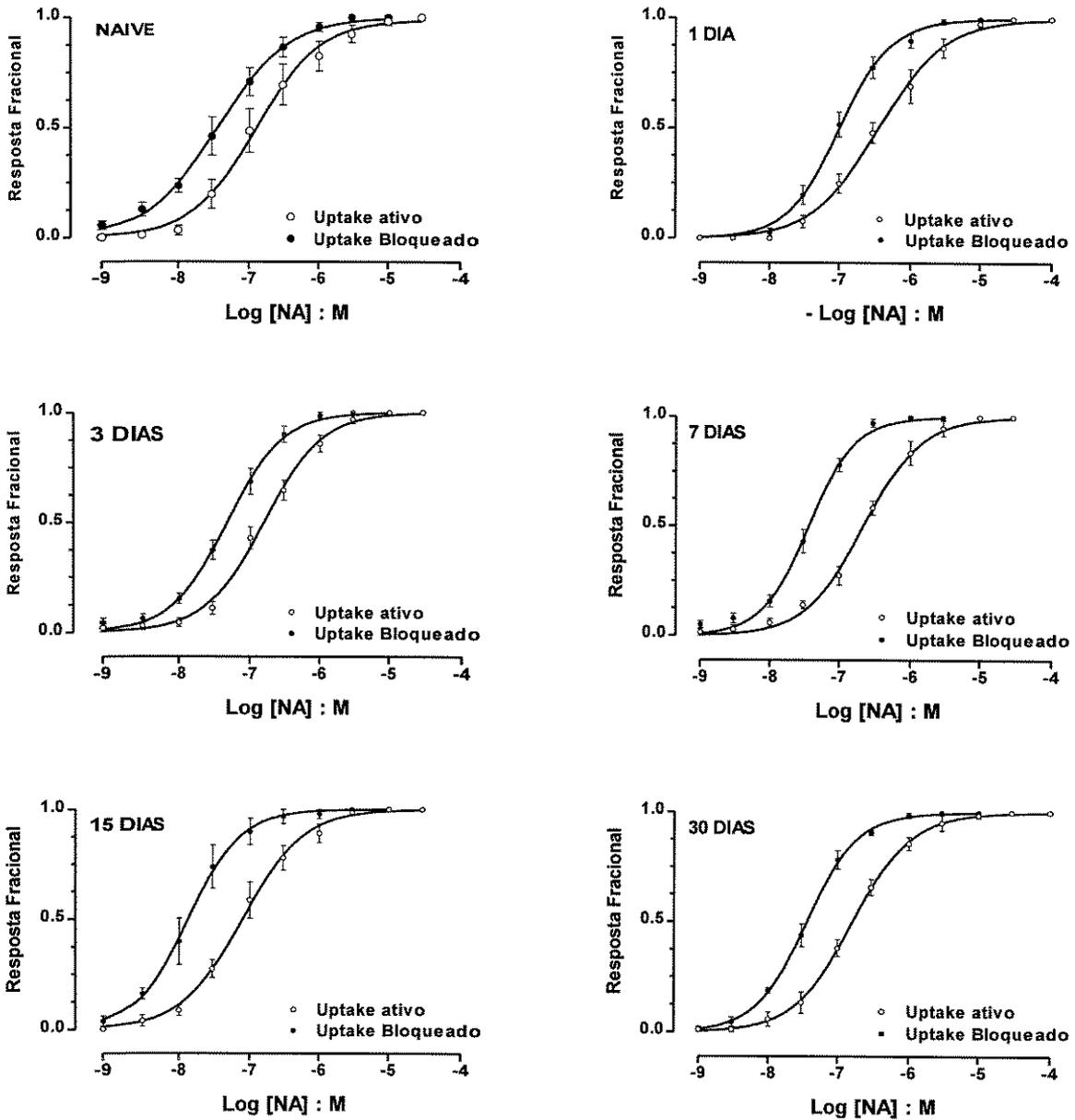


Figura 1. Efeito do bloqueio dos sistemas de recaptação neuronal e extraneuronal, denominados nas figuras de *uptake*, na resposta cronotrópica da noradrenalina (NA) em átrios direitos isolados 1, 3, 7, 15 e 30 dias após cirurgia simulada. Naive = grupo controle.

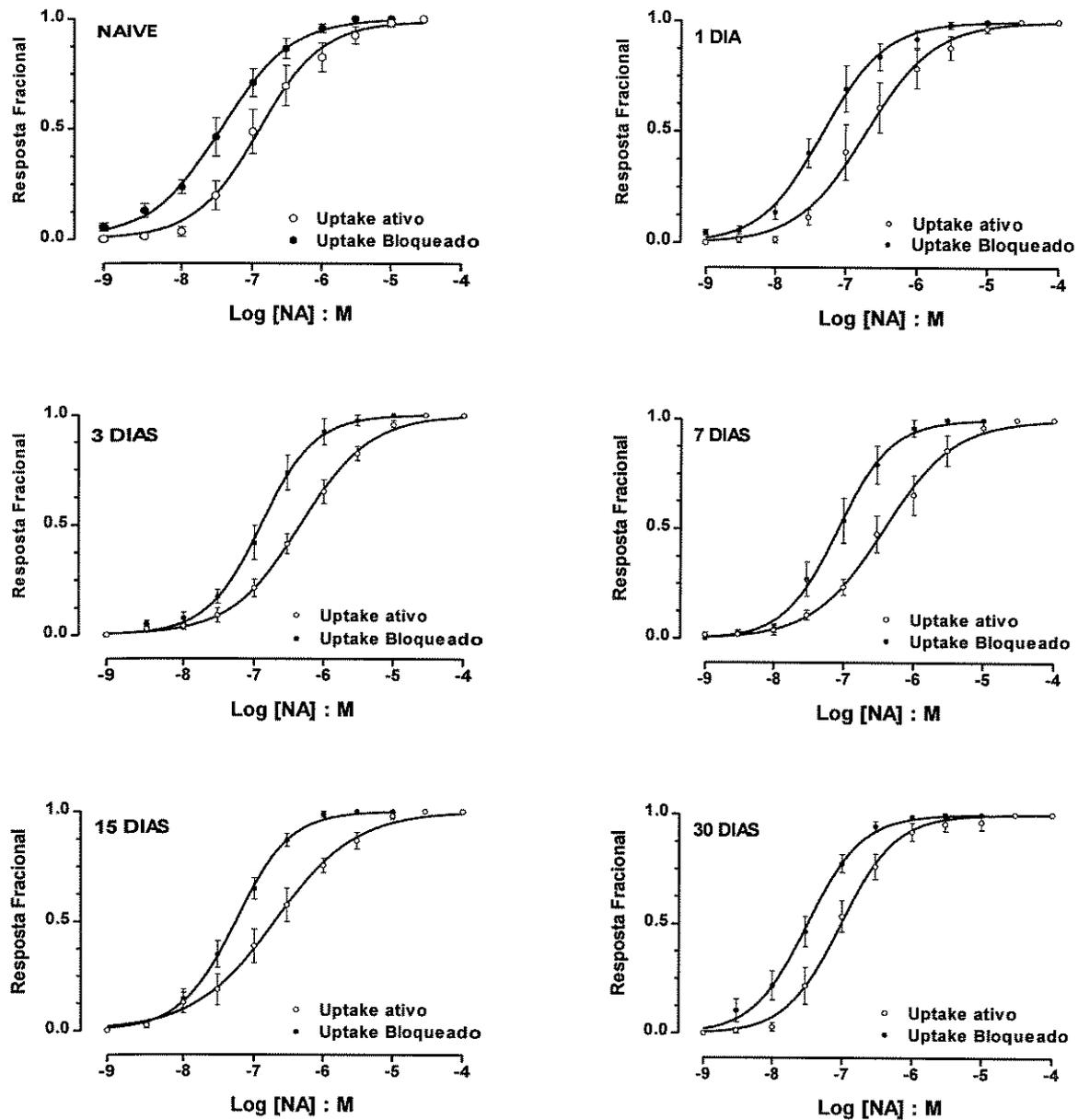


Figura 2. Efeito do bloqueio dos sistemas de recaptção neuronal e extraneuronal, denominados nas figuras de *uptake*, na resposta cronotrópica da noradrenalina (NA) em átrios direitos isolados 1, 3, 7, 15 e 30 dias após desnervação sino-aórtica. Naive = grupo controle.

Estudos similares àqueles efetuados para a NA também foram realizados para o ISO , e estão sumarizados na Tabela 3.

O bloqueio do sistemas de captação neuronal e extraneuronal produziu um desvio, estatisticamente significativo, para a esquerda nas curvas concentração-efeito ao ISO de cerca de duas a três vezes, em átrios direitos de ratos dos grupos controles, e nos grupos submetidos à cirurgia simulada e com DSA aos 7 e 30 dias. Como visto para a NA, a DSA não causou qualquer efeito sobre a magnitude dos desvios.

A DSA determinou um desvio à direita das curvas concentração-efeito ao ISO no primeiro, terceiro e sétimo dias após a DSA, de cerca de 2 a 3 vezes, ao nível da pEC_{50} . Essa subsensibilidade ao ISO em átrios direitos isolados foi observada quando os sistemas de recaptção neuronal e extraneuronal estavam ativos.

Após o bloqueio desses sistemas de recaptção e metabolização, a subsensibilidade ao ISO só foi observada no terceiro e no sétimo dias após a DSA, e a magnitude dos desvios nas curvas concentração-efeito foi similar àquela observada quando esses sistemas estavam ativos.

A frequência inicial dos batimentos cardíacos estava reduzida somente no sétimo dia após a DSA (controle: 270 ± 20 , sham: 256 ± 7 e DSA: 170 ± 9). Não houve alteração da resposta máxima tanto ao ISO como à NA em todos os grupos estudados.

As Figuras 3 e 4 mostram os efeitos do bloqueio do sistemas de recaptção e metabolização nas curvas concentração-efeito ao ISO.

TABELA 3.

Efeito do bloqueio dos sistemas de recaptção neuronal e extraneuronal sobre a sensibilidade ao isoproterenol em átrios direitos de ratos.

GRUPOS	pEC ₅₀ PRÉ	pEC ₅₀ PÓS	DESVIO ^a
CONTROLE	8,53 ± 0,06	8,89 ± 0,08 ^b	2,3 ± 0,5
SHAM 1 DIA	8,59 ± 0,08	8,79 ± 0,15	2,0 ± 0,2
DSA 1 DIA	8,29 ± 0,06 ^c	8,54 ± 0,12	2,2 ± 0,5
SHAM 3 DIAS	8,63 ± 0,09	8,77 ± 0,16	1,5 ± 0,2
DSA 3 DIAS	8,22 ± 0,04 ^c	8,30 ± 0,06 ^d	1,2 ± 0,2
SHAM 7 DIAS	8,54 ± 0,07	8,72 ± 0,10 ^b	1,5 ± 0,1
DSA 7 DIAS	8,19 ± 0,06 ^c	8,36 ± 0,04 ^{b,d}	1,5 ± 0,2
SHAM 15 DIAS	8,55 ± 0,19	8,70 ± 0,09	1,8 ± 0,4
DSA 15 DIAS	8,49 ± 0,09	8,72 ± 0,07 ^b	1,7 ± 0,2
SHAM 30 DIAS	8,60 ± 0,07	8,84 ± 0,07 ^b	1,7 ± 0,1
DSA 30 DIAS	8,60 ± 0,10	8,96 ± 0,12 ^b	2,3 ± 0,3

Os dados são médias ± E. P.M. para 5 a 6 experimentos.

PRÉ- valores de pEC₅₀ obtidos quando os sistemas de recaptção e metabolização das catecolaminas estavam ativos.

PÓS - valores de pEC₅₀ obtidos quando os sistemas de recaptção e metabolização estavam bloqueados.

a, Antilogaritmo da diferença entre os valores da pEC₅₀ pré e após bloqueio dos sistemas de recaptção de catecolaminas.

