

Elisângela Farias Silva



UNICAMP

**Efeito do Estresse sobre a Resposta Lipolítica
às Catecolaminas em Adipócitos de Ratos**

IB/ UNICAMP

1999

Elisângela Farias Silva

Efeito do Estresse sobre a Resposta Lipolítica às Catecolaminas em Adipócitos de Ratos

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
Elisângela Farias Silva
e aprovada pela Comissão Julgadora.
24/02/99 R. C.

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

Orientadora:

Profa. Dra. Regina Célia Spadari-Bratfisch

IB/ UNICAMP

1999



9909438

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	Si38e
	BC/37363
	229/99
	0 ☐ D ☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	24/04/99
N.º CPD	

CM-00122873-9

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Silva, Elisângela Farias

Si38e

Efeito do estresse sobre a resposta lipolitica às catecolaminas em adipócitos de ratos/Elisângela Farias Silva. -- Campinas, SP:[s.n.], 1999.
57f.:ilus.

Orientadora: Regina Célia Spadari-Bratfisch

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

1. Estresse. 2. Lipólise. 3. Adipócitos. I. Spadari-Bratfisch, Regina Célia. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III. Título.

BANCA EXAMINADORA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ORIENTADORA: Profa. Dra. Regina Célia Spadari-Bratfisch

R.C.

MEMBROS TITULARES:

- Prof. Dr. Rui Curi

Rui Curi

- Prof.Dr. Mário José Abdalla Saad

Mário José Abdalla Saad

MEMBRO SUPLENTE:

- Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira

Data: 24/02/99

DEDICO

À minha mãe, Esmeralda, pelos esforços desmedidos em favor dos meus sonhos...

Ao meu pai, José (*in memorian*), sem tempo de ver brotar a semente plantada...

Ao meu padrasto, Admar, por me ensinar a nobreza de ser simples...

À minha irmã, Rosângela, pelo apoio e por me ensinar a ser forte...

Ao meu marido, Roberto, pelo carinho e compreensão...

E, especialmente, ao meu sobrinho e irmão, André Luís (*in memorian*)...saudade.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profa. Dra. Regina Célia Spadari-Bratfisch

Pela orientação, por dedicar seu tempo em favor da minha formação...

Por me dar a mão nos momentos difíceis...

AGRADECIMENTOS

- ◆ A Deus, por minha existência e pela oportunidade de aprender a cada dia.
- ◆ À Profa. Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse, pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade.
- ◆ Ao Dr. Max Lafontan, do INSERM-Toulouse-França, por nos enriquecer com seus conhecimentos.
- ◆ Às amigas Cíntia e Germana, pela amizade que supera o tempo.
- ◆ Aos amigos do laboratório Alexandre, Fernanda, Gustavo, Iraídes, Josiane Marília, Rita, Valéria pelos bons momentos de convivência.
- ◆ Aos professores do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Estadual de Campinas, pelos ensinamentos.
- ◆ Aos funcionários deste Departamento, pelos serviços prestados e pela amizade.
- ◆ À Dra. Denise Vaz de Macedo, do Departamento de Bioquímica, IB e ao Dr. Marco Aurélio De Paoli, do Instituto de Química, pela utilização de seus equipamentos.
- ◆ A todos os colegas do curso de pós-graduação do Departamento de Fisiologia e Biofísica, por tornarem os dias mais alegres.
- ◆ A todos os amigos, que mesmo não sendo citados, participaram direta ou indiretamente na concretização deste trabalho.
- ◆ À FAPESP, pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	03
I. INTRODUÇÃO.....	04
II. CAPÍTULOS.....	08
II.1. Trabalho Submetido à Publicação.....	08
II. 2. Apresentação em Congresso.....	45
III. CONCLUSÕES.....	48
IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta lipolítica a agonistas adrenérgicos em adipócitos epididimais isolados de ratos submetidos a estresse por choque nas patas.

Utilizamos ratos Wistar adultos, com peso de 250 a 350 gramas, submetidos a três sessões de choque nas patas. Cada rato recebeu, durante 30 minutos, 120 choques nas patas (1,0 mA, 1,0 s) em intervalos variáveis de 5 a 25 segundos, em cada sessão. Após a última sessão de choques, os animais foram sacrificados e o pâncreo adiposo epididimal removido e submetido a digestão, para isolamento das células utilizadas no ensaio. Nos adipócitos foram obtidas curvas concentração-efeito, sendo a concentração de glicerol liberado o índice de lipólise (μmol glicerol/ 100 mg lipídeos totais/ 100 min.).

Curvas concentração-efeito à isoprenalina, noradrenalina e ao BRL37344 foram realizadas na presença ou ausência dos antagonistas metoprolol e/ou ICI118,551, seletivos para adrenoceptores. Também foram realizadas curvas concentração-efeito à adrenalina, ao CGP12177, ao salbutamol. O efeito do d-butilil-AMPc também foi avaliado. As curvas foram comparadas por análise de variância, seguida de teste de Fischer, com $p < 0,05$.

Nossos resultados mostraram que:

- Adipócitos isolados de ratos submetidos a três sessões de choque nas patas apresentam aumento na liberação basal de glicerol (controle $0,59 \pm 0,04$; choque $1,00 \pm 0,11$, $p < 0,05$);

- Após três sessões de choque nas patas, ocorreu supersensibilidade à isoprenalina e (pD_2 controle $7,46 \pm 0,11$; choque $8,11 \pm 0,17$, $p < 0,05$) à adrenalina (pD_2 controle $5,78 \pm 0,20$; choque $6,13 \pm 0,18$, $p < 0,05$) e subsensibilidade à noradrenalina (pD_2 controle $6,98 \pm 0,13$; choque $6,41 \pm 0,12$) e ao BRL 37344 (pD_2 controle $8,43 \pm 0,19$; choque $7,54 \pm 0,21$);

- A supersensibilidade à isoprenalina permaneceu em adipócitos de ratos submetidos a estresse por choque nas patas mesmo na presença de 100 nM de

metoprolol, antagonista de β_1 -adrenoceptores que também pode bloquear o subtipo β_3 , porém a subsensibilidade à noradrenalina e ao BRL37344 foi abolida. Entretanto, o ICI118,551, antagonista de adrenoceptores do subtipo β_2 , cancela a supersensibilidade à isoprenalina em adipócitos de ratos estressados.

- Os efeitos lipolíticos máximos da isoprenalina, adrenalina, salbutamol e d-butil-AMPc foram significativamente maiores em adipócitos isolados de ratos submetidos a estresse do que em células adiposas de ratos controle. Não houve alteração significativa nos efeitos máximos da noradrenalina, BRL37344 e CGP12177.

Nossos resultados sugerem que as alterações de sensibilidade às catecolaminas em tecido adiposo branco isolado de ratos submetidos a estresse decorrem de dessensibilização da resposta lipolítica mediada pelos subtipos β_3 e/ou β_1 de adrenoceptores, acompanhada de sensibilização da resposta mediada pelo subtipo β_2 .

ABSTRACT

We analysed the alterations in sensitivity to catecholamines in epididymal adipocytes from rats submitted to footshock stress.

Adult Wistar male rats (200-350 g) were submitted to three footshock sessions. Each rat received during 30 min, 120 electric shocks (1.0 mA, 1,0 sec) at variable intervals of 5 to 25 sec. After the last session, the animals were sacrificed and its epididymal adipose pad was rapidly dissected out. Lipolytic activity was analysed on isolated fat cells obtained according to the method of RODBELL (1964) with minor modifications. Concentration-response curves for agonists were obtained in the presence and the absence of antagonists. Glycerol released in the infranatant medium was taken as index of fat cells lipolysis. Half-maximal effective drug concentration (EC_{50}) values were obtained and expressed as pD_2 values ($-\log EC_{50}$). Data were compared by ANOVA, plus Fischer test or by Student t-test, as $p < 0.05$. Adipocytes from stressed rats showed an increase in basal lipolysis (control 0.59 ± 0.04 ; stress 1.00 ± 0.11), sensitisation of the response to isoprenaline (pD_2 control 7.46 ± 0.11 ; stress 8.11 ± 0.17), adrenaline (pD_2 control 5.78 ± 0.20 ; stress 6.13 ± 0.18), and salbutamol (pD_2 control 5.64 ± 0.28 ; stress 5.92 ± 0.34), and desensitization of the lipolytic response to norepinephrine (pD_2 control 6.98 ± 0.13 ; stress 6.41 ± 0.12), and to BRL37344 (pD_2 control 8.43 ± 0.19 ; stress 7.54 ± 0.21). Maximum responses to isoprenaline (control 1.80 ± 0.18 ; stress 2.24 ± 0.10), epinephrine (control 1.64 ± 0.17 ; stress 2.24 ± 0.14), salbutamol (control 0.65 ± 0.11 ; stress 1.21 ± 0.41), and d-butil-cAMP (control 1.59 ± 0.17 ; stress 2.72 ± 0.25), were significantly enhanced in adipocytes from stressed rats. Supersensitivity to isoprenaline was cancelled by 50 nM ICI118,551 but was not modified by 100 nM metoprolol. However, subsensitivity to norepinephrine and to BRL37344 was cancelled by 100 nM metoprolol. Our results suggest that in epididymal adipocytes from stressed rats there is a desensitization of the response mediated by β_3 -/ β_1 -adrenoceptors together with a sensitization of the response mediated by β_2 -adrenoceptors.

I. INTRODUÇÃO

Para a manutenção da homeostasia, o organismo é dotado de mecanismos neuro-endócrinos que possibilitam interações com o ambiente externo, que é altamente variável. Esses mecanismos foram descritos por SELYE (1956), que os denominou “stress” e desde então vêm sendo intensamente estudados. A reação de stress inclui alterações estruturais e funcionais responsáveis por modificações metabólicas, cardiovasculares e respiratórias, que têm caráter adaptativo e são essenciais à sobrevivência.

As catecolaminas e os glicocorticóides são apontados como sendo os hormônios do estresse (AXELROD, 1984). As catecolaminas exercem sua ação interagindo com sítios de ligação específicos, os adrenoreceptores, que foram identificados e classificados em adrenoreceptores α e β por AHLQUIST (1948). Esses adrenoreceptores foram subdivididos em subtipos 1 e 2 (LANDS, LUDUENA, BUZZO *et al.* 1967a, 1967b.), e posteriormente um terceiro subtipo de β -adrenoreceptores, o β_3 , foi demonstrado em tecido adiposo humano (KOBILKA, DIXON, FRIELLE *et al.*, 1987; FRIELLE, COLLINS, DANIEL *et al.*, 1987; EMORINE, MARULO, DELAVIER-KLUTCHIKO *et al.*, 1987, EMORINE, MARULO, BRIEND-SUTREN *et al.*, 1989), de ratos (MACHIDA, BRUNZOW, SEARLES *et al.*, 1990; GRANNEMAN, LAHNESS & CHAUDHURY, 1991) e de camundongos (NAHMIAS, BLIN, ELALOUF *et al.*, 1991). Recentemente, KAUMANN e colaboradores sugeriram a existência de um novo subtipo de adrenoreceptor, o β_4 . Este, uma vez estimulado, teria a capacidade de mediar cardioestimulação em várias espécies (KAUMANN, 1989; KAUMANN, 1997; KAUMANN & MOLENAAR, 1997).