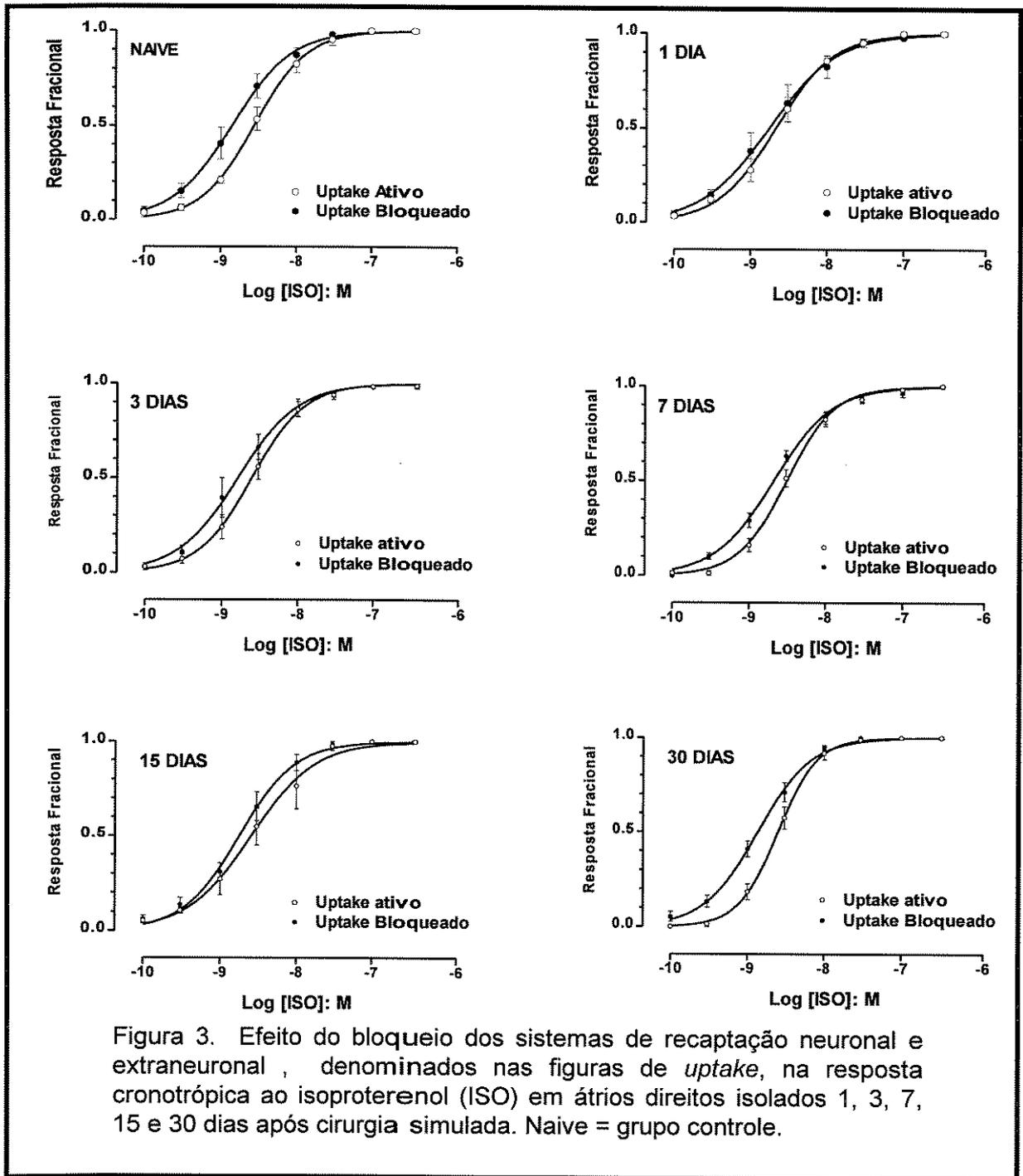
b, P < 0,05, comparação dos valores da pEC₅₀ pré e após o bloqueio dos sistemas de recaptção, para o teste t de Student pareado.

c, P < 0,05, comparação dos valores da pEC₅₀ pré bloqueio entre os grupos controle, sham e DSA em seus respectivos períodos pós cirurgia.

d, P < 0,05, comparação dos valores da pEC₅₀ pós bloqueio entre os grupos controle, sham e DSA em seus respectivos períodos pós cirurgia.

SHAM - animais submetidos à cirurgia simulada.

DSA - animais submetidos à desnervação sino-aórtica.



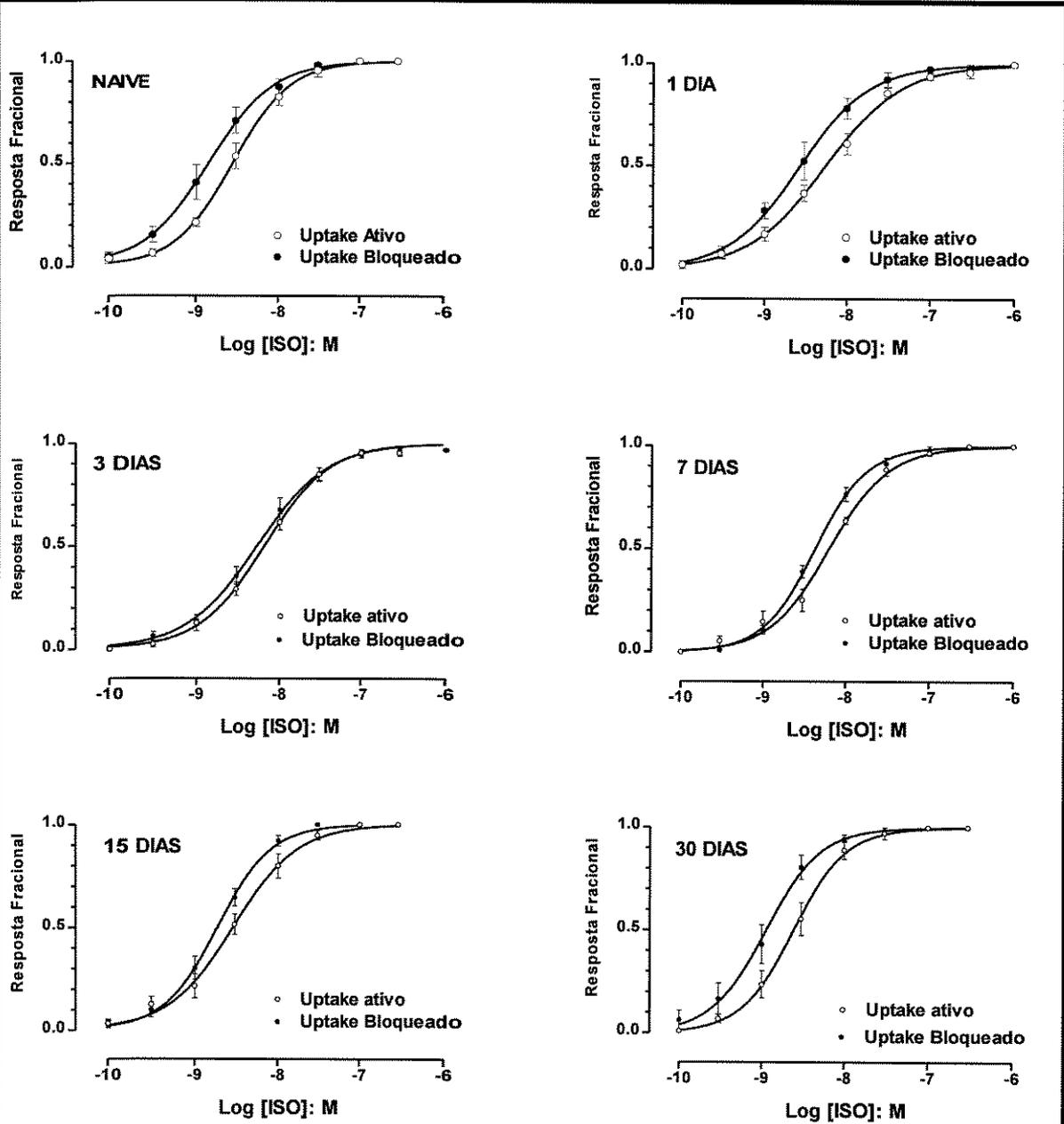
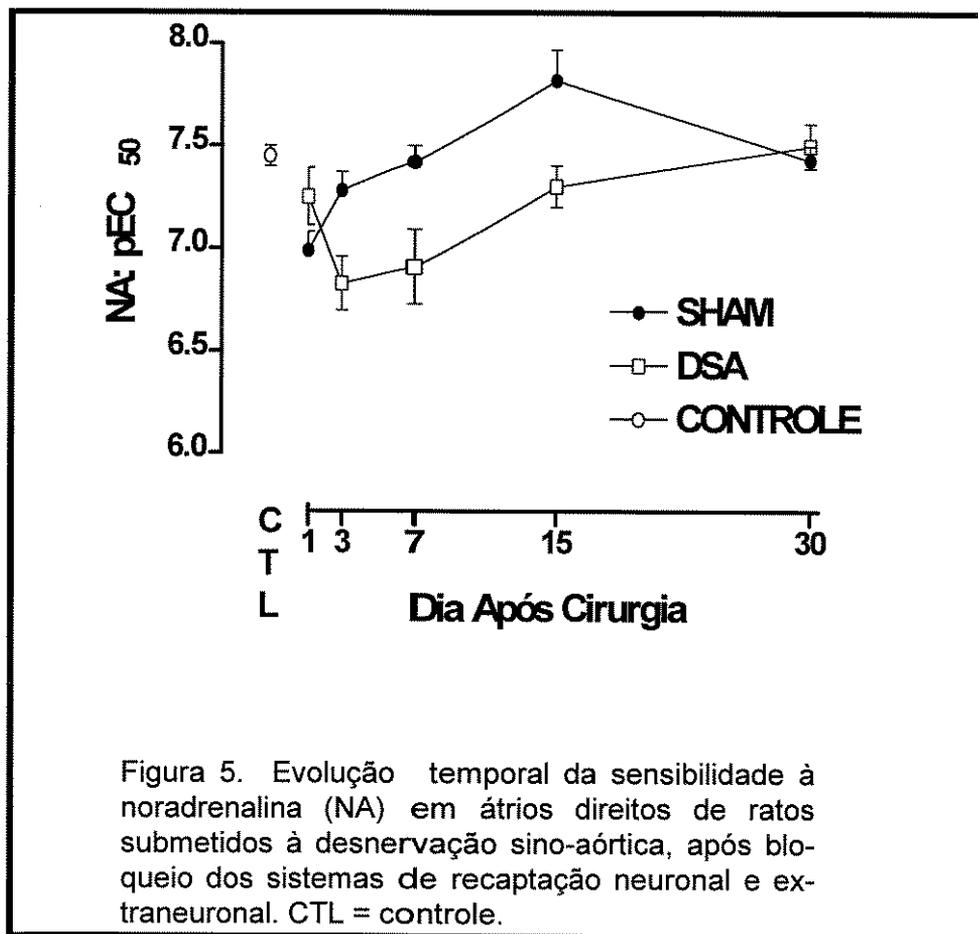
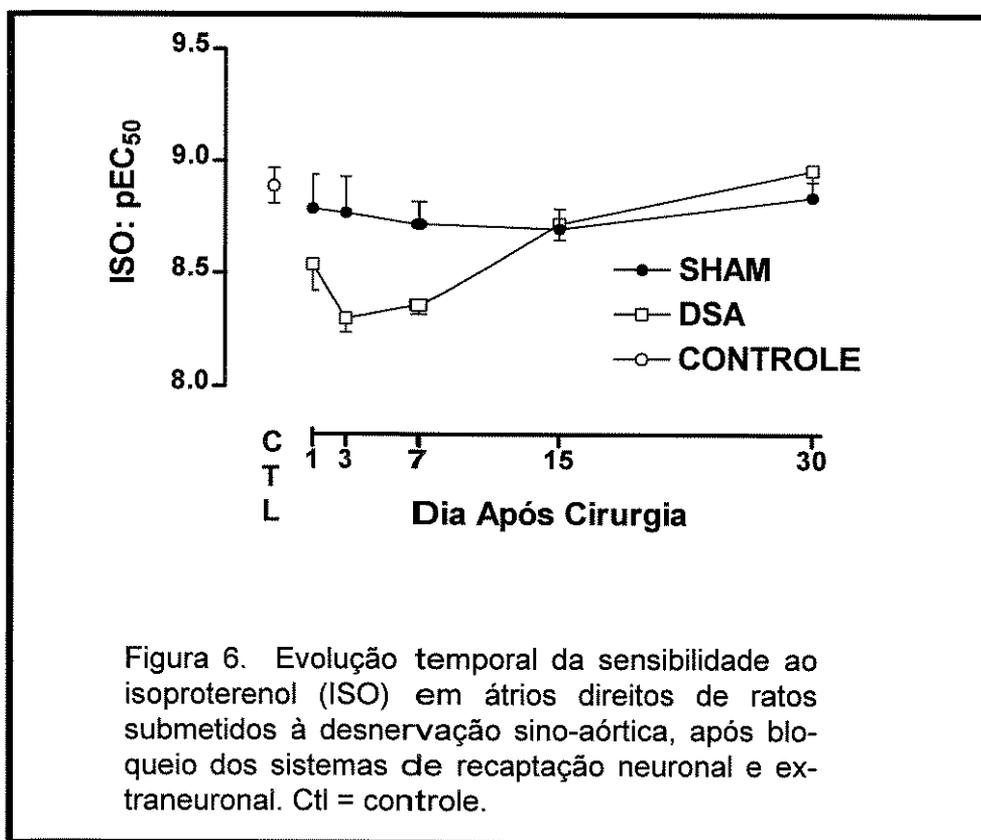


Figura 4. Efeito do bloqueio dos sistemas de recaptção neuronal e extraneuronal, denominados nas figuras de *uptake*, na resposta cronotrópica ao isoproterenol (ISO) em átrios direitos isolados 1, 3, 7, 15 e 30 dias após desnervação sino-aórtica. Naive = controle.