Os três subtipos de β -adrenoreceptores, β_1 , β_2 e β_3 , apesar da natureza proteica comum, apresentam especificidades estruturais e funcionais (BOWEN, 1992). Essas diferenças são dependentes do tecido onde se encontram, mesmo que no mesmo animal, e do estado funcional orgânico (TAOUI, BERLAN, MONTASTRUC *et al.*, 1987, TAOUI, VALET, ESTAN *et al.*, 1989; MAURIÈGE, GALITZKY, BERLAN *et al.*, 1987; ARNER, KRIEGHOLM, ENGFELDT *et al.*, 1990, ARNER, KRIEGHOLM, WAHRENBERG *et al.*, 1990; ARNER, 1992; LANGIN, PORTILLO, SAULNIER-BLANCHE *et al.*, 1991; LIEFDE, WITZENBURG & VAUQUELIN, 1992; GALITZKY,

LARROWY, BERLAN *et al.*, 1990; GALITZKY, REVERTE, CARPÉNÉ *et al.*, 1993; GALITZKY, REVERTE, PORTILLO *et al.*, 1993; LAFONTAN & BERLAN, 1993). Todos os quatro subtipos de β -adrenoceptores agem estimulando a adenilil ciclase e, conseqüentemente, aumentando a concentração intracelular de AMPc. A interação entre o receptor e a adenilil ciclase é mediada por uma proteína G_s (GILMAN, 1987). Embora a maioria das ações do receptor β_2 -adrenérgico seja mediada por uma G_s , os receptores β -adrenérgicos podem também se acoplar a proteína G_i (ABRAMSON, MARTIN, HUGUES *et al.*, 1988; XIAO & LAKATTA, 1995). Além disso, DAAKA, LUTTRELL & LEFKKOWITZ. (1997) demonstraram que proteínas quinases dependentes de AMPc (PKA), quando ativadas, podem fosforilar o receptor β_2 , favorecendo o seu acoplamento com G_i , o que ativaria proteínas kinases com atividade mitogênica (MAPK). Em adipócitos, a PKA ativada, fosforila a lipase-hormônio-sensível que por sua vez catalisa a lipólise (LANGIN, HOLM & LAFONTAN, 1996).

Os receptores α_2 -adrenérgicos, por outro lado, desencadeiam inibição da adenil ciclase, devido a sua interação com a proteína G inibitória (G_i). Desta forma, após ativação α_2 -adrenérgica, o estado de ativação de PKA diminui (GALITZKY, LAFONTAN, NORDENSTROM *et al.*, 1993; LANGIN, HOLM & LAFONTAN, 1996). Em células adiposas, receptores α_{2A} estimulam a lipogênese, opondo-se ao efeito- β -adrenérgico (LAFONTAN, BARBE, GALITZKY *et al.*, 1997). Os receptores α_1 -adrenérgicos, no entanto, parecem não estar envolvidos diretamente na resposta lipolítica, mas sim na síntese e secreção de lactato. Este, uma vez liberado pelo tecido adiposo, seria utilizado pelo fígado no processo de gliconeogênese (CONSOLI, NURJHAN & GERICH, 1989; FAINTRENIE & GÉLOËN, 1996).

Vários estudos relatam alterações de sensibilidade adrenérgica em tecido cardíaco isolado de animais submetidos a estresse por frio, restrição alimentar, exercício físico, imobilização, natação ou choque nas patas. (U'PRICHARD & KVETNANSKY, 1980; NOMURA, WATANABE, UKEI *et al.*, 1981; CRANDALL, LAI, HUGGINS *et al.*, 1983; BASSANI & DE MORAES, 1987a, 1987b; SPADARI & DE MORAES, 1988). Os

mecanismos envolvidos nessas alterações podem variar de acordo com o tipo de estressor empregado e de fatores intrínsecos, como a espécie e o sexo. No caso de fêmeas, também é dependente das fases do ciclo estral (POLLARD, WHITE, BASSET *et al.*, 1975; RODRIGUES, MARCONDES & SPADARI-BRATFISCH, 1995; MARCONDES, VANDERLEI, LANZA *et al.*, 1996; VANDERLEI, MARCONDES, LANZA *et al.*, 1996).

Os adrenoceptores podem sofrer sensibilização ou dessensibilização induzidas por agentes homólogos e heterólogos (LOHSE, 1993) sendo as catecolaminas e os glicocorticóides os principais envolvidos na regulação destes processos (AXELROD, 1984). Alterações de sensibilidade a agonistas adrenérgicos também foram demonstradas em tecido adiposo de várias espécies animais, em diferentes estados fisiológicos e em situações de estresse (GIUDICELLI, AGLI & LACASA, 1979; BENOVIC, BOUVIER, CARON *et al.*, 1988; BALKIN & SONENBERG, 1981; CARPÉNÉ, GALITZKY, SAULNIER-BLANCHE *et al.*, 1990). Em adipócitos, as alterações de sensibilidade da resposta β -adrenérgica correlacionada aos níveis de glicocorticóides foi demonstrada por SCARPACE (1988). FÈVE, BAUDE & KRIEF (1992) observaram que o controle diferencial, tanto das proteínas adrenoceptoras β_1 e β_2 como dos níveis dos respectivos RNAm, pode ser exercido por glicocorticóides durante o processo de diferenciação do tecido adiposo a partir de células 3T3-F442A. Ainda de acordo com estes autores, os glicocorticóides também promovem “down-regulation” tanto do RNAm de adrenoceptores β_3 como do nível da proteína receptora em adipócitos já diferenciados.

A variação de sensibilidade do tecido adiposo às catecolaminas como consequência de recrutamento diferenciado dos subtipos de adrenoceptores, em várias situações, vêm fornecendo indícios que podem sustentar a idéia de um tipo de sistema de sinalização adrenérgica celular (GRANNEMAN, LAHNERS & CHAUDHURY, 1991, GRANNEMAN, 1992; GRANNEMAN & LAHNERS, 1992; ARNER, 1992; LIEFDE, WITZENBURG & VAUQUELIN, 1992).

As diferenças estruturais identificadas entre os subtipos de adrenoceptores β sugerem a possibilidade de ocorrerem acoplamentos preferenciais de um ou outro com a mesma subunidade α da proteína G, dependendo do estado funcional celular (VALET, MONSTRUC & BERLAN, 1989A; GALITZKY, LARROWY, BERLAN *et al.*, 1990; GALITZKY, REVERTE, PORTILLO *et al.*, 1993). HADRI, FÉVE & PAIRAULT (1996) sugerem que o subtipo β_3 tem maior capacidade que o subtipo β_1 em ativar a adenilil ciclase de células adiposas da linhagem 3T3-F442A. Por outro lado, o subtipo β_2 parece acoplar-se mais fortemente à proteína G (KAUMANN, 1997), além de apresentar atividade constitutiva, a qual não foi detectada nos outros subtipos (MEWES, DUTZ, RAVENS *et al.*, 1993; MILANO, ALLEN, ROCKMAAN *et al.*, 1994; KAUMANN & MOLENAAR, 1997). Vários também são os estudos que correlacionaram as variações de sensibilidade β -adrenérgica à alteração no número de receptores ou no volume celular (CARPÉNÉ, BERLAN & LAFONTAN, 1983; TAOUIS, VALET, ESTAN *et al.* 1989; LONNQVIST, WAHRENBERG, HELLSTRÖM *et al.*, 1992).

Considerando que, durante a reação de estresse, os níveis plasmáticos de catecolaminas e de glicocorticóides estão elevados, que estes hormônios podem desencadear alterações estruturais ou quantitativas nos adrenoceptores presentes nos tecidos e que estas geram alterações de sensibilidade às catecolaminas, neste trabalho analisamos a sensibilidade da resposta lipolítica a agentes adrenérgicos em adipócitos isolados de ratos.

II. CAPÍTULOS

II. 1. Trabalho Submetido à Publicação

Os dados obtidos durante o desenvolvimento desta tese foram organizados no trabalho submetido à publicação em dezembro/1998, para a revista *Journal of Lipid Research*, apresentado a seguir:

FAX TRANSMITTAL SHEET

JOURNAL OF LIPID RESEARCH

Cardiovascular Center - 609 MRC

College of Medicine, University of Iowa, Iowa City, IA 52242

Phone: (319) 353-5764; Fax: (319) 353-5767

E-Mail: jlipidres@uiowa.edu

TO: Dr. R.C. Spadoni-Bratfisch

FAX: ⁵⁵ (319) 289 3124

FROM: Arthur A. Spector, Editor-in-Chief

RE: Manuscript # 990108

TITLE: Stress-Induced...

FIRST AUTHOR: Farias-Silva

DATE: JAN 20 1999

This note confirms receipt of your manuscript submitted to the *Journal of Lipid Research*. Your manuscript is in the review process; I will inform you of the initial decision as soon as possible. In future correspondence, please refer to the manuscript number noted above.

PLEASE NOTE

Your decision will be sent to you automatically by FAX and mail. We will use the FAX number to which this form is transmitted, unless you indicate otherwise. If you do not want the decision sent by FAX, please sign this form (below) and return it by FAX.

I do not want my decision transmitted by FAX.

(Signature)

Thank you.

Stress-Induced Alteration In The Lipolytic Response To β -Adrenoceptor Agonists In Rat White Adipocytes

Elisângela Farias-Silva, Dora Maria Grassi-Kassisse, Valéria Wolf-Nunes, and Regina Célia Spadari-Bratfisch

Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia,
Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP - Brasil.

Author for correspondence: R.C. Spadari-Bratfisch

Depto Fisiologia e Biofísica

Instituto de Biologia - UNICAMP

13081-970 - Campinas - SP

Brasil

Fax number: (019) 289 3124

e-mail: rspabrat@obelix.unicamp.br

Note: This paper is part of the Master Thesis of Elisângela Farias Silva

Short title: Lipolytic response under stress

Abstract We analyzed the sensitivity to β -adrenoceptor agonists in epididymal adipose cells from rats submitted to a stress protocol previously reported to induce alterations in sensitivity to catecholamines in cardiac tissue from rats. Adipocytes from stressed rats showed an increase in basal lipolysis (control: 0.59 ± 0.04 ; stress: 1.00 ± 0.11), sensitization of the response to isoprenaline (pD_2 control: 7.46 ± 0.11 ; stress: 8.11 ± 0.17), adrenaline (pD_2 control: 5.78 ± 0.20 ; stress: 6.13 ± 0.18), and salbutamol (pD_2 control: 5.64 ± 0.28 ; stress: 5.92 ± 0.34), and desensitization of the lipolytic response to norepinephrine (pD_2 control: 6.98 ± 0.13 ; stress: 6.41 ± 0.12), and to BRL37344 (pD_2 control: 8.43 ± 0.19 ; stress: 7.54 ± 0.21). Maximum responses to isoprenaline (control: 1.80 ± 0.18 ; stress: 2.24 ± 0.10), epinephrine (control: 1.64 ± 0.17 ; stress: 2.24 ± 0.14), salbutamol (control: 0.65 ± 0.11 ; stress: 1.21 ± 0.41), and d-butytyl-cAMP (control: 1.59 ± 0.17 ; stress: 2.72 ± 0.25) were significantly enhanced in adipocytes from stressed rats. Supersensitivity to isoprenaline was abolished by 50 nM ICI118,551 but was not modified by 100 nM metoprolol. However, subsensitivity to norepinephrine and to BRL37344 was abolished by 100 nM metoprolol. Our results suggest that in epididymal adipocytes from stressed rats there is a desensitization of the response to adrenoceptor agonists mediated by β_3 -/ β_1 -adrenoceptors together with a sensitization of the response mediated by β_2 -adrenoceptors.