A Figura 5 mostra a evolução temporal da sensibilidade da resposta cronotrópica à NA em átrios direitos isolados obtidos em diferentes períodos após cirurgia simulada ou DSA, sob bloqueio dos sistemas de metabolização de catecolaminas. A sensibilidade à NA foi significativamente reduzida aos 3, 7 e 15 dias após DSA quando comparada com os grupos controle e falso operado ($P < 0,05$, pós teste de Bonferroni).



A Figura 6 mostra os efeitos da DSA na sensibilidade ao ISO sob bloqueio dos sistemas de recaptção neuronal e extraneuronal, em diferentes períodos após cirurgia simulada (sham) ou DSA. Uma significativa redução na sensibilidade ao ISO foi observada nos dias 3 e 7 após DSA ($P < 0,05$, pós teste Bonferroni).



Os efeitos da DSA nas potências do ISO e da NA foram similares, a redução máxima da sensibilidade ocorreu entre os dias 3 e 7 e estava restabelecida ao redor de 15 após

3-EFEITO DA DESNERVAÇÃO SINO-AÓRTICA (DSA) SOBRE A RESPOSTA CRONOTRÓPICA AO ISOPROTERENOL, NORADRENALINA E PRENALTEROL.

Os parâmetros das curvas concentração-efeito para o ISO, NA e PREN em átrios direitos isolados de animais controles e 7 dias após cirurgia simulada e com DSA estão sumarizados na Tabela 4. Não observamos qualquer diferença estatisticamente significativa entre os valores da pEC_{50} de átrios obtidos de animais controles para os diferentes agonistas. No entanto, quando comparamos os dois grupos controles com animais submetidos à DSA, os valores da pEC_{50} para os três agonistas foram significativamente menores em átrios de ratos com DSA ($P < 0,05$). Para o ISO, NA e PREN, a DSA determinou uma redução de cerca de 2,5; 3,0; e 2,6 vezes nos valores da EC_{50} , respectivamente. A DSA não teve qualquer efeito nos valores da E_{max} para os agonistas plenos, ISO e NA, mas causou uma significativa diminuição nos valores absoluto e relativo das E_{max} para o agonista parcial PREN, quando comparados com valores obtidos para ISO.

A DSA não causou qualquer alteração no coeficiente angular das curvas concentração-efeito de nenhum dos três agonistas ($P > 0,05$). As curvas concentração-efeito para o ISO e PREN são mostradas na Figura 7 e aquelas para as ações da NA, na Figura 8.

TABELA 4

Parâmetros obtidos das curvas concentração-efeito para a resposta cronotrópica ao isoproterenol (ISO), à noradrenalina (NA) e ao prenalterol (PREN) em átrios direitos isolados.

Agonista/ Tratamento	pEC ₅₀	E _{max} bats/min	R _{max}	Coefficiente Angular	N
ISO					
Controle	8,66 ± 0,05	153 ± 6		1,08 ± 0,03	28
Sham	8,69 ± 0,06	161 ± 6		1,12 ± 0,06	16
DSA	8,26 ± 0,07 ^a	165 ± 9		1,06 ± 0,05	16
NA					
Controle	7,55 ± 0,07	142 ± 6		1,09 ± 0,03	11
Sham	7,33 ± 0,09	186 ± 20		1,30 ± 0,19	6
DSA	6,89 ± 0,11 ^a	147 ± 16		1,30 ± 0,15	6
PREN					
Controle	7,29 ± 0,06	114 ± 8	0,82 ± 0,03	1,05 ± 0,05	8
Sham	7,05 ± 0,11	110 ± 10	0,71 ± 0,04	1,04 ± 0,07	7
DSA	6,88 ± 0,06 ^b	59 ± 10 ^a	0,33 ± 0,07 ^a	1,13 ± 0,12	6

Os valores apresentados são médias ± E.P.M. para N experimentos. R_{max} é a E_{max} do PREN relativa àquela obtida para o isoproterenol. E_{max} é o efeito máximo. R_{max} é o efeito máximo relativo.

a, Estatisticamente diferente dos grupos controles, P < 0,05.

b, Estatisticamente diferente do grupo controle, P < 0,05, mas não do grupo Sham.

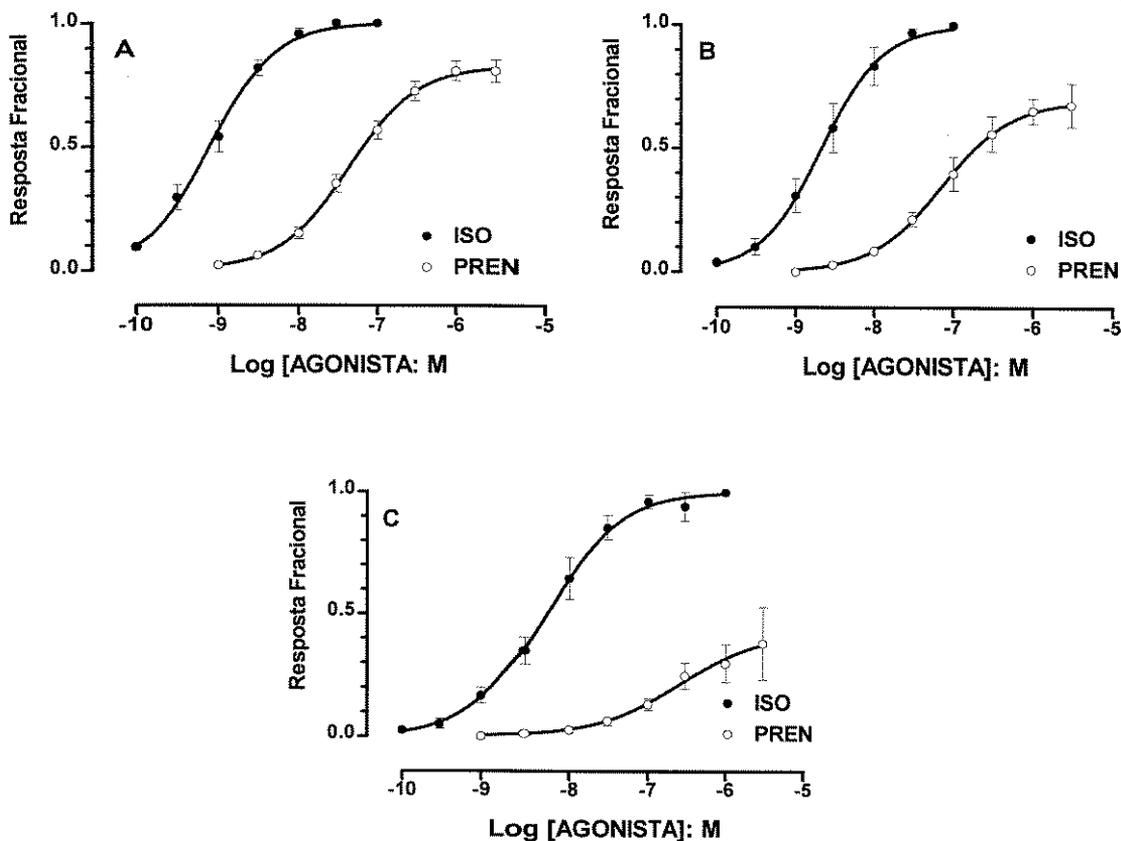


Figura 7. Curvas concentração-efeito para a resposta cronotrópica ao isoproterenol (ISO) e prenalterol (PREN) em átrios direitos isolados de animais controle (A), sham-operados (B) e DSA (C). Os dados são médias \pm E.P.M. para 5 a 6 experimentos.

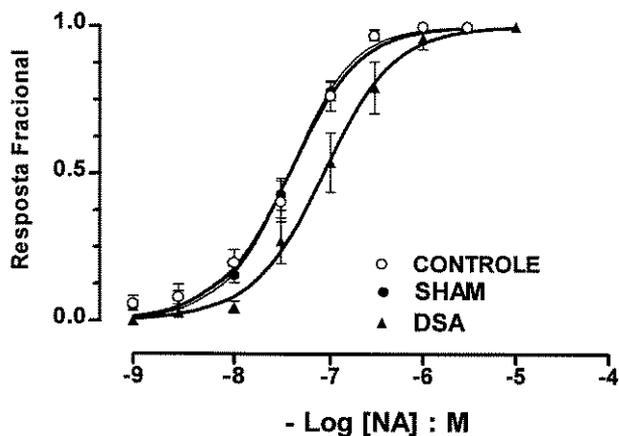
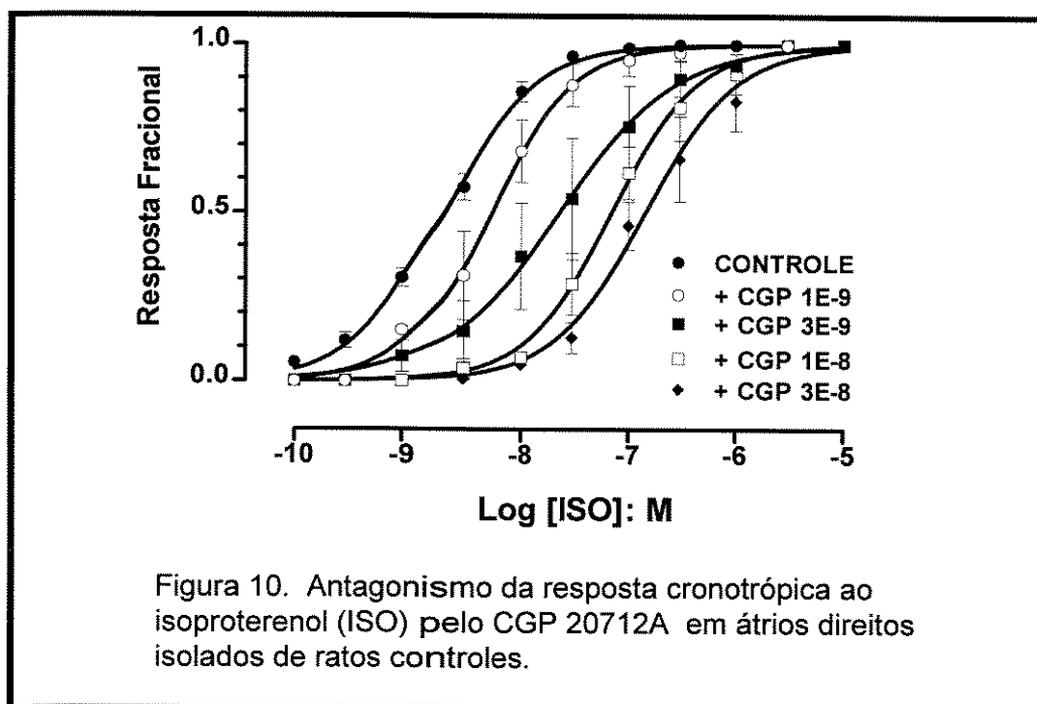


Figura 8. Curvas concentração-efeito à noradrenalina (NA) em átrios direitos isolados de animais controle, sham (cirurgia simulada) e DSA. Os dados são médias \pm E. P.M. para 5 a 6 experimentos.

4- CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DOS ADRENOCEPTORES β QUE MEDEIAM O CRONOTROPISMO.

Ao iniciarmos os experimentos com antagonistas, fizemos primeiramente as determinações dos valores de pK_B para os antagonistas CGP 20712A e ICI 118,551 frente ao ISO e NA em átrios obtidos de animais controles. As curvas concentração-efeito obtidas são mostradas nas Figuras 10 até 13.



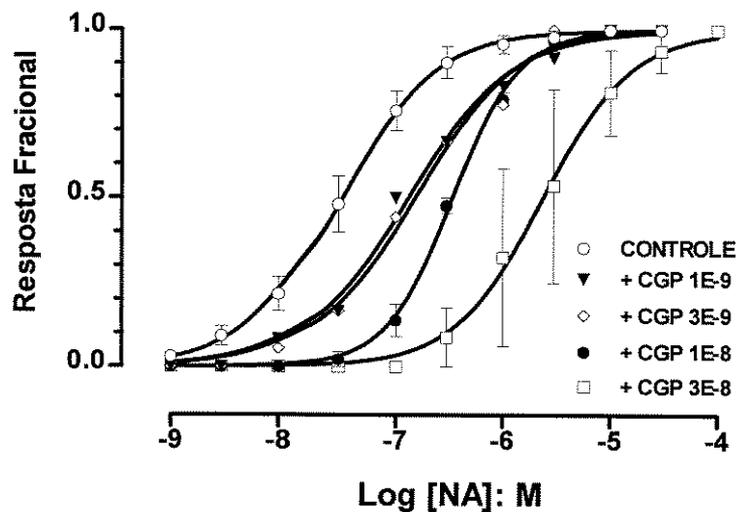


Figura 11. Antagonismo da resposta cronotrópica à noradrenalina (NA) pelo CGP 20712A em átrios direitos isolados de ratos controles.

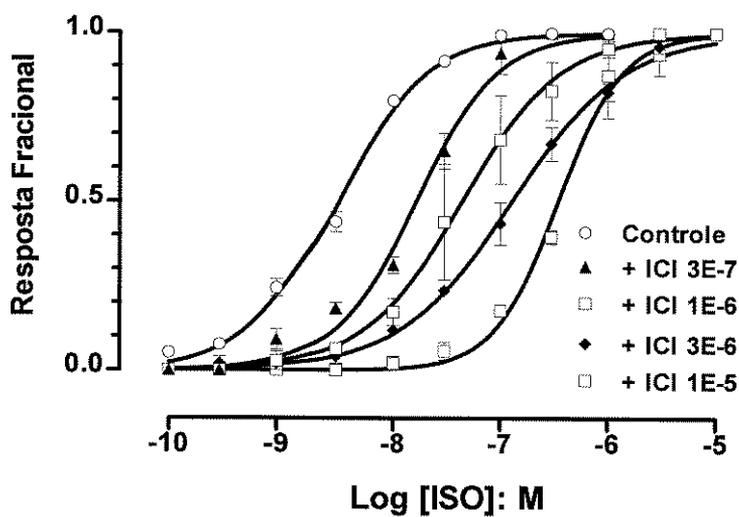
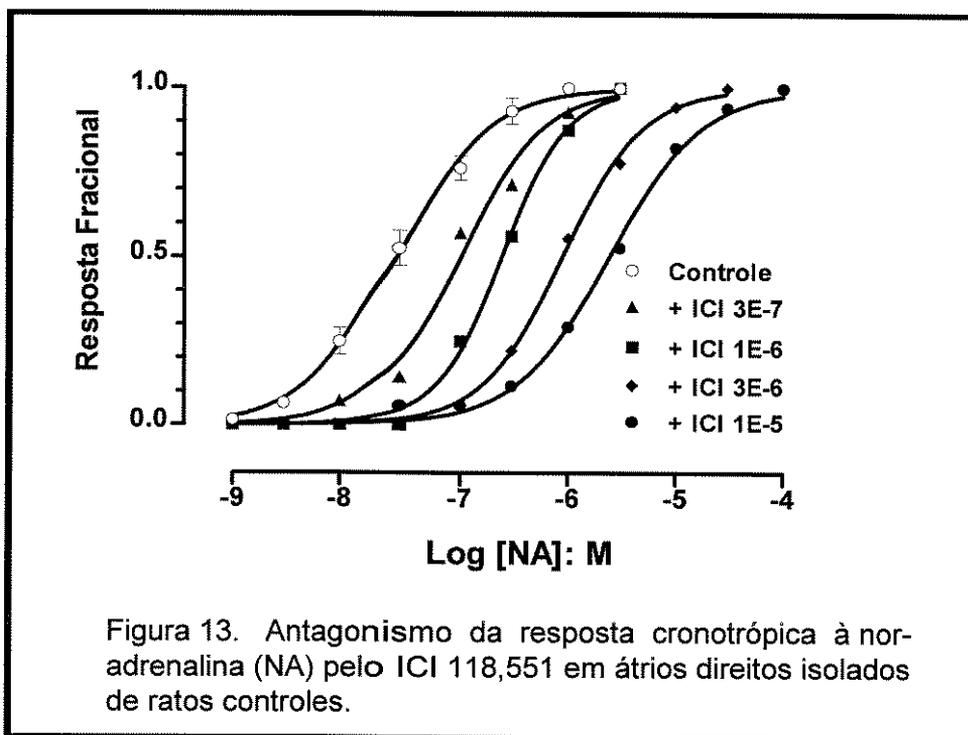


Figura 12. Antagonismo da resposta cronotrópica ao isoproterenol (ISO) pelo ICI 118,551 em átrios direitos isolados de ratos controles.



Os deslocamentos provocados nas curvas concentração-efeito aos agonistas pelas diferentes concentrações dos antagonistas foram paralelos e dose-dependentes, em nenhum dos casos houve diminuição da resposta máxima, o que caracteriza o antagonismo como competitivo.

A partir dos deslocamentos horizontais das curvas concentração-efeito, ao nível da EC_{50} , ao agonista foram calculados os valores de $(CR - 1)$ para a construção dos gráficos de Schild.

Os resultados da regressão de Schild são mostrados na Tabela 5. Como os coeficientes angulares não foram significativamente diferentes da unidade, estimativas dos valores pK_B foram obtidas pela análise de regressão de Schild.

TABELA 5.

Estimativas dos valores de pK_B do CGP 20712A e ICI 118,551 em átrios direitos isolados de ratos controles, frente ao isoproterenol (ISO) ou noradrenalina (NA).

Agonistas	Antagonistas					
	CGP 20712A			ICI 118,551		
	pK_B	α	N	pK_B	N	α
ISO	$9,41 \pm 0,14$	$1,07 \pm 0,12$	11	$7,16 \pm 0,12$	11	$0,97 \pm 0,09$
NA	$9,25 \pm 0,19$	$1,06 \pm 0,15$	6	$6,91 \pm 0,28$	4	$0,86 \pm 0,21$

pK_B , é a constante de dissociação do antagonista.

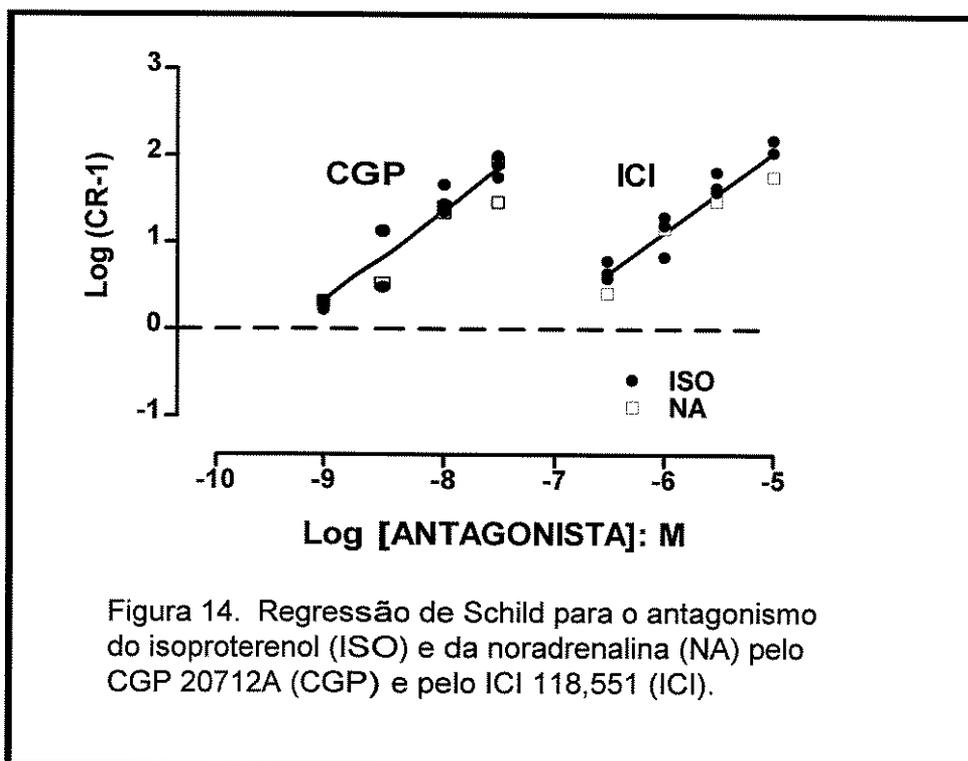
Os valores são médias \pm E.P.M. N é o número de experimentos.

α , é o coeficiente angular da reta de regressão de Schild.

O valor pK_B de cada antagonista foi independente do agonista utilizado ($P > 0,05$, teste *t* de Student não pareado). Estes resultados confirmam o antagonismo competitivo simples e indicam que a população de receptores que está mediando a resposta cronotrópica às catecolaminas em átrios direitos isolados de ratos controles é homogênea.

Podemos observar que as faixas de concentração em que os valores pK_B se apresentam: nanomolar para o CGP, e micromolar para o ICI, sugerem que estes adrenoceptores são do subtipo β_1 .

As retas de regressão de Schild para os dados combinados, obtidos para ambos os antagonistas, frente aos agonistas ISO e NA são mostradas na Figura 14.



A próxima série de experimentos foi realizada em tecidos de animais submetidos à cirurgia simulada ou à DSA, para determinar se estes tratamentos causam alguma alteração na população funcional dos adrenoceptores β que medeiam o cronotropismo cardíaco. As concentrações dos antagonistas utilizadas foram escolhidas com base no valor K_B de cada antagonista de modo a bloquear o subtipo de adrenoceptor β pelo qual o antagonista é seletivo, com pouco ou nenhum efeito no outro subtipo. Para o CGP 20712A uma concentração de 10 nM foi usada para bloquear seletivamente os receptores β_1 - adrenérgicos.

Nos tecidos obtidos sete dias após cirurgia simulada ou DSA, os valores aparentes de pK_B para o CGP 20712A foram 9.47 ± 0.06 (N=6) e 9.55 ± 0.08 (N=6), respectivamente. Estes valores não diferem entre si, $P < 0,05$). Os resultados são mostrados na Figura 15.

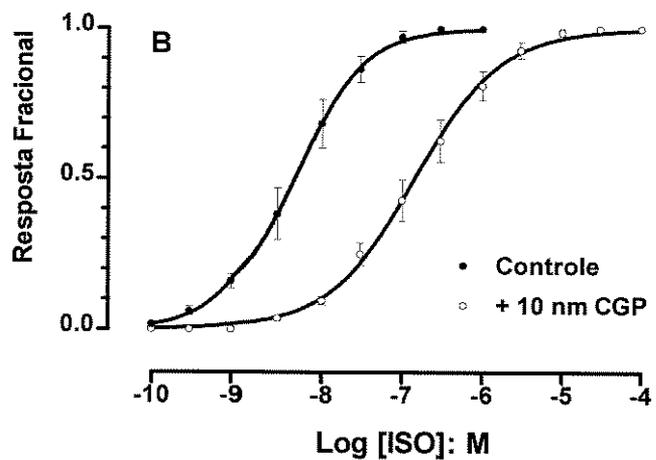
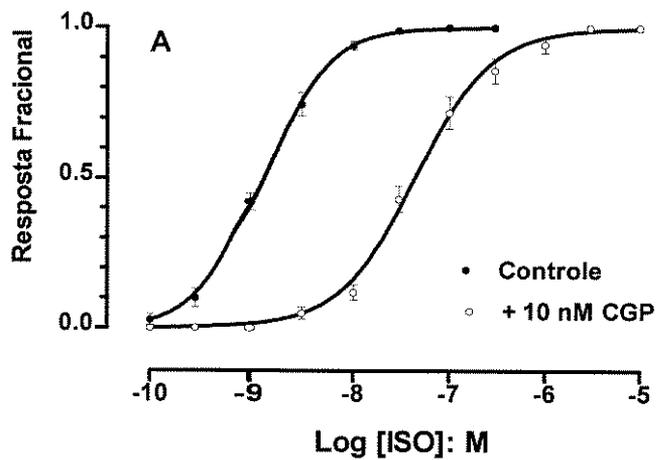


Figura 15. Antagonismo da resposta cronotrópica ao isoproterenol (ISO) pelo CGP 20712A (10 nM) em átrios direitos isolados de ratos submetidos à cirurgia simulada (A) ou com desnervação sino-aórtica (B). Os dados são médias \pm E.P.M. de 6 experimentos.

Para o ICI 118,551 uma concentração de 50 nM foi usada para bloquear apenas os receptores β_2 adrenérgicos. ICI 118,551 nesta concentração não produziu nenhuma mudança significativa ($P > 0,05$, teste t de Student) nos valores de pEC_{50} do ISO em átrios direitos de ratos controles ou com DSA. Os valores da pEC_{50} para o ISO obtidos na ausência e na presença de ICI 118,551 foram 8.56 ± 0.11 e 8.32 ± 0.12 (N=5) em átrios isolados de ratos sete dias após cirurgia simulada. Os valores correspondentes para tecidos atriais de ratos sacrificados sete dias após DSA foram 8.33 ± 0.08 e 8.10 ± 0.10 (N=5), respectivamente.

Estes resultados confirmam que a população de adrenoceptores que está mediando a resposta cronotrópica às catecolaminas em átrios direitos isolados de ratos submetidos à DSA é homogênea β_1 .