Supplementary key words adrenergic receptors • footshock stress • epididymal adipocytes • sensitivity

It is now well established that at least three β -adrenoceptor subtypes (β_1 -, β_2 -, and β_3 -) coexist in the fat cells of the white adipose tissue of rat (1) or other mammalian species (2, 3). The β -adrenoceptors are positively coupled to adenylyl cyclase (4), so that an increase in cAMP levels causes stimulation of lipolysis following activation of cAMP-dependent protein kinase which phosphorylates the hormone-sensitive lipase (5). The coexistence of three receptor subtypes involved in the same biological effect suggests a complex regulation of adipose tissue responses to endogenous catecholamines during physiological processes involving lipomobilization (6).

The expression and function of each one β -adrenoceptor subtype are independently regulated by homologous and heterologous agents which are able to cause desensitization or sensitization of the response mediated by each of the three adrenoceptor subtypes (7). Catecholamines and glucocorticoids have been reported to play a major role in this regulation process. These same hormones have been considered to be "stress hormones" (8). We have shown before that sensitivity to catecholamines is modified in right atria from footshock stressed rats (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15). The aim of the present study was to investigate if the same stress protocol would induce any alteration in the lipolytic response to adrenoceptor agonists in adipocytes from rat epididymal adipose tissue.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Male Wistar rats (Rattus norvegicus) weighing 200 to 350 g at the beginning of the experiments were used. The animals were housed in standard cages in a temperature controlled room (22°C), with a 12 h light/12 h dark cycle with lights on at 6:30 a.m. Standard laboratory chow and tap water were available *ad libitum*. During the experiments, the animals were cared for in accordance with the principles for the use of animals research and education, following *Statement of Principles*, which have been adopted by the FASEB Board.

Stress protocol

Rats were individually submitted to three daily sessions of unsignaled inescapable footshock. The animals were placed in a plexiglas chamber (26 cm long x 21 cm wide x 26 cm high) provided with a grid floor consisting of stainless-steel rods (0.3 cm in diameter and spaced 1.0 cm apart). During the 30 min footshock sessions, which were held between 7:30 and 11:00 a.m., footshock were delivered by a constant current i.c. source controlled by a microprocessor-based instrument constructed at the Biomedical Engineering Centre of the Universidade Estadual de Campinas. Each rat received 120 foot-shocks. Current intensity was 1.0 mA and duration was 1.0 s at random intervals of 5-25 sec with a mean interval of 15 sec (16). After the end of the first and second footshock sessions, the animals were

returned to their cages. Immediately after the third session, the rats were sacrificed. All stress protocols have been reported to induce modifications in sensitivity to catecholamines in right atria isolated from male rats (9, 10) and female rats at diestrus (17).

Adipocyte preparation and lipolysis measurements

The animals were sacrificed by a blow to the back of the head and bleeding, and epididymal white adipose tissue from male rats was rapidly dissected out. Lipolytic activity was analyzed on isolated fat cells obtained according to the method of Rodbell (18), with minor modifications. Krebs Ringer bicarbonate buffer containing bovine serum albumin (3%) and glucose (6 mM) (KRBA), adjusted to pH 7.4 with 1M NaOH just before use, was utilized. After collagenase treatment (1mg/ml), isolated fat cells were filtered through a nylon mesh, washed three times and the packed cells were to a suitably diluted with KRBA buffer. The cells were incubated in plastic vials (1 ml of incubation medium) with gentle shaking in a water bath, at 37°C, with 10 µl pharmacological agents for 100 min. Pharmacological agents at suitable dilutions were added to the cell suspension just before the beginning of the assay. After incubation, the tubes were placed in an ice bath, and 200 µl aliquots of the infranatant medium were taken for enzymatic determination of glycerol (19), which was used as the index of fatcells lipolysis. Total lipid was evaluated gravimetrically after extraction (20). Dose-response

curves for agonists were constructed from experiments carried out in the presence and absence of the antagonist. Half-maximal effective drug concentration (EC_{50}) values were obtained and expressed as pD_2 values ($-\log$ for EC_{50}).

Drugs and chemicals

ATP, Bovine serum albumin (fraction V,), *Clostridium histolyticum* collagenase type II, epinephrine, glycerol kinase from *Candida micoderma*, glycerol phosphate dehydrogenase type I from rabbit muscle, (-)-isoproterenol, NAD and (-)-norepinephrine from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO); BRL37344, ICI118,551 and salbutamol from Tockris Cookson (St. Louis, MO).

Statistical analysis

Data were analyzed statistically by one-way analysis of variance followed by the Fischer test or by the Student t-test for unpaired samples (21, 22). Differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Lipolytic activity of β -agonists

To investigate the alteration of sensitivity in epididymal adipocytes from stressed rats, the functional effects of different β -adrenoceptor agonists and of d-butyryl-cAMP were examined. Adipocytes from rats submitted to footshock stress showed an increase in basal lipolysis (control: 0.59 ± 0.04 ; stress: 1.00 ± 0.11). The maximal lipolysis stimulated by d-butyryl-cAMP (control: 1.59 ± 0.17 , stress: 2.72 ± 0.25), isoprenaline (control: 1.80 ± 0.18 ; stress: 2.24 ± 0.10), epinephrine (control: 1.64 ± 0.17 ; stress: 2.24 ± 0.14), and salbutamol (control: 0.65 ± 0.11 ; stress: 1.21 ± 0.41) was also enhanced in adipocytes isolated from footshock stressed rats. Maximal lipolysis stimulated by norepinephrine (control: 1.73 ± 0.35 ; stress: 2.32 ± 0.24), BRL37344 (control: 2.19 ± 0.19 ; stress: 1.88 ± 0.20) and CGP12177 (control: 0.69 ± 0.14 ; stress: 0.96 ± 0.29) was not significantly modified after stress (Figure 1).

Table 1 shows the pD_2 values and maximal lipolytic effect of several compounds which stimulate lipolysis in adipocytes from control and footshock stressed rats. In adipocytes from control rats the potency rank for the agonists was BRL37344 > isoprenaline $\geq$ norepinephrine > epinephrine. The maximum responses to these adrenoceptor full agonists were not different from the response to d-butyryl-cAMP. Salbutamol and CGP12177 behaved as partial agonists since the maximum responses they elicited were significantly lower than the maximum response to

isoprenaline or to d-butyryl-cAMP. However, in adipocytes from stressed rats, pD_2 values of isoprenaline and epinephrine were enhanced (4.5 and 2.2 fold, respectively, $p < 0.05$) with a shift to the left in concentration-response curves (Figure 2a, 2c). On the other hand, pD_2 values of norepinephrine and BRL37344 were lower in adipocytes from stressed rats compared to control (3.7 and 7.8 fold, respectively, $p < 0.05$) and the concentration-response curves to both agonists were shifted to the right (Figure 2b, 2d). As a consequence, in adipocytes from stressed rats the order of relative potencies was modified: isoprenaline > BRL37344 > norepinephrine $\geq$ epinephrine. The pD_2 values for the partial agonists CGP12177 and salbutamol were not significantly altered after stress (Table 1, Figure 2d, 2e) although an increase in the maximal response to salbutamol was observed (Table 1, Figure 1).

Effect of β -adrenoceptor antagonists

The sensitivity of adipocytes to isoprenaline was analyzed in the presence of 100 nM metoprolol (a β_1 -adrenoceptor antagonist) or 50 nM ICI118,551 (a β_2 -adrenoceptor antagonist). Basal lipolysis was increased in the presence of metoprolol in adipocytes from control (1.26 ± 0.21) but was not modified in adipocytes from stressed rats (1.16 ± 0.21). The maximal response to isoprenaline was not altered in the presence of any of the β -adrenoceptor antagonists (data not shown).

In adipocytes from control and stressed rats, concentration-response curves to isoprenaline obtained in the presence of metoprolol were significantly shifted to the right (13- and 22-fold, respectively; Figure 3, panels a, b). The sensitivity of adipose cells from stressed rats remained higher than control (Table 2).

ICI118,551 (50 nM) had no significant effect on the concentration-response curve to isoprenaline obtained for adipocytes from control rats (Table 2). However, this β_2 -adrenoceptor antagonist induced a 58-fold shift to the right, at the pD_2 level ($p < 0.05$) in the concentration-response curve to isoprenaline in adipocytes from stressed rats. Moreover, in the presence of ICI118,551, adipocytes from stressed rats were subsensitive to isoprenaline compared to adipocytes from control rats ($p < 0.05$; Table 2; Figure 3, panels c, d).

Metoprolol (100 nM) induced a shift to the right in the concentration-response curve to norepinephrine in adipocytes from control (13-fold at pD_2 level, $p < 0.05$) and stressed rats (4.7-fold at pD_2 , $p < 0.05$) (Figure 4) and a 6.5-fold shift in the concentration-response curve to BRL37344 in adipocytes from control rats ($p < 0.05$; Figure 4b). In the presence of metoprolol, sensitivity to norepinephrine in adipocytes from stressed rats was not different from control ($p < 0.05$).

Figure 5 shows that the concentration-response curve to BRL37344 was shifted to the right about 56-fold, at the pD_2 level ($p < 0.05$) in adipocytes from control rats, whereas in adipocytes from stressed rats which were subsensitive to BRL37344, metoprolol shifted to the right the concentration-response curve by about 6.5-fold

($p < 0.05$). In the presence of 100 nM metoprolol stress-induced sensitivity to BRL37344 was abolished.

TABLE 1. Lipolytic potency and maximal lipolytic responsiveness of adipocytes to different compounds.

Compounds	Control			Stress		
	pD ₂	E _{max}	n	pD ₂	E _{max}	n
BRL 37344	8.43 ± 0.19 ^g	2.19 ± 0.19 ^d	5	7.54 ± 0.21 ^a	1.88 ± 0.20 ^{d,f}	3
isoprenaline	7.46 ± 0.11 ^a	1.80 ± 0.18 ^d	5	8.11 ± 0.17 ^g	2.24 ± 0.10 ^f	3
norepinephrine	6.98 ± 0.13 ^a	1.73 ± 0.35 ^{d,f}	6	6.41 ± 0.12 ^c	2.32 ± 0.24 ^f	3
epinephrine	5.78 ± 0.20 ^b	1.64 ± 0.17 ^d	6	6.13 ± 0.18 ^c	2.24 ± 0.14 ^f	4
CGP 12177	6.30 ± 0.50 ^{b,c}	0.69 ± 0.14 ^e	4	5.93 ± 0.10 ^b	0.96 ± 0.29 ^e	5
salbutamol	5.64 ± 0.28 ^b	0.65 ± 0.11 ^e	3	5.92 ± 0.34 ^{b,c}	1.21 ± 0.41 ^g	3
d-butyryl cAMP		1.59 ± 0.17 ^d	5		2.72 ± 0.25 ^f	3

The values are means ± SEM of the number of experiments (n) performed in duplicate. The potencies of the lipolytic agents were evaluated by their EC₅₀, which corresponds to the concentration of agonists inducing 50% of maximal lipolysis, expressed as pD₂ (- log EC₅₀). E_{max} is the maximal responsiveness minus basal lipolysis (control: 0.59 ± 0.04 and stress: 1.00 ± 0.11) and is expressed as μmol glycerol/100 mg total lipids /100min. Statistical analysis was performed using ANOVA plus Fischer's test; control and stressed groups with the same agonist were compared by Student's t-test. Different letters mean statistically significant differences (p < 0.05).

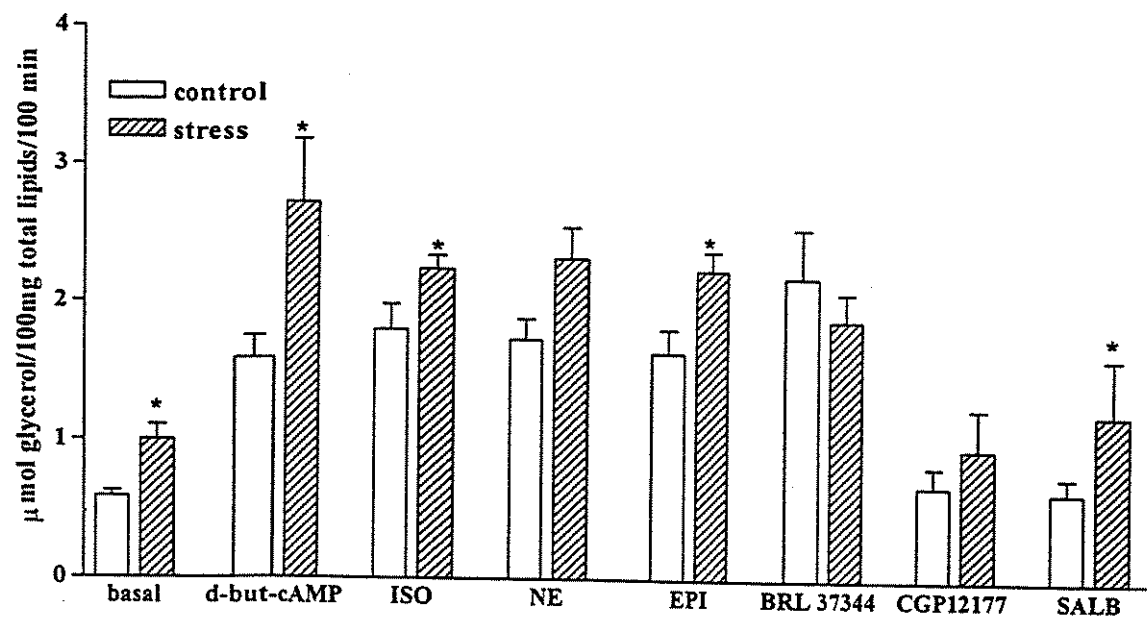
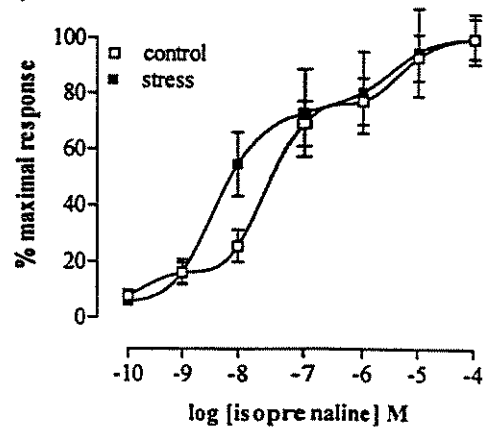
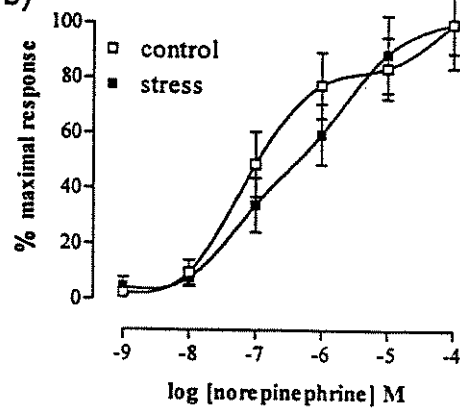


Figure 1. Effects of stress on basal and maximal lipolysis in adipocytes isolated from control rats (white columns) or rats submitted to footshock stress (striped columns) after incubation for 100 minutes with 100 mM isoprenaline (ISO), norepinephrine (NE), epinephrine (EPI), BRL37344, CGP12177, salbutamol (SALB) or 1mM d-butyryl-cAMP (d-but-cAMP). Basal lipolysis was determined in the absence of any agonist. Values are means $\pm$ SEM of experiments performed in duplicate. The numbers of experiments are given in Table 1. Student's t-test was used to compare the values between control and stressed groups. *Significantly different from control, at $p < 0.05$ (Student's t-test).

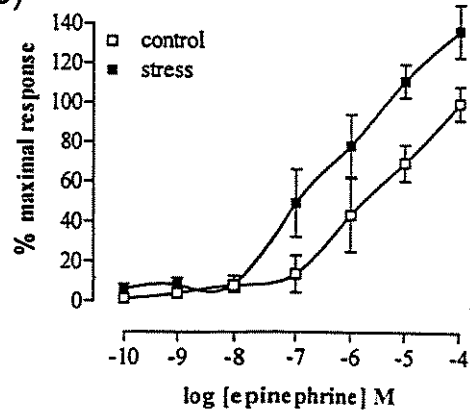
a)



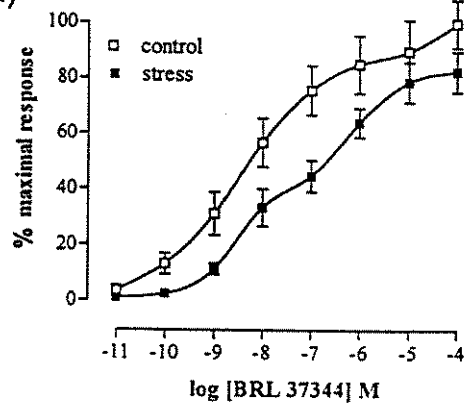
b)



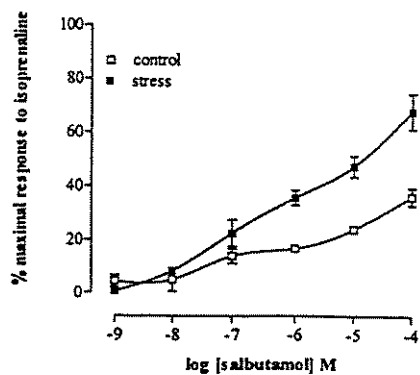
c)



d)



e)



f)

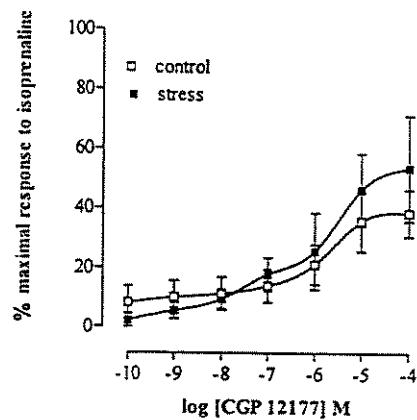


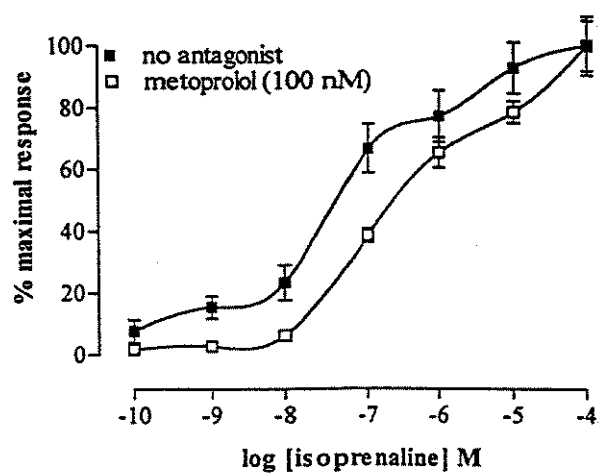
Figure 2. Concentration-response curves for stimulation of glycerol release from white adipocytes of control (□) or footshock stressed rats (■) elicited by isoprenaline (a), norepinephrine (b), epinephrine (c), BRL37344 (d), salbutamol (e) and CGP12177 (f). For isoprenaline, norepinephrine, epinephrine and BRL37344, the values were normalized by assuming the maximal effect of the agonist in the control groups to be 100%; for salbutamol and CGP12177, the values were plotted as percentage of isoprenaline maximal effect in the control group. Data are means and vertical bars represent the SEM. The number of experiments is given in Table 1.

TABLE 2. Comparative antagonistic effects of 100 nM metoprolol and 50 nM ICI118,551 on the response to isoprenaline of rat white adipocytes.

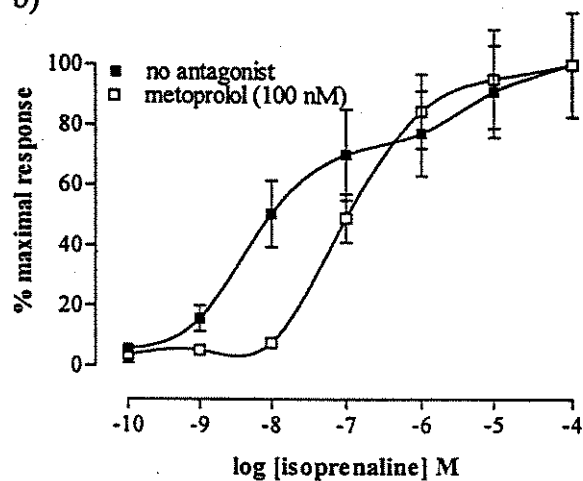
	Control		Stress	
	pD ₂	n	pD ₂	n
Isoprenaline	7.45 ± 0.05 ^a	9	8.23 ± 0.11 ^e	6
isoprenaline + metoprolol	6.33 ± 0.03 ^b	5	6.89 ± 0.16 ^d	5
isoprenaline + ICI 118,551	7.04 ± 0.26 ^{a,d}	4	6.47 ± 0.35 ^{b,d}	5

Values are means ± SEM of the number of experiments (n) performed in duplicate. The potencies of isoprenaline were evaluated by EC₅₀, which is the concentration of the agonist inducing 50% of maximal lipolysis, expressed as pD₂ = -log EC₅₀. Statistical analysis was performed by ANOVA plus Fischer's test. Different letters mean significant differences (p < 0.05).