5. EFEITOS DA DESNERVAÇÃO SINO-AÓRTICA (DSA) SOBRE A LIGAÇÃO DO 125 IODO-CIANOPINDOLOL (125 ICYP)

A DSA não causou nenhuma alteração na afinidade do 125 ICYP pelos sítios ligantes de membranas atriais. DSA causou uma diminuição de cerca de 40% no número dos sítios ligantes quando expressos em relação ao peso do tecido, e de cerca de 30% quando expressos em peso de proteína. O valor de B_{max} para o 125 ICYP em gramas de tecido do grupo com DSA foi estatisticamente diferente de ambos os grupos controles ($P < 0,05$). O valor de B_{max} para o 125 ICYP em mg de proteína nos tecidos do grupo com DSA foram significativamente diferentes do grupo submetido à cirurgia simulada ($P < 0,05$), mas não do grupo controle ($P > 0,05$).



Curvas de saturação ao 125 ICYP em preparação de membranas atriais são mostradas na Figura 16 e os parâmetros obtidos nestes experimentos com o 125 ICYP são apresentados na Tabela 6.

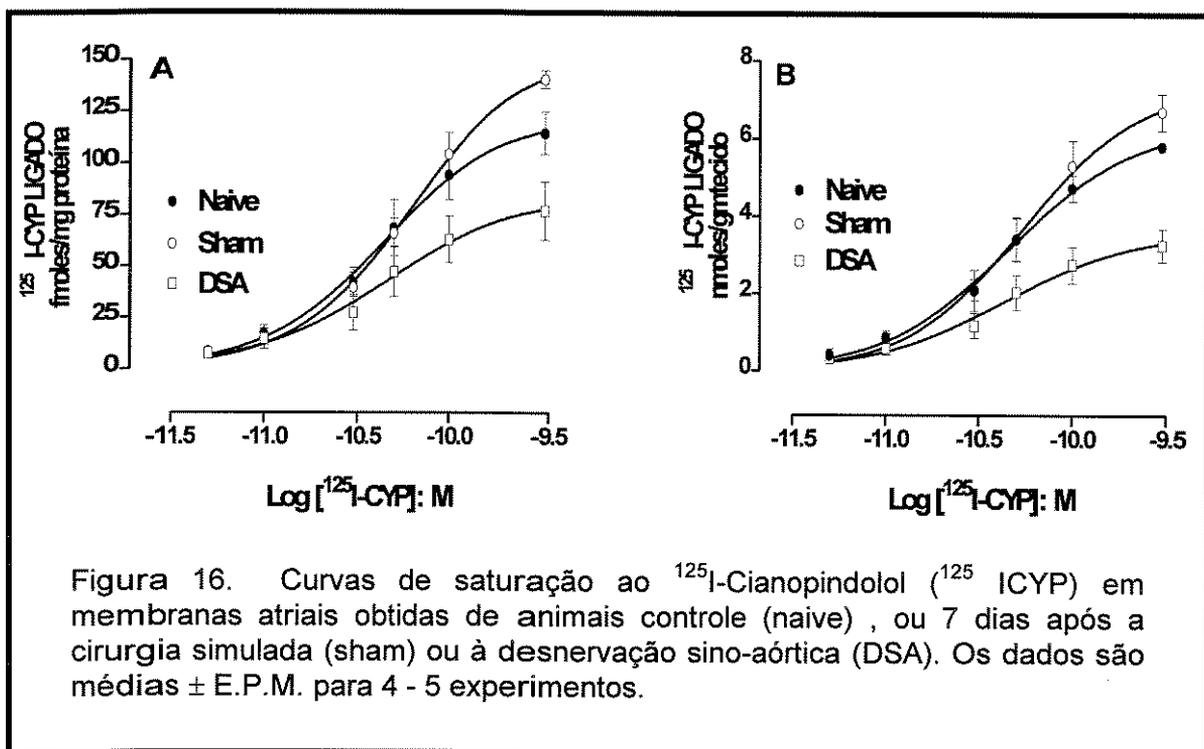


TABELA 6.

Parâmetros obtidos das curvas de saturação ao 125 I-cianopindolol (125 ICYP) em membranas atriais de animais controles, com cirurgia simulada (sham) e com desnervação sino-aórtica (DSA).

Grupo	B_{max}		pK_d	n
	nmol/g/tecido	fmoles/mg proteína		
Controle	$6,51 \pm 0,034$	$126,0 \pm 12,4$	$10,30 \pm 0,10$	$1,3 \pm 0,1$
Sham	$7,89 \pm 0,58$	$156,5 \pm 15,5$	$10,21 \pm 0,11$	$1,2 \pm 0,1$
DSA	$3,74 \pm 0,46^a$	$83,9 \pm 20,1^b$	$10,30 \pm 0,11$	$1,3 \pm 0,1$

a Estatisticamente diferente dos grupos controle e Sham, $P < 0,05$

b Estatisticamente diferente do grupo Sham, $P < 0,05$

B_{max} , expressa o número de sítios ligantes (receptores) presentes na preparação.

pK_d , expressa a afinidade do ligante radioativo pelos sítios de ligação do receptor.

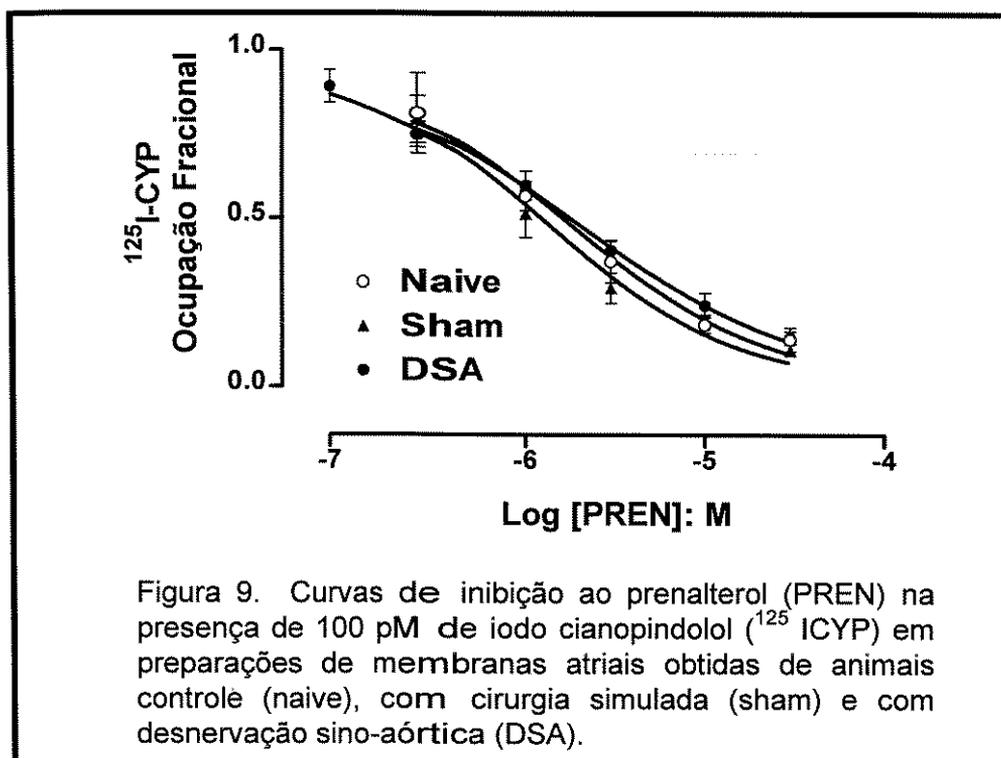
n, expressa o coeficiente de Hill.

Os valores são médias \pm E.P.M. para 4 a 5 determinações.

6- EFEITO DA DESNERVAÇÃO SINO-AÓRTICA NA AFINIDADE (pK_d) E NA EFICÁCIA (τ) DO PRENALTEROL

Nesta última série de análises combinamos os dados obtidos em experimentos funcionais com o agonista parcial PREN e os experimentos de curvas de competição com o 125 ICYP em preparação de membranas atriais.

Na Figura 9 estão representadas as curvas de competição entre o prenalterol e o 125 ICYP. O valor da pIC_{50} do PREN e os coeficientes angulares das curvas de inibição foram: $5,83 \pm 0,12$ e $0,74 \pm 0,06$, $5,93 \pm 0,08$ e $0,90 \pm 0,14$, e $5,77 \pm 0,08$ e $0,67 \pm 0,07$, respectivamente para os grupos controles, com cirurgia simulada e DSA. Estes valores não são estatisticamente diferentes, confirmando a presença de população homogênea de adrenoceptores β_1 .



Os valores aparentes de K_d para o PREN calculados da expressão 30, a partir das curvas de inibição e de curvas concentração-efeito em experimentos funcionais não foram significativamente diferentes entre si, em entre os grupos estudados. No entanto, os valores calculados de eficácia, segundo a expressão 27, foram estatisticamente diferentes nos átrios obtidos de animais com DSA, quando comparados com seus grupos controles ($P < 0,05$, tabela 7)

TABELA 7.

Efeitos da desnervação sino-aórtica na afinidade (pK_d) e na eficácia (τ) do Prenalterol.

Grupos	Radioligante	Funcional	
	pK_d	pK_d	τ
CONTROLE	6,39 \pm 0,18	6,73 \pm 0,09	3,57 \pm 0,48
SHAM	6,42 \pm 0,10	6,46 \pm 0,09	2,94 \pm 0,09
DSA	6,38 \pm 0,12	6,70 \pm 0,08	0,62 \pm 0,17 ^a

a, Estatisticamente diferente dos grupos Controle e Sham, $P < 0.05$. Os valores são médias \pm E.P.M. para 4 a 5 experimentos com radioligante e 6 a 7 para os estudos funcionais.

Em conjunto nossos dados indicam que a DSA induziu subsensibilidade aos agonistas β - adrenérgicos que estava associada à diminuição da eficácia do agonista parcial prenalterol e à redução do número de adrenoceptores β_1 quantificados nos experimentos de saturação com o radioligante ¹²⁵ iodo-cianopindolol. A DSA não produziu nenhuma alteração da população funcional dos adrenoceptores β que medeiam o cronotropismo em átrios direitos de ratos.

DISCUSSÃO

A desnervação sino-aórtica, ao interromper a aferência neuronal dos barorreceptores aórticos e carotídeos, libera o sistema nervoso simpático de uma fonte primária de inibição e causa imediatamente, hipertensão e taquicardia. A hipertensão pode persistir por alguns meses e se caracteriza por extrema labilidade (ALEXANDER *et al.*, 1980, KRIEGER *et al.*, 1980; VASQUEZ & KRIEGER, 1980). A taquicardia, entretanto, é transitória e dura em média duas semanas (BRODY *et al.*, 1983; VASSALO *et al.*, 1985; TRAPANI *et al.*, 1986; ALPER *et al.*, 1987a, b; MACHADO, 1990; MACHADO *et al.*, 1992; MAUAD *et al.*, 1992).

Os mecanismos envolvidos com o retorno da frequência cardíaca a valores normais na vigência de altos níveis de catecolaminas circulantes e de atividade simpática (ALEXANDER *et al.*, 1980; VASQUEZ & KRIEGER, 1982; VASSALO *et al.*, 1991), não foram ainda esclarecidos. Acreditamos, entretanto, que esta poderia estar relacionada a uma diminuição na sensibilidade dos receptores β -adrenérgicos localizados no marca-passo cardíaco que medeiam o efeito cronotrópico positivo das catecolaminas.

Nós analisamos a evolução temporal da sensibilidade de átrios direitos isolados de ratos submetidos à DSA em vários momentos após a cirurgia, na vigência ou não dos sistemas de metabolização de catecolaminas. Os resultados mostram que após a DSA ocorreu diminuição na sensibilidade de átrios direitos isolados de ratos às ações cronotrópicas do ISO e da NA, e essa subsensibilidade não foi afetada pelos sistemas de metabolização das catecolaminas.

CABRAL & VASQUEZ (1984) haviam demonstrado anteriormente que a sensibilidade ao ISO estava reduzida em corações isolados de ratos submetidos à DSA.

Entretanto, contrariamente aos nossos resultados, aqueles autores observaram também diminuição da resposta máxima ao ISO, 5 horas ou 15 dias após DSA. É provável que as diferenças nos resultados sejam devidas à preparação usada e à forma de administração do agonista que, naquele caso, foi adicionado ao líquido de perfusão em doses isoladas, o que levaria a exposição apenas transitória ao ISO. Nós adicionamos os agonistas de forma cumulativa ao líquido de incubação, mantendo-o em contato com o tecido até a obtenção da curva concentração-efeito completa. Além disso, as paredes bastante delgadas do átrio direito tornam o acesso do agonista aos receptores mais fácil do que no coração inteiro.

Em qualquer tecido, a sensibilidade às catecolaminas é determinada pelo tipo, subtipo e/ou densidade de adrenoceptores mediando sua ação, associados com a eficiência dos sistemas de metabolização de catecolaminas, que limitam a meia vida do agonista na biofase (IVERSEN, 1965, 1975, TRENDELENBURG, 1978).