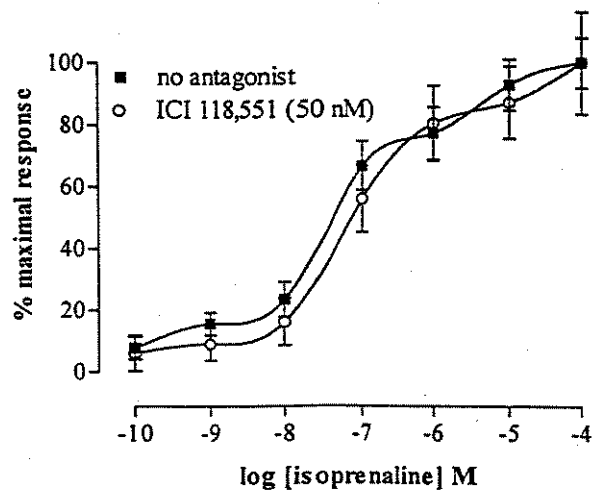
a)



b)



c)



d)

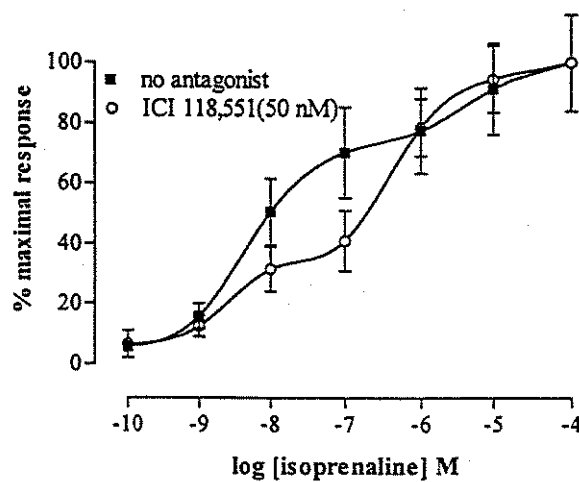
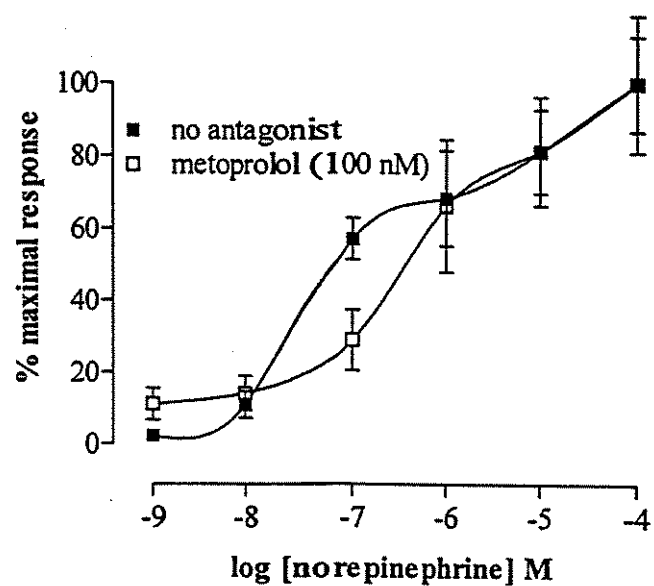


Figure 3. Concentration-response curves for stimulation of glycerol release from white adipocytes isolated from control (a, c) or footshock stressed rats (b, d) elicited by isoprenaline, in the absence (■) or in the presence of 100 nM metoprolol (□) or 50 nM ICI118,551 (O). Values were normalized by assuming the maximal effect of isoprenaline in each group to be 100%. Vertical bars represent the SEM. The number of experiments is given in Table 2.

a) control



b) stress

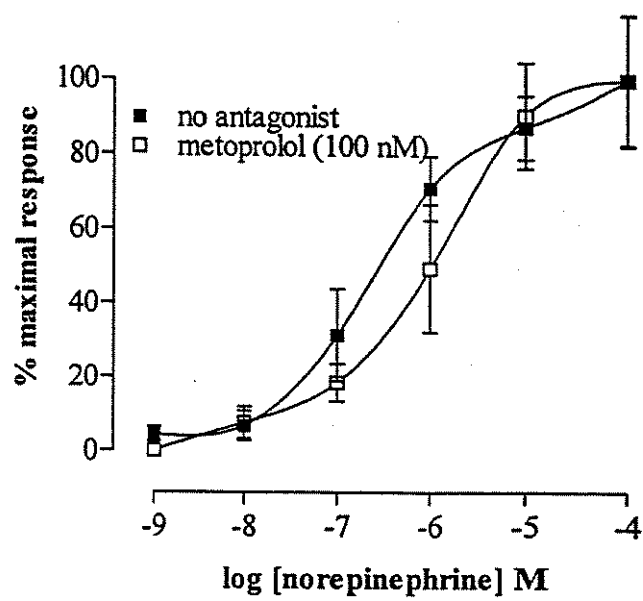


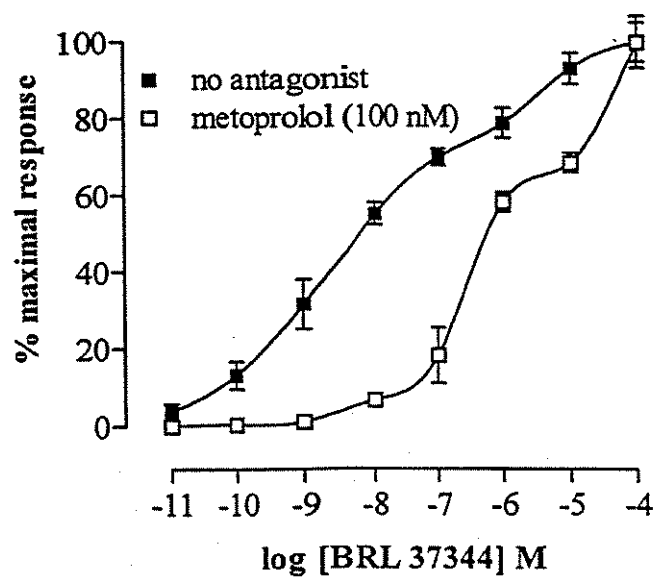
Figure 4. Concentration-response curves for stimulation of glycerol release from white adipocytes isolated from control (a) or footshock stressed rats (b) elicited by norepinephrine, in the absence (■) or in the presence of 100 nM metoprolol (□). Values were normalized by assuming the maximal effect of the isoprenaline in each group to be 100%. Vertical bars represent the SEM. The number of experiments is given in Table 3.

TABLE 4. Antagonism of the lipolytic effect of BRL 37344 by 100 nM metoprolol in the white adipocytes from rats.

	Control		Stress	
	pD ₂	n	pD ₂	n
BRL 37344	8.29 ± 0.25 ^a	6	7.01 ± 0.30 ^c	6
BRL 37344 + metoprolol	6.54 ± 0.34 ^{b, c}	4	6.20 ± 0.26 ^b	3

Values are means ± SEM of the number of experiments (n) performed in duplicate. The potencies of BRL37344 was evaluated by EC₅₀, which is the concentration of the agonist inducing 50% of maximal lipolysis, expressed as pD₂ = - log EC₅₀. Statistical analysis was performed by ANOVA test plus Fischer's test. Different letters mean significant differences (p < 0.05).

a) control



b) stress

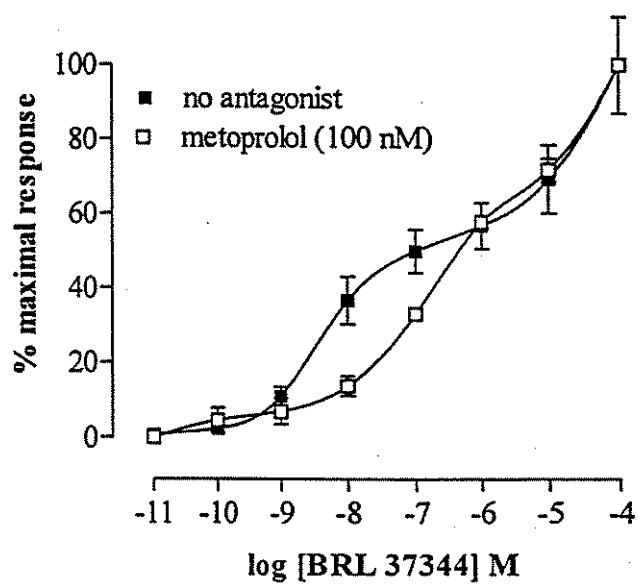


Figure 5. Concentration-response curves for stimulation of glycerol release from white adipocytes isolated from control (a) or footshock stressed rats (b) elicited by BRL37344, in the absence (■) or in the presence of 100 nM metoprolol (□). Values were normalized by assuming the maximal effect of the isoprenaline in each group to be 100%. Vertical bars represent the SEM. The number of experiments is given in Table 4.

DISCUSSION

Authors agree that in rat white adipocytes the β_2 -subtype represents a very small population of β -adrenoceptors and that under physiological conditions the β_2 -subtype is probably not implicated in the stimulation of lipolysis. The overall lipolysis is essentially dependent of β_1 - and β_3 - receptors and mainly driven by the β_3 -subtype. Germack *et al.* (23) proposed the following rank order of expression and capacity to induce lipolysis as $\beta_3 \gg \beta_1 > \beta_2$.

In the present study, the functional stimulation of lipolysis in adipocytes from control rats exhibited a rank order of agonist potencies (BRL 37344 $\gg$ isoprenaline $\geq$ norepinephrine $>$ epinephrine) which is in accordance with that previously described for rat and garden dormouse white adipocytes (23, 24). However, adipocytes from footshock stressed rats present an increased sensitivity and maximum response to isoprenaline and epinephrine, together with subsensitivity to norepinephrine and BRL37344. Moreover, we have observed an increase in the maximal lipolytic effect stimulated by salbutamol but no alteration of the response to CGP12177. As a consequence, in adipocytes from stressed rats the rank order of agonist potencies was modified as follows: isoprenaline $>$ BRL37344 $>$ norepinephrine $\geq$ epinephrine.

Considering that isoprenaline and epinephrine do not discriminate between β_1 -, β_2 - and β_3 -adrenoceptors (25) and norepinephrine exhibit low affinity for the β_2 -

subtype, while BRL37344 preferentially activates β_3 -adrenoceptors, but might also activate β_1 -adrenoceptors at high concentrations (26), our results seems to indicate that in adipocytes from stressed rats there is an enhancement of the role played by β_2 -adrenoceptors in mediating the lipolytic effect of catecholamines whereas the response mediated by β_3 - and/or β_1 -adrenoceptor subtypes is desensitized.

Additional support for our hypothesis comes from the effect of antagonists on the responses to the agonists. Metoprolol, a β_1 -adrenoceptor antagonist which also blocks β_3 -adrenoceptors (27), shifted to the right the concentration-response curves to isoprenaline, norepinephrine and BRL37344 in adipocytes from control and stressed rats. In the presence of metoprolol, adipocytes from stressed rats remained supersensitive to isoprenaline but the subsensitivity to norepinephrine and BRL37344 was abolished. ICI118,551, a selective β_2 -adrenoceptor antagonist at the concentration used here (28), did not induce any shift in the concentration-response curves to isoprenaline in adipocytes from control rats, which is in agreement with the minor role, if any, of the β_2 -adrenoceptor subtype in these cells. However, in adipose cells from stressed rats, the decrease in isoprenaline potency induced by ICI118,551 abolished the supersensitivity to the agonist. The concentration-response curve to isoprenaline in the presence of ICI118,551 was clearly biphasic with the blocking effect of the antagonist occurring at agonist concentrations varying between 10 nM and 1 μ M. In the same tissue, there was an increase in the maximum response to salbutamol, a partial agonist with an affinity

for the β_2 -subtype around 50-fold higher than for β_3 - and 15-fold higher than for the β_1 -adrenoceptor subtype (28), indicating that the supersensitivity to isoprenaline might be due to an increase in β_2 -adrenoceptor number.

Although we have not investigated the mechanisms underlying these stress-induced alterations in sensitivity to β -adrenoceptor agonists, our results suggest that in adipocytes from stressed rats there is a desensitization of the response mediated by β_3/β_1 -adrenoceptors together with a sensitization of the response mediated by β_2 -adrenoceptors. Similar results have been obtained for cardiac tissue from rats submitted to the same stressor agent (17,29).

Desensitisation of the response to β -adrenergic agonists has been previously shown in rat adipocytes after chronic norepinephrine infusion (30, 31) or infusion of a β_3 -agonist, CL 316 243 (32). Unelius *et al.* (33) demonstrated that prolonged exposure of hamsters to cold leads to desensitization of β_3 -adrenoceptors in brown adipocytes. Down-regulation of the β_3 -adrenoceptor subtype has been shown upon exposure of adipose cells to glucocorticoids (34) and it has been proposed that glucocorticoids exert a differential regulation of the β -adrenoceptors in 3T3-F442A cells at a transcriptional level: while these compounds enhance β_2 -adrenoceptor expression, they strongly repress expression of β_1 - and β_3 -adrenoceptors (34, 35, 28).

Right atria isolated from rats submitted to three sessions of footshock stress, present supersensitivity to isoprenaline and epinephrine, as well as subsensitivity

to norepinephrine (10) and a 2-fold increase in the serum corticosterone level (unpublished data). If the increase in serum corticosterone level is prevented by adrenalectomy or by animal treatment with metirapone, stress-induced alterations in cardiac sensitivity to catecholamines are not observed (14). Moreover, treatment of animals with RU38486, an antagonist of glucocorticoid receptors, also prevented the effects of stress on sensitivity to catecholamines in right atria from footshock stressed rats (11).

The results presented here suggest that the stress-induced alterations in sensitivity of tissues to catecholamines are similar in cardiac and in adipose tissue and that a decrease in the β_3/β_1 -adrenoceptor mediated response might be accompanied by an increase in β_2 -adrenoceptor mediated response. If the switch in the β -adrenoceptor subtype mediating the effect of catecholamines on adipocytes is towards a β_2 -subtype, this leads to a corresponding switch in the role played by noradrenaline, the sympathetic neurotransmitter, and adrenaline, the adrenal gland medullary hormone, in the control of lipolysis and might be related to the pathophysiological conditions of adipose tissue associated with stress.

This study was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo). We are indebted to Dr. Max Lafontan for helpful discussions.

REFERENCES

1. Hollenga, C. H. & J. Zaasgma. 1989. Direct evidence for the atypical nature of functional beta-adrenoceptor in rat adipocytes. *Br.J. Pharmacol.* 98: 1420-1424.
2. Langin, D.; M. Portillo, J.-S. Saulnier-Blanche & M. Lafontan. 1991. Coexistence of three beta-adrenergic receptor subtypes in white fat cells of various mammalian species. *Eur. J. Pharmacol.* 199: 191-301.
3. Carpené, C., I. Castan, P. Collon, J. Galitzky, J. Moratinos and M. Lafontan. 1994. Adrenergic lipolysis in guinea pig is not a β_3 -adrenergic response: comparison with human adipocytes. *Am. J. Physiol.* 266: R905-R913.
4. Gilman, A. G. 1987. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 615-649.
5. Langin, D., C. Holm and M. Lafontan. 1996. Adipocyte hormone-sensitive lipase: a major regulator of lipid metabolism. *Proc.Nutr. Soc.* 55: 93-109.
6. Lafontan, M. and M. Berlan. 1993. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J. Lipid. Res.* 34: 1057-1091.

7. Lohse, M. J. Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. 1993. *Biochem. Biophys. Acta.* **1179**: 171-188.
8. Axelrod, J and T. D. Reisine. 1984. Stress hormones: their interaction and regulation. *Science.* **224**: 452-459.
9. Bassani, R.A. and S. De Moraes. 1987. Subsensitivity of β -adrenoceptor agonists in right atria isolated from foot-shock-stressed rats. *Gen. Pharmacol.* **18**: 473-477.
10. Bassani, R.A. and S. De Moraes. 1988. Effects of repeated foot-shock stress on the chronotropic responsiveness of the isolated pacemaker of the rat: role of β_2 -adrenoceptors.. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **246**: 316-320.
11. Nourani, F. R. R., R.C. Spadari and S. De Moraes. 1992. Footshock stress-induced supersensitivity to isoprenaline in the isolated pacemaker of rat: effects of compounds RU-4886 and RU-28362. *Gen. Pharmacol.* **23**: 787-791.
12. Callia, M. L. & S. De Moraes. 1984. Heterogeneity of beta adrenoceptors in right atria isolated from cold-exposed rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **230**: 450-454.

13. Capaz, F. R. and S. De Moraes. 1988. Reduction by acute restraint stress of norepinephrine sensitivity in isolated rat pacemaker. *Eur. J. Pharmacol.* 147: 295-298.
14. Spadari, R. C. and S. De Moraes. 1988. Repeated swimming stress and responsiveness of the isolated rat pacemaker to the chronotropic effects of adrenaline and isoprenaline: role of adrenal corticosteroids. *Gen. Pharmac.* 19: 553-557.
15. Spadari, R. C., R. A. Bassani and S. De Moraes. 1988. Supersensitivity to isoprenaline and epinephrine in right atria isolated from rats submitted to a single swimming session. *Gen. Pharmac.* 19: 129-135.
16. Hoffman, J. S. and M. Flesher. 1962. A relay sequence device for scrambling grid shock. *J. Exp. Anim. Behav.* 55: 329-330.
17. Vanderlei, L.C. M., F. K. Marcondes, L. L. B. Lanza and R. C. Spadari-Bratfisch. 1996. Influence of the estrous cycle on the sensitivity to catecholamines in rat atria from rats submitted to footshock stress. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74: 670-678.

18. Rodbell, M. 1964. Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.* 239: 375-380.
19. Wieland, O. 1957. Eine enzymatische Methode zur Bestimmung von Glycerin. *Biochemische Zeitschrift.* 329: 313-319.
20. Dole, V. P. and H. Meinertz. 1960. Microdetermination of long-chain fatty cells in plasma and tissues. *J. Biol. Chem.* 235: 2595-2599.
21. Zar, J. H. 1984. Biostatistical Analysis. 2nd ed. Hall International, N. J, USA.
22. Snedecor, G. W. and W. G. Cochran. 1967. Statistical Methods, 6th ed. Iowa State University Press, Ames, IA. 342-343.
23. Germack, R., A. B. Starzec, R. Vassy and G. Y. Perret. 1997. β -Adrenoceptor subtype expression and function in rat white adipocytes. *Br. J. Pharmacol.* 120: 201-210.
24. Carpéné, C., L. Ambid and M. Lafontan. 1994. Predominance of β_3 -adrenergic component in catecholamine activation of lipolysis in garden dormouse adipocytes. *Am. J. Physiol.* 266: R896-R904.

25. Blin, N., L. Camoin, B. Maigret and A. D. Strosberg. 1993. Structural and conformational features determining selective signal transduction in the β_3 -adrenergic receptor. *Mol. Pharmacol.* 44: 1094-1104.
26. Arch, J. R. S. and S. Wilson. β_3 -adrenoceptors and the regulation of metabolism in adipose tissue. 1996. *Biochem. Soc. Trans.* 24: 412-418.
27. Van Liefde, I., A. Van Witzenburg and G. Vauquelin. 1992. Multiple beta adrenergic receptor mediated in the I-isoproterenol-induced lipolytic response in rat adipocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 262: 552-558.
28. Strosberg, A. D. and F. Pietri-Rouxel. 1996. Function and regulation of the β_3 -adrenoceptor. *TIPS* 17: 373-381.
29. Marcondes, F. K., L. C. M. Vanderlei, L. L. B. Lanza and R. C. Spadari-Bratfisch. 1996. Stress-induced subsensitivity to catecholamines depends on the estrous-cycle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74: 7-13.
30. Hadcock, J. R., Wang, H-Y and C. C. Malbon. 1989. Agonist-induced destabilization of β -adrenergic receptor mRNA. *J. Biol. Chem.* 264: 19928-19933.

31. Granneman, J. g. and K. N. Lahners. 1992. Differential adrenergic regulation of β_1 -and β_3 -adrenoceptor messenger ribonucleic acids in adipose tissues. *Endocrinology*. **130**: 109-114.
32. Atgié, C., Faintrenie, G., Carpéné, C., Bukowiecki, L. J. and A. Gélœn. 1998. Effects of chronic treatment with noradrenaline or a specific β_3 -adrenergic agonist, CL 316 243, on energy expenditure and epididymal adipocyte lipolytic activity in rat. *Comp. Biochem. Physiol.* **119A**: 629-636.
33. Unelius, L., G. Bronnikov, N. Mohell and J. Nedergaard. 1993. Physiological desensitization of β_3 -adrenergic responses in brown fat cells: involvement of a postreceptor process. *Am. J. Physiol.* **265**: C1340-C1348.
34. Fève, B., B. Baude, S. Krief, A. D. Strosberg, J. Pairault and L. J. Emorine. 1992. Inhibition by dexamethasone of β_3 -adrenergic receptor 3T3-F442A adipocytes. *J. Biol. Chem.* **267**: 15909-15915.
35. Fève, B., L. J. Emorine, M. M. Briend-Sutren, F. Lasnier, A. D. Strosberg and J. Pairault. 1990. *J. Biol. Chem.* **265**: 16343-16349.

II. 2. Apresentação em Congresso

FeSBE

26 a 29 de agosto / Caxambu - MG

98

XIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental

XXIII Congresso Brasileiro de Biofísica
XXX Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental
XXXIII Congresso Brasileiro de Fisiologia
XIV Congresso Brasileiro de Investigação Clínica
XXII Congresso Brasileiro de Neurociências e Comportamento

Participação

Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular
Sociedade Brasileira de Imunologia

08.084

EFEITO DO ESTRESSE CRÔNICO DE IMOBILIZAÇÃO SOBRE AS FUNÇÕES REPRODUTIVAS DO RATO MACHO ADULTO. Almeida, S.A.**, Franci, J.A.A., Lamano Carvalho, T.L. Laboratório de Patologia, FORP-USP, SP.

O estresse crônico de imobilização retarda a instalação da puberdade de ratos machos (FESBE, res. 08.083, p. 260, 1997).

Objetivo: O objetivo do presente trabalho foi investigar se a imobilização crônica, aplicada a partir da pré-puberdade, altera as funções reprodutivas de ratos machos adultos.

Métodos: Ratos machos Wistar pré-púberes foram imobilizados por 65 dias (6h/dia) para análise da produção de espermátides maduras (histometria), da concentração de espermatozoides armazenados na cauda do epidídimo (Braz. J. Med. Biol. Res. 20, 429, 1987) e das concentrações plasmáticas dos hormônios luteinizante (LH), folículo estimulante (FSH), testosterona (T), prolactina (Prl) e corticosterona (CRT), por radioimunensaio de duplo-anticorpo.

Resultados: O estresse provocou diminuição na produção de espermátides, na concentração de espermatozoides e nas concentrações plasmáticas de T e LH, enquanto a Prl e Cortico aumentaram significativamente (tabela abaixo).