Os efeitos da atividade dos sistemas de recaptção neuronal e extraneuronal sobre as ações das catecolaminas em tecido cardíaco estão bem documentados (IVERSEN, 1965, 1975, TRENDELENBERG, 1978, 1980, 1991). A inibição destes sistemas, *in vitro*, provoca um deslocamento à esquerda das curvas concentração-efeito para agonistas que sejam por eles metabolizados. Assim sendo, como esperado, as curvas concentração-efeito para a NA foram desviadas para a esquerda cerca de doze vezes para os animais controles e cerca de cinco vezes para os animais submetidos à cirurgia simulada (sham) e à DSA. Esta diferença na magnitude de desvios à NA, entre o grupo controle e os grupos sham e DSA, pode ser devida ao processo anestésico e cirúrgico a que esses animais foram submetidos. Para o ISO as curvas concentração-efeito foram desviadas à esquerda cerca de duas vezes em átrios direitos de ratos de

todos os grupos estudados e em todos os diferentes períodos após cirurgia simulada. O desvio maior, observado nas curvas dose-resposta à NA ocorre porque a recaptação neuronal, da qual o ISO não é substrato, é mais ativa nessa preparação do que a captação extraneuronal (BELL & GRABSCH, 1976, DYKE & ANGUS, 1988).

Além disso, nossos resultados mostraram que um aumento da atividade dos sistemas de captação e metabolização de catecolaminas não parece ser a causa da subsensibilidade observada aos 3 e 7 dias após DSA, uma vez que esta se manteve inalterada depois da inibição do sistema de recaptação neuronal e do sistema de captação extraneuronal.

Em face destes resultados, escolhemos tecidos isolados de ratos sacrificados sete dias após a cirurgia para analisar a população de adrenoreceptores β -atriais.

Primeiramente, o efeito da DSA foi avaliado através do uso do agonista parcial PREN. Por definição, agonista parcial é aquele que necessita ocupar todos os receptores para desencadear a resposta máxima. Quando o número de receptores diminui, a curva concentração-efeito ao agonista parcial torna-se deprimida, ou seja, a resposta máxima da preparação fica reduzida comparada com a resposta máxima a um agonista pleno. No entanto, a afinidade do agonista parcial aos receptores não precisa, necessariamente, estar mudada (KENAKIN & FERRIS, 1983).

A potência e a resposta máxima ao PREN foram reduzidas em átrios direitos isolados de ratos sacrificados uma semana após DSA. Também a afinidade e a eficácia do PREN foram estimadas, tanto em experimentos funcionais como em experimentos com radioligantes. Os valores de pK_d estimados com ambas as técnicas foram similares (6.7 e 6.4, respectivamente; $P > 0,05$) e indicaram diminuição na eficácia do agonista em ativar os adrenoreceptores, sem alteração na afinidade. Esses valores pK_d do PREN estão

de acordo com aqueles obtidos em experimentos com radioisótopo, por BRODDE *et al.* (1984) e HEDBERG & MATTSSON (1981), que foram iguais a 6.2 e 6.4, respectivamente. Os valores de pK_d obtidos de experimentos funcionais em nosso estudo também foram similares àqueles obtidos por HEDBERG & MATTSSON (1981), que encontraram valores de 6.4 e 6.6 em ventrículo esquerdo e músculo soleus de gato, respectivamente. No entanto, as estimativas da afinidade do PREN reportadas por KENAKIN & BEEK (1980, 1984) e KENAKIN & FERRIS (1983), obtidas de experimentos funcionais e experimentos com radioisótopo, diferem das nossas. Aqueles autores encontraram valores de pK_d variando entre 7.1 e 7.5. Os resultados sugerem que em átrios direitos de ratos submetidos à desnervação sino-aórtica ocorre subsensibilidade da resposta a agonistas β -adrenérgicos relacionada com diminuição do número de adrenoceptores. Esta observação não exclui a possibilidade de alteração concomitante do sub-tipo de adrenoceptores mediando a resposta.

Em átrios direitos de ratos machos, normais, a resposta cronotrópica às catecolaminas é mediada por uma população homogênea de adrenoceptores do subtipo β_1 . Entretanto, após estresse foi demonstrada a participação de adrenoceptores do subtipo β_2 mediando também esta resposta (BASSANI & DE MORAES, 1988, VANDERLEI *et al.*, no prelo). Considerando que em ratos submetidos a DSA, assim como em animais submetidos ao estresse, ocorre uma hiperreatividade simpática, passamos a investigar esta possibilidade em átrios direitos isolados de ratos sacrificados sete dias após DSA.

Os experimentos com antagonistas seletivos mostraram que a subsensibilidade da resposta cronotrópica aos agonistas β -adrenérgicos não estava relacionada com alterações dos sub-tipos de adrenoceptores β . CGP20712A, na concentração de 10

nM, que é cerca de três vezes maior que seu valor K_B para os adrenoceptores β_1 e cerca de dez vezes menor que seu valor K_B para os receptores β_2 (DOOLEY *et al.*, 1986; HALL *et al.*, 1990), provocou um desvio para a direita na curva concentração-efeito do ISO semelhante em ambos os grupos, indicando que o antagonista estaria atuando somente em adrenoceptores β_1 . Os valores estimados de pK_B para o CGP20712A foram 9.47 e 9.55 para os tecidos obtidos de animais sham e com DSA, respectivamente.

O antagonista ICI 118,551, na concentração de 50 nM que é trinta a cem vezes maior que seu valor K_B para os adrenoceptores β_2 , e ligeiramente menor que seu valor K_B para os receptores β_1 (BILSKI *et al.*, 1983, BARKER *et al.*, 1990), produziu deslocamentos para a direita das curvas concentração-efeito menores que duas vezes.

Esses desvios não foram significantivamente diferentes entre os grupos estudados. Coletivamente estes resultados mostram que os adrenoceptores β_1 constituem a população de receptores mediando a resposta cronotrópica nos tecidos de animais que foram submetidos à DSA.

O número de sítios ligantes dos adrenoceptores β foi também determinado. Nossos resultados mostraram que a DSA não alterou a afinidade do 125 ICYP, mas determinou redução no número total dos sítios ligantes. A densidade dos receptores foi estimada com base no peso do tecido e na determinação da concentração de proteínas presentes na suspensão dos tecidos usados nos estudos. Quando a concentração de proteínas foi usada para avaliar a densidade dos receptores nos três grupos, diferenças significativas somente foram observadas entre tecidos obtidos dos grupos sham e DSA, enquanto que entre os tecidos obtidos de animais controles

comparados com aqueles submetidos à DSA não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes.

Exposição crônica de um tecido a agonistas pode causar dessensibilização por desacoplamento entre o receptor e a proteína efetora e/ou por um processo de *down-regulation* dos receptores (STILES *et al.*, 1984).

BOHM *et al.* (1994) observaram subsensibilidade ao ISO em tecido cardíaco isolado de ratos espontaneamente hipertensos associada a *down-regulation* dos adrenoreceptores β e aumento da proteína $G\alpha_i$, que exerce ação inibitória sobre a adenilil ciclase.

A teoria droga-receptor preconiza que a diminuição da população funcional de receptores, ou por desacoplamento ou por *down-regulation*, pode causar redução na sensibilidade a agonistas plenos sem alteração em sua resposta máxima. No entanto, essa diminuição na população ativa de receptores que não pode ser medida pela resposta máxima de agonistas plenos, pode ser detectada com o uso de agonistas parciais (KENAKIN, 1993).

Nossos resultados mostram que os efeitos da DSA sobre a resposta cronotrópica dos agonistas plenos, ISO e NA, como também sobre aquela obtidas para o agonista parcial, PREN, em experimentos funcionais e a medida da densidade dos sítios receptores pelo uso de radioligantes pode ser explicada por uma *down-regulation* dos receptores β_1 funcionais que estão mediando a resposta cronotrópica.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que: (1) aos três dias e uma semana após DSA, independentemente do bloqueio dos sistemas de recaptção das catecolaminas, ocorre uma diminuição nas potências de ambos os agonistas plenos, ISO e NA, em suas ações cronotrópicas em átrios direitos isolados; (2) a sensibilidade foi restaurada em torno de 15 dias após a DSA; (3) a sensibilidade e a resposta máxima para a resposta cronotrópica ao agonista parcial, PREN, foi reduzida uma semana após a DSA; (4) os efeitos da DSA nas ações do PREN foram associados com uma diminuição em sua eficácia agonística aos adrenoceptores β , sem qualquer mudança em sua afinidade; (5) a DSA não determinou qualquer alteração sobre o sub-tipo dos adrenoceptores β que mediam a resposta cronotrópica na preparação estudada; e (6) a DSA causou uma diminuição na densidade dos sítios ligantes dos adrenoceptores β . Destas observações podemos concluir que a DSA causou uma diminuição nas ações dos agonistas β -adrenérgicos por indução de uma *down-regulation* dos adrenoceptores β_1 .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUD, F. M. The sympathetic system in hypertension. **Hypertension**, **4** (suppl. II): 208-225, 1982.
- AHLQUIST, R. P. A study of adrenergic receptors. **Am. J. Physiol.**, **153**: 586-600, 1948.
- ALEXANDER, N., VELASQUEZ, M. T., DECUIR, M., MARONDE, R. F. Indices of sympathetic activity in the sinoaortic denervated hypertensive rat. **Am. J. Physiol.**, **238**: H5221-H5226, 1980.
- ALPER, R. H., JACOB, H. J., BRODY, M. J. Regulation of arterial pressure lability in rats with chronic sinoaortic deafferentation. **Am. J. Physiol.**, **253**: H466-H474, 1987a.
- ALPER, R. H., JACOB, H. J., BRODY, M. J. Central and peripheral mechanisms of arterial pressure lability following baroreceptors denervation. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, **65**: 1615-1618, 1987b.
- ARIENS, E. J. Affinity and intrinsic activity in the theory of competitive inhibition. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, **99**: 32-49, 1954.
- ARUNLAKSHANA, O., SCHILD, H. O. Some quantitative uses of drug antagonists. **Br. J. Pharmacol.**, **14**: 48-58, 1959.
- AXELROLD, J. Methylation reactions in the formation and metabolism of catecholamines and other biogenic amines. **Pharmacol. Rev.**, **18**: 95-113, 1966.
- BARKER, L. A., WINBERY, S. L., SMITH, L. W., McDONOUGH, K. H. Supersensitivity and changes in the active population of *beta* adrenoceptors in rat right atria in early sepsis. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **252**: 675-682, 1990.
- BARLOW, R. B., SCOTT, N. C., STEPHENSON, B. P. The affinity and efficacy of onium salts on frog rectus abdominus. **Br. J. Pharmacol.**, **31**: 188-196, 1967.
- BASSANI, R. A., DE MORAES, S. Subsensitivity to β -adrenoceptor agonists in right atria isolated from footshock-stressed rats. **Gen. Pharmacol.**, **5**: 473-477, 1987.
- 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.**, **246**: 316-321, 1988.
- BELL, C., GRABSCH, B. Involvement of uptake₂ in the termination of activity of neurogenic noradrenaline in the rat isolated atrium. **J. Physiol. (London)**, **254**: 203-212, 1976.

- BENOVIC, J. L., STRASSER, R. H., CARON, M. G., LEFKOWITZ, R. J. β -adrenergic receptor kinase: Identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **83**: 2797-2801, 1986.
- BENOVIC, J. L., BOUVIER, M., CARON, M. G., LEFKOWITZ, R. J. Regulation of adenylyl cyclase-coupled β -adrenergic receptors. **Ann. Rev. Cell Biol.**, **4**: 405-428, 1988.
- BERNE, M. R., LEVY, M. N. The peripheral circulation and its control. In: **Physiology**, 2a. edition, pp.407-410, Guanabara Ed., Rio de Janeiro, 1990.
- BERTHELSON, S., PETTINGER, W. A. A functional basis for classification of α -adrenergic receptors. **Life Sci.**, **1**: 171-183, 1977.
- BESSE, J. C., FURCHGOTT, R. F. Dissociation constants and relative efficacies of agonists acting on α -adrenergic receptors in rabbit aorta. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **197**: 66-78, 1976.
- BILSKI, A. J., HALLIDAY, S. E., FITZGERALD, J. D., WALE, J. L. The pharmacology of a β_2 -selective adrenoceptor antagonist (ICI 118,551). **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, **5**: 430-437, 1983.
- BIRNBAUMER, L. G proteins in signal transduction. **Ann. Rev. Pharmacol. and Toxicol.**, **30**: 675-705, 1990.
- BIRNBAUMER, L. G proteins and the modulation of potassium channels. In: **Potassium Channel Modulators**. Ed. by A. H. Weston e J. C. Hamilton. pp 44-71, BLACKell Scientific Publications, New york, 1992.
- BLACK, J. W., DUNCAN, W. A. M., DURANT, C. J., GANELLIN, C. R., PARSONS, M. E. Definition and antagonism of histamine H_2 -receptors. **Nature (London)**, **236**: 385-390, 1972.
- BLACK, J. W., LEFF, P. Operational models of pharmacological agonist. **Proc. R. Soc. Lon. [Biol.]**, **220**: 141-162, 1983.
- BLACK, J. W., LEFF, P., SHANKLEY, N. P., WOOD, J. An operational model of pharmacological agonism: the effect of E/[A] curve shape on agonist dissociation constant estimation. **Br. J. Pharmacol.**, **84**: 561-571, 1985.
- BLINKS, J. R. Evaluation of the cardiac effects of several *beta* adrenergic blocking agents. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **139(3)**: 673-685, 1967.
- BOHM, M., CASTELLANO, M., PAUL, M., ERDMANN, E. Cardiac norepinephrine, β -adrenoceptors, and $G_{i\alpha_1}$ -protein in prehypertensive and hypertensive spontaneously hypertensive rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, **23**: 980-987, 1994.

- BONISH, H., TRENDELENBURG, U. Extraneuronal removal, accumulation and O-metylation of isoprenaline in the perfused heart. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, **283**: 191-218, 1974.
- BOUVIER, M., COLLINS, S., O'DOWD, B. F., CAMPBELL, P. T., DE BLASI, A., KOBILKA, B. K., MacGREGOR, C. , IRONS, G. P., CARON, M. G., LEFKOWITZ, R. J. Two distinct pathway for cAMP-mediated down-regulation of the β_2 -adrenergic receptors. **J. Biol. Chem.**, **264**: 16786-16792, 1989.
- BRODDE, O-E. Cardiac *beta*-adrenergic receptors. **ISI ATLAS of Science Pharmacol.** **1**: 107-112, 1987.
- BRODDE, O-E. β_1 - e β_2 -adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. **Pharmacol. Rev.**, **43**: 203-242, 1991.
- BRODDE, O-E., O'HARA, N., ZERKOWSKI, H.-R. , ROHM, N. Human cardiac β -adrenoceptors: both β_1 - and β_2 -adrenoceptors are functionally coupled to the adenylate cyclase in right atrium. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, **6**: 1184-1191, 1984.
- BRODDE, O-E., ZERKOWSKI, H. R. , BORST, H.G. , MAIER, W., MICHEL, M.C. Drug- and disease-induced changes of human cardiac β_1 - and β_2 - adrenoceptors. **Eur. Heart J.**, **10** [suppl. B]: 38-44, 1989.
- BRODY, M. J., BARON, K. W., BERECEK, K. H., FABER, J. E. , LAPPE, R. W. Neurogenic mechanisms of experimental hypertension. In: **Hypertension: Physiopathology and Treatment**, 2a. Edition, pp 117-140, McGraw-Hill, New York, 1983.
- BROWN, A.M. Receptors under pressure. **Circ. Res.**, **46**: 1-10, 1980.
- BRYAN, L. J., COLE, J. J., O'DONNELL, S. R. , WANSTALL, J. C. A study designed to explore the hypothesis that *beta*₁ adrenoceptors are "innervated" receptors and *beta*₂ adrenoceptors are "hormonal" receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **216**: 395-400, 1981.
- BURGEN, A. S., IVERSEN, L. L. The inhibition of noradrenaline uptake by sympathomimetic amines in the rat isolated heart. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**, **25**: 34-49, 1965.
- BUTTERFIELD, M. C., CHESS-WILLIAMS, R. Enhanced ventricular alpha-adreceptor responses following chronic beta-adrenoceptor stimulation in the rat. In: **The Pharmacology of Adrenoceptor** , Ed. by E. Szabadi e C. M. Bradshaw, pp 345-346, Berkhauser Verlag, Basel, 1991.
- BYLUND, D. B., YAMAMURA, H. I. Methods for receptor binding. In: **Methods in Neurotransmitter Receptor Analysis**. Ed. by Yamamura et al., vol 1, pp 1-35, Raven Press, New York, 1990.

- CABRAL, A. M., VASQUEZ, E. C. Cardiac β -adrenoceptor desensitization after sinoaortic baroreceptors denervation on isoproterenol-pretreatment. **Pharmacol. Res. Commun.**, **16**:1031-1040, 1984.
- CALLIA, M. L., DE MORAES, S. Heterogeneity of *beta* adrenoceptors in right atria isolated from cold-exposed rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **230**: 450-454, 1984.
- CALLINGHAN, B. A., BURGEN, A. S. V. The uptake of isoprenaline and noradrenaline by the perfused rat heart. **Mol. Pharmacol.**, **2**: 37-42, 1966.
- CARLSON, E.; ABLAD, B.; BRESTROM, A., CARLSON, B. Differentiated blockage of the chronotropic effects of various adrenergic stimuli in the cat heart. **Life Sci.**, **11** (part I): 953-958, 1972.
- CHEN, F. C. M.; YAMAMURA, H. I., ROESKE, W. R. Ontogeny of mammalian myocardial β -adrenergic receptors. **Eur. J. Pharmacol.**, **58**: 255-264, 1979.
- CHENG, Y.-C., PRUSOFF, W.H. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. **Biochem. Pharmacol.**, **22**: 3099 - 3108, 1973.
- CHESS-WILLIAMS, R., DOUBLEDAY, B., REYNOLDS, G. P. Differential regulation of cardiac α - and β -adrenoceptors by the sympathetic nervous system. **J. Auton. Pharmacol.**, **14**: 29-36, 1994.
- CLARK, A. J. The antagonism of acetylcholine by atropine. **J. Physiol. (London)**, **61**: 547-556, 1926.
- CLARK, A., J. General pharmacology. In: **Heffner's Handbuch d-exp. Pharmacol. Erg. be 4**, Springer, Berlin, 1937.
- COLLINS, S., CARON, M. G., LEFKOWITZ, R. J. β_2 -adrenergic receptor in hamster smooth muscle cells are transcriptionally regulated by glucocorticoids. **J. Biol. Chem.**, **263**: 9067-9070, 1988.
- DOOLEY, D. J., BITTIGER, H., REYMANN, N. C. CGP 20712 A: A useful tool for quantitating β_1 - and β_2 -adrenoceptors. **Eur. J. Pharmacol.**, **130**:137-139, 1986.
- DOSS, R. C., PERKINS, J. P., HARDEN, T. K. Recovery of β -adrenergic receptors following long term exposure of astrocytoma cells to catecholamine. **J. Biol. Chem.**, **23**: 12281-12286, 1981.
- DYKE, A., ANGUS, J. A. Comparative assay of neuronal uptake and autoinhibitory feedback in guinea-pig and rat atria. **J. Auton. Pharmacol.**, **8**: 219-228, 1988.

- EMORINE, L., MARULLO, S., BRIEND-SUTREN, M. M., PATEY, G., TATE, K., DELAVIER-KLUTCHKO, C., STROSBURG, A. D. Molecular characterization of the human β_3 -adrenergic receptor. **Science**, **245**: 1118-1121, 1989.
- EMORINE, L., BLIN, N., STROSBURG, A.D. The human β_3 -adrenoceptor: the search for a physiological function. **Trends in Pharmacol. Sci.**, **15**: 3-7, 1994.
- FELDMAN, R. D. β -adrenergic receptor alteration in hypertension- physiological and molecular correlates. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, **65**: 1666-1672, 1987.
- FELDMAN, A. M., BRISTOW, M. R. The β -adrenergic pathway in the human heart: implications for inotropic therapy. **Cardiology**, **77** (suppl.I): 11-132, 1990.
- FERRARIO, C. M., TAKISHITA, S. Baroreceptor reflexes and hypertension. In: **Hypertension: Physiopathology and Treatment**, 2a. edition, pp 161-170, McGraw-Hill, New York, 1983
- FORD, A. P. D. W.; WILLIAMS, T. J., BLUE, D. R., CLARKE, D. E. α_1 -adrenoceptor classification: sharpening Occam's razor. **Trends Pharmacol. Sci.**, **15**: 167-170. 1994.
- FURCHGOTT, R. J. The use of β -haloalkylamines in the differentiation of dissociation constants of receptors-agonist complexes. In: **Advances in Drugs Research**, vol 3. Ed. by N. J. Harper e A. B. Simmonds, pp 21-55, Academic Press, London, 1966.
- FURCHGOTT, R. J. The classification of adrenoceptors (adrenergic receptors). An evaluation from the setpoint of receptor theory. In: **Catecholamines**. Ed. by H. Blaschko e E. Muscholl, pp 282-335, Springer-Verlag, Berlin, 1972.
- GADDUM, J. H. The quantitative effects of antagonistic drugs. **J. Physiol. (London)**, **89**: 7P-9P, 1937.
- GILMAN, A. G. G proteins: transducers of receptors-generated signals. **Ann. Rev. Biochem.**, **56**: 615-649, 1987.
- GUYTON, A. C. **Fisiologia Médica**, 6a. edição, pp 199-232, Interamericana, Rio de Janeiro, 1993.
- HALL, J. A., KAUMANN, A. J., BROWN, M. J. Selective β_1 -adrenoceptor blockade enhances positive inotropic responses to endogenous catecholamines mediated through β_2 -adrenoceptors in human atrial myocardium. **Circ. Res.**, **66**: 1610-1623, 1990.
- 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 (London)**, **329**: 333-335, 1987.

- HAN, C., LI, J., MINNEMAN, K. P. Subtypes of α_1 adrenoceptors in rat blood vessels. **Eur. J. Pharmacol.**, **190**: 97-104, 1990.
- HARDEN, T. K. Agonist-induced desensitization of the β -adrenergic receptor-linked adenylate cyclase. **Pharmacol. Rev.**, **35**: 5-32, 1983.
- HEDBERG, A., MATTSSON, H. β Adrenoceptor interaction of full and partial agonists in the cat heart and soleus muscle. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **219**: 798 - 808, 1981.
- HEDBERG, A., GERBER, J. G., NIES, A. S., WOLFFE, B. B., MOLINOFF, P. B. Effects of pindolol and propranolol on β adrenergic receptors on human lymphocytes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **239**: 117-123, 1986.
- HERTING, G., SUKO, J. Influence of neuronal and extraneuronal uptake on disposition, metabolism, and potency of catecholamines. In: **Perspectives in Neuropharmacology**. Ed. by S.H. Snyder, pp 267-300, Oxford University Press, London, 1972.
- HOFFMAN, B. B., LEFKOWITZ, R.J. Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor. In: *The Pharmacological Basis of therapeutics*, ed. by Perry B. Molinoff and Raymond W. Rudson, McHill, p. 199-248, 1996.
- HUGHES, I. E., SMITH, J. A. The stability of noradrenaline in physiological salt solutions. **J. Pharm. Pharmacol.**, **30**: 124-126, 1978.
- IVERSEN, L. L. The uptake of noradrenaline by the isolated perfused rat heart. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**, **21**: 523-537, 1965.
- IVERSEN, L. L. Neuronal uptake processes for amine and amino acid transmitters. In: **Drug and Transport Processes**, Edited by B.A.Callinghan, pp 276-286, University Park Press, London, 1975.
- JUBERG, E. N.; MINNEMAN, K. P., ABELL, P. W. β_1 - and β_2 -adrenoceptor binding and functional response in right atria and left atria of rat heart. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, **330**: 199-202, 1985.
- KENAKIN, T. The Schild regression in the process of receptor classification. **Can J. Physiol. Pharmacol.**, **60**: 249-265, 1982.
- KENAKIN, T. Drugs and receptors. An overview of the current state of knowledge. **Drugs**, **40**: 666-687, 1990.
- KENAKIN, T. **Pharmacologic Analysis of Drug-Receptor Interaction**. Second edition, Raven Press, New York, 1993.
- KENAKIN, T., BEEK, D. Is prenalterol (H133/80) really selective β_1 adrenoceptor agonist? Tissue selectivity resulting from differences in stimulus-response relationships. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **213**: 406 - 413, 1980.