	Controle (10)	Estresse (7)
Espermatozoides (n/ml x 10 ⁶)	208,3 ± 9,9	140,7 ± 11,1*
Espermátides (n/seção)	124,4 ± 1,3	104,9 ± 2,3*
T no Plasma (ng/ml)	2,52 ± 0,28	1,83 ± 0,30*
LH no Plasma (ng/ml)	5,19 ± 1,93	3,70 ± 0,40*
FSH no Plasma (ng/ml)	14,1 ± 0,6	12,4 ± 0,3
Prl no Plasma (ng/ml)	19,0 ± 2,3	28,1 ± 4,0*
CRT no Plasma (ng/ml)	59,8 ± 19,4	231,9 ± 43,9*

Conclusão: O estresse de imobilização, aplicado a partir da pré-puberdade, inibe as funções androgênicas e espermatogênicas em ratos adultos.

Apoio Financeiro: CNPq (520128/96) e FAPESP (97/2498-1)

08.085

EFEITO DO ESTRESSE CRÔNICO INTERMITENTE DE IMOBILIZAÇÃO SOBRE A FERTILIDADE DE RATOS MACHOS. Almeida, S.A.**, Kempinas, W.G., Lamano Carvalho, T.L. Lab. Patologia, FORP-USP; Dep. Morfologia, IB-UNESP, SP.

Uma diversidade de fatores ambientais estressantes interfere com a saúde humana e animal, podendo afetar as funções reprodutoras masculinas e o comportamento sexual (FESBE, resumo 01.382, p. 315, 1997).

Objetivo: O objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito do estresse crônico de imobilização sobre a fertilidade de ratos machos.

Métodos: Ratos machos (variedade Wistar) foram imobilizados durante 6h diárias, por um período de 65 dias, a partir da pré-puberdade. Para análise da fertilidade, ratos controles e estressados foram acasalados com fêmeas normais nulíparas. No 20º dia de prenhez foi realizada laparotomia e registrou-se a presença e o número de corpos lúteos (CL), de sítios de implantação (SI), de perdas pré-implantação (PRE), de perdas pós-implantação (POS) e de fetos machos e fêmeas.

Resultados: As fêmeas acasaladas com ratos estressados apresentaram aumento de 81% no número de perdas pré-implantação e aumento de 61% nas perdas pós-implantação (vide tabela abaixo).

NÚMERO TOTAL NO GRUPO	CL	SI	PRÉ	POS	Macho	Fêmea
Controle (14)	159	150	9	7	64	65
Estresse (14)	211	163	48*	18*	56*	76*

* Tratado 1 Estresse, teste de Mann-Whitney ($\alpha = 0,05$)

Conclusão: O estresse crônico de imobilização provocou diminuição da fertilidade masculina talvez devido a alterações morfofuncionais dos espermatozoides, não permitindo a implantação e/ou o desenvolvimento embrionário adequado.

Apoio Financeiro: CNPq (520128/96) e FAPESP (97/2491-1)

08.086

EFEITOS DA AMLODIPINA EM PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE RATOS MACHOS. Almeida, S.A.**, Teófilo, J.M.**, Brentegani, L.G., Franci, J.A.A., Lamano Carvalho, T.L. Lab. Patologia, Faculdade Odontologia de Ribeirão Preto - USP, SP.

Objetivos: O objetivo do presente trabalho foi investigar se o tratamento de ratos machos com amlodipina, um antagonista de cálcio de segunda geração utilizado no tratamento da hipertensão e angina, interfere com a função reprodutora.

Métodos: Ratos machos Wistar (170g p.c.) receberam doses diárias (0,04 mg/rato durante 30 dias, n=12) de besilato de amlodipina (Norvasc, Pfizer), por intubação gástrica; ratos controles (n=12) receberam água de torneira. Ao sacrifício o plasma foi colhido para dosagem dos hormônios luteinizante (LH), folículo estimulante (FSH), prolactina (Prl) e testosterona, por radioimunensaio de duplo-anticorpo. No sêmen colhido da cauda do epidídimo foi medida a concentração de espermatozoides.

Resultados: O tratamento (compatível com a terapêutica em humanos) provocou diminuição nas concentrações de FSH (17%) e testosterona (35%); os níveis de LH apresentaram tendência à diminuição sem significância estatística e os níveis de Prl não se alteraram (vide tabela abaixo). A concentração epididimária de espermatozoides foi 23% menor nos ratos tratados ($81,2 \pm 7,5 \times 10^6/\text{ml}$) que nos controles ($105,7 \pm 7,9 \times 10^6/\text{ml}$).

	Concentração Plasmática (ng/ml)			
Grupos	LH	Prl	FSH	Testosterona
Controle	5,3 ± 0,8	19,5 ± 5,2	15,9 ± 0,9	42,2 ± 4,5
Tratado	3,9 ± 0,9	24,2 ± 4,6	13,2 ± 0,6*	27,1 ± 3,7*

* Tratado 1 Controle, teste de Mann-Whitney ($\alpha = 0,05$)

Conclusão: O tratamento de ratos machos com amlodipina tem efeito adverso sobre a secreção de FSH e testosterona (hormônios responsáveis pela manutenção do processo espermatogênico), provocando diminuição significante na concentração epididimária de espermatozoides.

Apoio Financeiro: FAPESP (Reserva Técnica 97/07619-1)

08.087

EFEITO DO ESTRESSE SOBRE A SENSIBILIDADE DA RESPOSTA LIPOLÍTICA ÀS CATECOLAMINAS. Farias Silva, E., Grassi-Kassisse, D.M., Spadari-Bratfisch, R.C., Depto. Fisiologia e Biofísica, IB/UNICAMP 13063-970 Campinas, SP.

Objetivos: Nós avaliamos a resposta lipolítica a agonistas de adrenoceptores- β em adipócitos isolados (ADP) de ratos submetidos a estresse.

Métodos e Resultados: Utilizamos ratos Wistar machos, adultos, controles (CO) ou submetidos a três (CH3) ou cinco (CH5) sessões de choque nas patas (1,0mA, 1s, a intervalos de 5-25s, 30 min), em dias consecutivos. Após a última sessão, os animais foram sacrificados, o tecido adiposo epididimário removido. Nos ADP, foram obtidas curvas concentração-efeito (CEE) para noradrenalina (NA) e isoprenalina (ISO) na ausência e presença de metoprolol (METO), sendo a concentração de glicerol liberado o índice de lipólise. Ocorreu aumento de eficácia (α , $\mu\text{mol glicerol}/100\text{mg}$ lipídeos totais/100min) e de pD_2 da ISO em ADP de ratos CH3 e CH5 (α CO: $3,36 \pm 0,10$, CH3: $4,22 \pm 0,47$, CH5: $3,81 \pm 0,17$; pD_2 CO: $7,46 \pm 0,12$, CH3: $7,96 \pm 0,13$, CH5: $7,97 \pm 0,07$). METO diminuiu a α_{50} em ADP de ratos CH5 e deslocou à direita as CEE à ISO de modo dose-dependente nos três grupos. O pD_2 da NA não foi alterado em ADP de ratos submetidos a CH3, mas aumentou para CH5 (pD_2 CO: $7,05 \pm 0,10$, CH3: $6,72 \pm 0,24$, CH5: $7,36 \pm 0,06$) e α aumentou para ambos os grupos (α CO: $3,01 \pm 0,35$, CH3: $4,14 \pm 0,27$, CH5: $4,16 \pm 0,20$). METO promoveu diminuição de α à NA em ADP de ratos CO e CH e deslocamento à direita das CEE à NA.

Conclusões: Estes resultados sugerem uma maior participação do subtipo β_1 -AR em animais submetidos a CH 3X, mas não a CH 5X.

Apoio Financeiro: FAPESP

08.088

EFEITO DA INIBINA SOBRE A SECREÇÃO IN VITRO DE TSH EM RATOS JOVENS E VELHOS DE AMBOS OS SEXOS. Borges, P.P***, Curty, FH***, Pazos-Moura, CC*, Moura, EG*, Lab. Fisiologia Endócrina, IB, UERJ, 7 Lab. Fisiologia Endócrina, IBCCF, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ.

Objetivo: Estudar o efeito da inibina sobre a secreção de TSH em ratos jovens e velhos de ambos os sexos.

Métodos e Resultados: Utilizamos ratos wistar machos, jovens (4 meses) e velhos (15 meses), e fêmeas, jovens (4 meses) e velhas (17-18 meses). As hemiadenohipófises foram, individualmente, incubadas em 1ml de meio 199 contendo ou não inibina $1\mu\text{M}$. Aliquotas do meio, foram coletadas após 60 e 90 min, para dosagem de TSH. Ao final da incubação, as glândulas foram pesadas e homogeneizadas para dosagem do TSH. Nas ratas jovens, a secreção de TSH aumentou 70% após 60 min de incubação com inibina ($p < 0,05$); este efeito não se manteve após 90 min. O TSH intraglandular foi 48% menor nas hipófises de ratas jovens incubadas com inibina ($p < 0,01$), o que é coerente com o aumento da secreção de TSH. A secreção de TSH de ratas velhas foi 100% maior que nas jovens ($p < 0,001$). Ao contrário do visto em ratas jovens, a inibina teve efeito inibitório sobre a secreção de TSH, que apenas foi significativa aos 90 min de incubação (47% menor, $p < 0,05$). O conteúdo intra-hipofisário de TSH também estava diminuído nestas ratas (49%, $p < 0,01$), sugerindo que a inibina esteja modulando a síntese de TSH. Em machos, não observamos nenhuma alteração significativa de TSH após inibina, sugerindo que o efeito da inibina seja dependente do sexo.

Conclusão: Em ratas, o efeito da inibina sobre a secreção in vitro de TSH parece ser dependente da idade. Além disso, este efeito parece também ser dependente do sexo, sugerindo um efeito modulador dos hormônios sexuais femininos.

Auxílio Financeiro: CAPES, SR2-UERJ.

08.089

ANÁLISE BIOMECÂNICA DO TECIDO ÓSSEO DE RATOS ORQUIECTOMIZADOS TRATADOS COM TIROXINA. Martins EF* e Nonaka KO - DCF/UFSCar - São Carlos - SP.

Objetivos: Analisar parâmetros biomecânicos do fêmur de ratos castrados tratados com tiroxina, pois a literatura relata que a deficiência de andrógenos e a tireotoxicose podem levar a um quadro de osteopenia em humanos.

Material e Métodos: Ratos Wistar com peso corporal inicial de 350-390g, mantidos intactos ou castrados no dia anterior ao início do tratamento com tiroxina (T4-25ug/kg, sc) ou veículo de T4 (0,1 ml/100g, sc). O tratamento foi realizado durante 8 semanas, 6 dias/semana. Foi realizado o teste de flexão de 3 pontos para determinar a força máxima para fratura do fêmur. A força máxima normalizada, que é a força máxima dividida por densidade mineral, indica a qualidade do tecido ósseo.