- KENAKIN, T., BEEK, D. In Vitro studies on the cardiac activity of prenalterol with reference to use in congestive heart failure. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **220**: 77-85, 1982.
- KENAKIN, T., BEEK, D. Relative efficacy of prenalterol and pirbuterol for *beta*-1 adrenoceptors: measurement of agonist affinity by alteration of receptor number. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **229**: 340 - 345, 1984.
- KENAKIN, T., FERRIS, R. M. Effects of In Vivo β -adrenoceptor down-regulation on cardiac responses to prenalterol and pirbuterol. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **220**: 90-97, 1983.
- KOCH, E., MIES, H. Chronishes arteriellles hochdruck durch experimentelle Dauerausschaltung der blutdruckzugler. **Krieheitsforschung** , 7: 241-256, 1929 apud GOLDSTEIN, D.S., KOPIN, I. J. The autonomic nervous system and catecholamines in normal blood pressure control and in hypertension. In: **Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management**, ed. by J. H. Laragh and B. M. Brenner, Raven Press, p. 711-747, 1990.
- KOPIN, I.J. Metabolic degradation of catecholamines. The relative importance of different pathways under physiological conditions and after administration of drugs. In: **Catecholamines**. Ed by H. Blaschko e E. Muscholl, pp. 271-282, Springer-Verlag, Berlin, 1972.
- KOSTERLITZ, J. W., WATT, A. J. Kinetic parameters of narcotic agonists and antagonists, with particular reference to N-allylnoroxymorphone (naloxone). **Br. J. Pharmacol.**, **33**: 266-276, 1968.
- KRIEGER, E. M. Neurogenic hypertension in the rat. **Circ. Res.**, **15**: 511-521, 1964.
- KRIEGER, E. M., VASQUEZ, E. C., TRINDADE Jr., A. S. Factors influencing adrenergic mechanisms in the heart. In: **Advance in Physiological Science**. Ed. by M. Szentivanyi e A. Juhasz-Nagi, pp 11-17, Vol. 27, Pergamon, Budapest, 1980.
- LANDS, A. M., ARNOLD, A., McAULIFF, J. P., LUDUENA, F. R., BROWN, T. B. Differentiation of receptors systems activated by sympatomimetic amines. **Nature** (London), **214**: 597-598, 1967.
- LANGER, S. Z. Presynaptic regulation of catecholamines release. **Biochem. Pharmacol.**, **23**: 1793-1800, 1974.
- LANGMUIR, I. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. **J. Am. Chem. Soc.**, **40**: 1361, 1918.

- LEFF, P., PRENTICE, D. J., GILES, H., MARTINS, G. R., WOOD, J. Estimation of agonist affinity and efficacy by direct, operational model-fitting. **J. Pharmacol. Methods**, **23**: 225-237, 1990.
- LEFF, P., DOUGALL, I. G. Further concerns over Cheng-Prusoff analysis. **Trends Pharmacol. Sci.**, **14**: 110-112, 1993.
- LEFKOWITZ, R. J., CARON, M. G. Adrenergic receptors: models for the study of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. **J. Biol. Chem.**, **263**: 4993-4996, 1988.
- LEFKOWITZ, R. J.; HOFFMAN, B. B., TAYLOR, P. Neurohumoral transmission: The autonomic and somatic motor nervous systems. In: **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. Ed. by A. Goodman Gilman; T.W. Rall; A.S. Nies e P. Taylor, 8a. edition, pp 84-121, Pergamon Press, New York, 1990.
- LESTER, H. A., MAGER, S., QUICK, M. W., COREY, J. L. Permeation properties of neurotransmitter transporters. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, **34**: 219-249, 1994.
- LIANG, C., FRANTZ, R. P., SUEMATSU, M., SAKAMOTI, S., SULLEBARGER, J. T. , FAN, T. M., GUTHINGER, L. Chronic β -adrenoceptor blockade prevents the development of β -adrenergic subsensitivity in experimental right-side congestive heart failure in dogs. **Circ.**, **84**: 254-266, 1991.
- LOHSE, M. J., BENOVIC, J. L., CODINA, J., CARON, M. G., LEFKOWITZ, R. J. β -arrestin: A protein that regulates β -adrenergic receptor function. **Science**, **248**: 1547-1549, 1990.
- LOWRY, O. H., ROSENBROUGH, N. J., FARR, A. L., REALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, **193**: 265-275, 1951.
- MACHADO, B. H. Arterial pressure responses to adrenoceptor antagonism in rats with sinoaortic deafferentation. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **23**: 343-353, 1990.
- MACHADO, B. H.; MAUAD, H., GLASS, M. L. Transient changes in blood pressure during spontaneous deep breaths in rats with sinoaortic deafferentation. **J. Appl. Physiol.**, **72**(3): 920-924, 1992.
- 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.**, *in press*.
- MAUAD, H.; GLASS, L. M., MACHADO, B. H. Effects of selective denervation of baroreceptors on pulmonary ventilation and arterial pressure lability in rat. **Hypertension**, **19**[suppl.]: II182-II186, 1992.

- McGRATH, J., WILSON, V. α -Adrenoceptor subclassification classical and response-related methods: same or different answers. **Trends Pharmacol Sci.**, **9**: 16-18, 1988.
- MILNOR, G. L. Hypothalamic control of baroreceptor. **Am J. Physiol.**, **218**: 124-131, 1970.
- MINNEMAN, K. P., MOLINOFF, P. B. Classification and quantification of *beta* adrenergic receptor subtypes. **Biochem. Pharmacol.**, **29**: 1317-1323, 1980.
- MINNEMAN, K. P. α_1 -Adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell Ca^{2+} . **Pharmacol. Rev.**, **40**: 87-119., 1988.
- O'DONNELL, S. R., WANSTALL, J. C. Evidence that ICI 118,551 is a potent, highly β_2 -selective adrenoceptor antagonist and can be used to characterize β -adrenoceptor populations in tissues. **Life Sci.**, **27**: 671-677, 1980.
- 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.**, **84**: 227-235, 1985.
- RAYMOND, J. R., HNATOWICH, M.; LEFKOWITZ, R. J., CARON, M. G. Models for regulation of signal transduction processes. **Hypertension**, **15**: 119-131, 1990.
- REGAN, J. W., KOBILKA, T. S., YANG-FENG, T. L., CARON, M. G., LEFKOWITZ, R. J., KOBILKA, B. K. Cloning e expression of Kidney cDNA for an α_2 -adrenergic receptor subtypes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **85**: 6301-6305, 1988.
- RODBELL, M. The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. **Nature**, **284**: 17-22, 1980.
- RODRIGUES, M., MARCONDES, F. K., SPADARI-BRATFISCH, R. C. Relationship among sensitivity to adrenaline, plasma corticosterona level and estrous cycle in rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, **73**: 602-607, 1995.
- SALT, P. J. Inhibition of noradrenaline uptake₂ in the isolated rat heart by steroids, clonidine and methoxylate phenethylamines. **Eur. J. Pharmacol.**, **20**: 329-340, 1972.
- SCHWARZ, R. Principles of receptor binding studies. In: **The Heart and Cardiovascular System**. Ed by H. A. Fozzard et al., vol 2, pp 483-503, Raven Press, New York, 1992.
- SCHWINN, D. A., CARON, M. G., LEFKOWITZ, R. J. The *beta*-adrenergic receptor as a model for molecular structure-function relationships in G-protein-coupled receptors. In: **The heart e Cardiovascular System**, Second edition. Ed. by H. A. Fozzard *et al.*, pp 1657-1684, Raven Press, New York, 1992.

- 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**, **317**: 124-129, 1985.
- SIBLEY, D. R., STRASSER, R. H., BENOVIC, J. L., DANIEL, G., LEFKOWITZ, R. J. Phosphorylation/dephosphorylation of the *beta*-adrenergic receptor regulates its functional coupling to adenylate cyclase and subcellular distribution. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **83**: 9408-9412, 1986.
- 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. Pharmac.**, **19**: 129-135, 1988.
- 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.**, **19** (4) : 553-557, 1988.
- STEPHENSON, R.P. A modification of receptor theory. **Br. J. Pharmacol.**, **11**: 379-393, 1956.
- STARKE, K. α -Adrenoceptor subclassification. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, **88**: 199-236, 1981.
- STILES, G. L., CARON, M. G., LEFKOWITZ, R. J. β_2 -adrenergic receptors: biochemical mechanism of physiological regulation. **Physiol. Rev.**, **64**: 661-743, 1984.
- STRASSER, R. H., KRIMMER, J., MARQUETANT, R. Regulation of β -adrenergic receptors: impaired desensitization in myocardial ischaemia. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, **129** (suppl. 2): S15-S24, 1988.
- TRAPANI, A. J., BARON, K. W., BRODY, H. J. Analysis of hemodynamic variability after sinoaortic denervation in the conscious rat. **Am. J. Physiol.**, **251**: R1163-R1169, 1986.
- TRENDELENBURG, U. Extraneuronal uptake and metabolism of catecholamines as a site of loss. **Life Sci.**, **22**: 1217-1222, 1978.
- TRENDELENBURG, U. A kinetic analysis of the extraneuronal uptake and metabolism of catecholamines. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, **87**: 33-115, 1980.
- TRENDELENBURG, U. Metabolizing systems. In: **Neuronal and Extraneuronal Events in Autonomic Pharmacology**. Ed. by W. W. Fleming, K-F Graefe, S. Z. Langer e N. Weiner, pp 93-109, Raven Press, New York, 1984.
- TRENDELENBURG, U. The interaction of transport mechanisms and intracellular enzymes in metabolizing systems. **J. Neural Transm.**, [suppl] **32**: 3-18, 1990.

- TRENDELENBURG, U. Functional aspects of the neuronal uptake of noradrenaline. **Trends Pharmacol. Sci.**, **12**: 334-337, 1991.
- UNGERER, M., PARRUTI, G., BOHM, M., PUZICHA, M. e DeBLASI, A. Expression of β -arrestin and β -adrenergic receptor kinases in the failing human heart. **Circ. Res.**, **74**: 206-213, 1994.
- 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.**, *in press*.
- 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.**, **143**: 229-330, 1963.
- VASQUEZ, E. C., KRIEGER, E. M. Sequence of tachycardia following baroreceptor denervation in the rat. In: **Arterial Baroreceptors and Hypertension**, pp 413-417, Oxford University Press, Oxford., 1980.
- VASQUEZ, E. C., KRIEGER, E. M. Decreased chronotropic responses to adrenergic stimulation following sinoaortic denervation in the rat. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **15**: 377-387, 1982.
- VASSALO, D. V., VASQUEZ, E. C., CABRAL, A. M. Contractile performance of papillary muscles of sinoaortic denervated rats. **Pharmacol. Res. Commun.**, **17**: 1053-1061, 1985.
- VASSALO, D. V., VASQUEZ, E. C., MILL, J. G., CABRAL, A. M. Time-course effects of sinoaortic denervation on contractile state of the rat myocardium. **Am. J. Physiol.**, **261**: H639-H643, 1991.
- WALDO, G. L., NORTHUP, J. K., PERKINS, J. P., HARDEN, T. K. Characterization of an altered membrane form of the β_2 -adrenergic receptor produced during agonist-induced desensitization. **J. Biol. Chem.**, **22**: 13900-13908, 1983.
- YATANI, A, CODINA, J., IMOTO, Y., REEVES, J. P., BIRNBAUMER, L., BROWN, A. M. A G-protein directly regulates mammalian cardiac calcium channels. **Science**, **238**: 1288-1292, 1987.
- YATANI, A., OKABE, K. CODINA, J., BIRNBAUMER, L., BROWN, A. M. Heart rate regulation by G proteins acting on the cardiac pacemaker channel. **Science**, **249**: 1163-1166, 1990.

ABSTRACT

Sino-aortic deafferentation (SAD) disrupts baroreceptor mediated regulation of blood pressure and heart rate. In rats, immediately following SAD, an increase in sympathetic tone occurs. The increased sympathetic tone is characterized by a long lasting labile hypertension and transient tachycardia. The elevated blood pressure may persist for up to one year after SAD. The tachycardia lasts only about two weeks.

This study was performed to determine the effects of SAD on the chronotropic responses to agents acting at right atria β -adrenoceptors. At one, three, seven, fifteen, and thirty days after SAD or sham surgery, right atria were isolated and concentration-response curves for the high efficacy agonists, isoproterenol (ISO) and norepinephrine (NE), were generated. The low efficacy agonist, prenalterol (PREN), was only studied on tissues obtained at seven days after surgery.

The results of studies to determine if SAD produced an alteration in the uptake systems responsible for terminating the actions of catecholamines showed that SAD had no effect on the uptake systems. SAD did cause a three- to four-fold decrease in the potency of ISO and NE without changing their maximal chronotropic responses. The decreased potency was seen at three and seven days after SAD. Tissues obtained at one, fifteen, and thirty days after SAD were not subsensitive to the chronotropic actions of ISO and NE.

The effects of SAD on the density, and sub-type of β -adrenoceptor mediating the chronotropic response, agonist affinity and efficacy were determined in tissues obtained at seven days after SAD or sham surgery. SAD caused a decrease in the potency and maximal response for the low efficacy agonist, PREN. This change in

agonist activity was associated with a decrease in agonist efficacy that occurred in the absence of a change in affinity, and was evidenced throughout a lower sensitivity.

The results of studies with selective β_1 - and β_2 -antagonists showed that a homogenous β_1 -adrenoceptors population mediate the chronotropic response to catecholamines in right atria from naive controls, sham and SAD rats. SAD did not induce the appearance of functional β_2 -adrenoceptors. The results of radioligand binding assays using ^{125}I -cyanopindolol (ICYP) confirmed that and showed that SAD produced a decrease in the maximum number of β -adrenoceptor binding sites with no changes in the affinities of either ^{125}I ICYP or PREN.

It is concluded that SAD induced a decrease in the sensitivity to agents acting at right atrial β -adrenoceptors is due to β_1 -adrenoceptor down-regulation.