Resultados: expressos em médias $\pm$ EPM.

	intacto (2)	castrado-T4 (6)	castrado-VE (8)	castrado-T4 (10)
T4 (ug/kg)	2,65 $\pm$ 0,15	4,93 $\pm$ 0,28*	3,83 $\pm$ 0,29	6,54 $\pm$ 0,40*
TSH (ng/ml)	8,04 $\pm$ 1,19	2,32 $\pm$ 0,31	5,13 $\pm$ 0,45	3,21 $\pm$ 0,79
Força (mg)	0,43 $\pm$ 0,02	0,42 $\pm$ 0,027	0,45 $\pm$ 0,004	0,42 $\pm$ 0,012
Volúmen (mm ³)	0,54 $\pm$ 0,02	0,47 $\pm$ 0,02*	0,45 $\pm$ 0,016	0,56 $\pm$ 0,03*
Força (N)	131,43 $\pm$ 4,67	129,30 $\pm$ 6,42	116,67 $\pm$ 1,61**	116,87 $\pm$ 3,49
Força Norm.	0,17 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,005**	0,16 $\pm$ 0,003

* $p < 0,002$ vs tratado com veículo; # $p < 0,06$ vs intacto+veículo; # $p < 0,006$ vs tratado com veículo; ** $p < 0,03$ vs intacto+veículo; Δ $p < 0,03$ vs tratado com veículo Δ + $p < 0,006$ vs intacto+veículo

Discussão: A castração provocou uma redução da resistência óssea avaliada pela força máxima de fratura, enquanto a tireotoxicose não a modifica. Tal efeito osteopênico da castração pode ser detectado pela força máxima normalizada. A qualidade do tecido ósseo é melhor nos ratos castrados tratados com T4, indicando que a dose de tiroxina utilizada provocou um provável efeito anabólico. Tal dose de T4 foi sufi-

III. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que:

- Adipócitos isolados de ratos submetidos a três sessões de choque nas patas apresentam aumento na liberação basal de glicerol;
- As respostas lipolíticas máximas à isoprenalina, adrenalina, noradrenalina, salbutamol e d-butyryl-AMPc aumentaram significativamente em adipócitos isolados de ratos submetidos a estresse.
- Após três sessões de choques nas patas ocorreu supersensibilidade à isoprenalina e à adrenalina e subsensibilidade à noradrenalina e ao BRL37344;
- A supersensibilidade à isoprenalina permaneceu em adipócitos de ratos submetidos a estresse por choque nas patas mesmo na presença de metoprolol, antagonista de β_1 -adrenoceptores que também pode bloquear o subtipo β_3 , porém a subsensibilidade à noradrenalina e ao BRL37344 foi abolida;
- O ICI118,551, antagonista de adrenoceptores do subtipo β_2 , cancelou a supersensibilidade à isoprenalina em adipócitos de ratos estressados;

Nossos resultados sugerem que as alterações de sensibilidade às catecolaminas em tecido adiposo branco isolado de ratos submetidos a estresse por três sessões de choque nas patas decorrem de diminuição da resposta lipolítica mediada pelos subtipos β_1 e/ou β_3 de adrenoceptores, acompanhada de aumento do subtipo β_2 .

IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ABRAMSON, S. N.; MARTIN, M. W.; HUGHES, A. R. *et al.* Interaction of β -adrenergic receptors with the inhibitory guanine nucleotide-binding protein of adenylate cyclase in membranes prepared from cyc⁻S49 lymphoma cells. **Biochem. Pharmacol.**, v. 37, p. 4289-4297, 1988.
- AHLQUIST, R. P. A study of adrenotropic receptors. **Am. J. Physiol.**, v. 153, p. 586-600, 1948.
- ARNER P.; KRIEGHOLM, E.; ENGFELDT, P. *et al.* Adrenergic regulation of lipolysis in situ at rest and during exercise. **J. Clin. Invest.**, v. 85, p. 893-898, 1990.
- ARNER, P.; HELLSTROM, L.; WAHRENBERG, H. *et al.* Beta-adrenoceptor expression in human fat cells from different regions. **J. Clin. Invest.**, v. 86, p. 1595-1600, 1990.
- ARNER, P. Adrenergic receptor function in fat cells. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 55, p. 228S-236S, 1992.
- AXELROD, J.; REISINE, T. D. Stress hormones: their interaction and regulation. **Science**, v. 224, n. 4648, p. 452-459, 1984

* Normalização baseada em ABNT 6023/1989

BALKIN, M. S.; SONENBERG, M. Hormone-induced homologous and heterologous desensitization in the rat adipocyte. **Endocrinology**, v. 109, n. 4, p. 1176-1183, 1981.

BASSANI, R. A.; DE MORAES, S. Subsensitivity to beta-adrenoceptor agonists in right atria isolated from footshock-stressed rats. **Gen. Pharmac.**, v. 18, n. 5, p. 473- 477, 1987a.

_____. Effects of footshock stress on the sensitivity of the isolated rat pacemaker to catecholamines. **Br. J. Med. Biol. Res.**, v. 20, n. 3/4, p. 467-470, 1987b.

BENOVIC, J. L.; BOUVIER, M.; CARON, M. G. *et al.* Regulation on adenylyl cyclase-coupled beta-adrenergic receptors. **Annu. Rev. Cell. Biol.**, v. 4, p. 405-428, 1988.

BOWEN, W. P.; FLINT, D. J.; VERNON, R. G. Regional and interspecific differences in the ligand binding properties of β -adrenergic receptors of individual white adipose tissue depots in the sheep and rat. **Biochem. Pharmacol.**, v. 44, n. 4, p. 681-686, 1992.

CARPÉNÉ, C.; BERLAN, M.; LAFONTAN, M. Influence of development and reduction of fat stores on the antilipolytic α_2 -adrenoceptor in hamster adipocytes: comparison with adenosine and β -adrenergic lipolytic response. **J. Lipid Res.**, v. 24, p. 766-2774, 1983.

CARPÉNÉ, C.; GALITZKY, J.; SAULNIER-BLANCHE J-S. *et al.* Selective reduction of α_2 - adrenergic responsiveness in hamster adipose tissue during prolonged starvation. **Am. J. Physiol.**, v. 259, p. E80-E88, 1990.

- CONSOLI, A.; NURJHAN, N. & GERICH, J. Rates of appearance and disappearance of plasma lactate after oral glucose: implications for indirect-pathway hepatic glycogen repletion in man. **Clin. Physiol. Biochem.**, v. 7, p. 70-78, 1989.
- CRANDALL, D. L.; LAI, F. M.; HUGGINS, F. J. *et al.* Effect of caloric restriction on cardiac reactivity and β -adrenoceptor concentration. **Am. J. Physiol.**, v. 244, n. 13, p. 444-448, 1983.
- DAAKA, Y.; LUTTRELL, L. M. & LEFKOWITZ, R. J. Switching of the coupling of the β_2 -adrenergic receptor to different G protein by protein kinase A. **Nature.**, v.390, p.88-91, 1997.
- EMORINE, L. J.; MARULLO, S.; DELAVIER-KLUTCHKO, C. *et al.* Structure of the gene for human β_2 -adrenergic receptor: expression and promoter characterization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 6995-6999, 1987.
- EMORINE, L. J.; MARULLO, S.; BRIEND-SUTREN, M-M. *et al.* Molecular characterization of the human beta3-adrenergic receptor. **Science**, v. 245, p. 1118-1121, 1989.
- FAINTRENIE, G & GÉLOËN, A. Alpha-1 adrenergic regulation of lactate production by white adipocytes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.277, n. 1, p.235-238, 1996.
- FÈVE, B.; BAUDE, B.; KRIEF, S. *et al.* Inhibition by dexamethasone of β_3 -adrenergic receptor responsiveness in 3T3-F442 adipocytes. Evidence for a transcriptional mechanism. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 22, p. 15909-15915, 1992.

- FRIELLE, T.; COLLINS, S.; DANIEL, K. W. *et al.* Cloning of the cDNA for the human β_1 -adrenergic receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 7920-7924, 1987.
- GALITZKY, J.; LARROUY, D.; BERLAN, M. and LAFONTAN, M. New tools for human fat cell α_2 -adrenoceptors. II. Comparative study of partial and full agonist binding parameters using [3 H]RX821002 **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 252, p. 312-319, 1990.
- GALITZKY, J.; REVERTE, M.; CARPÉNÉ, C. *et al.* β_3 -adrenoceptors in dog adipose tissue: studies on their involvement in the lipomobilizing effect of catecholamines. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 266, n. 1, p. 358-366, 1993.
- GALITZKY, J.; LAFONTAN, M.; NORDENSTROM, J. *et al.* Role of vascular α_2 -adrenoceptors in regulating lipid mobilization from human adipose tissue. **J. Clin. Invest.**, v. 91, p. 1997-2003, 1993.
- GALITZKY, J.; REVERTE, M.; PORTILLO, M. *et al.* Coexistence of β_1 -, β_2 - and β_3 -adrenoceptors in dog fat cells and their differential activation by catecholamines. **Am. J. Physiol.**, v. 264, p. E403-E412, 1993.
- GILMAN, A. G. G proteins: transducers of receptor-generated signals. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 56, p. 615-649, 1987.
- GIUDICELLI, Y.; AGLI, B.; LACASA, D. Beta-adrenergic receptor desensitization in rat adipocyte membranes. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 585, p. 85-93, 1979.

- GRANNEMAN, J. G.; LAHNESS, K. N.; CHAUDHURY, A. Molecular cloning and expression of the rat β_3 -adrenergic receptor. **Mol. Pharmacol.**, v. 40, p. 895-899, 1991.
- GRANNEMAN, J. G. Effects of agonist exposure on the coupling of β_1 - and β_3 - adrenergic receptors to adenylyl cyclase in isolated adipocytes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 261, n. 2, p. 638-642, 1992.
- GRANNEMAN, J. G.; LAHNERS, K. N. Differential adrenergic regulation of β_1 - and β_3 -adrenoreceptor messenger ribonucleic acids in adipose tissues. **Endocrinology**, v. 130, n. 1, p. 109-114, 1992.
- HADRI, K. el; FÈVE, B.; PAIRAULT, J. Developmental expression and functional activity of β_1 - and β_3 -adrenoceptors in murine 3T3-F442A differentiating adipocytes. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 297, p. 107-119, 1996.
- KAUMANN, A. J. Is there a third heart β -adrenoceptor? **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 10. p. 316-320, 1989.
- KAUMANN, A. J. Four β -adrenoceptor subtypes in the mammalian heart. **TIPS.**, v. 18. p. 71-76, 1997.
- KAUMANN, A. J. & MOLENAAR, P. Modulation of human cardiac function through 4 β -adrenoceptor populations. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.**, v. 335. p. 667-681, 1997.
- KOBILKA, B. K.; DIXON, R. A. F.; FRIELLE, T. *et al.* cDNA for the human β_2 -adrenergic receptor: a protein with multiple membrane-spanning domains and

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

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

LAFONTAN, M.; BARBE, P.; GALITZKY, J. *et al.* Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. **Human Reprod.**, v. 12, suppl. 1, p. 6-20, 1997.

LANDS, A. M.; LUDUENA, F. P. and BUZZO, H. J. Differentiation of receptor responsiveness to isoproterenol. **Life Science**, v. 6, n. 21, p. 2241-2249, 1967a.

_____. *et al.* Differentiation of receptors systems activated by sympatomimetic amines. **Nature**, v. 241, p. 597-598, 1967b.

LANGIN, D.; PORTILLO, M. P.; SAULNIER-BLANCHE, J.-P. *et al.* Coexistence of three β -adrenoceptor subtypes in white fat cells of various mammalian species. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 199, p. 291-301, 1991.

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

LIEFDE, I. van; WITZENBURG, A. van; VAUQUELIN, G. Multiple beta adrenergic receptor subclasses mediate the isoproterenol-induced lipolytic response in rat adipocytes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 262, n. 2, p. 552-558, 1992.

- LOHSE, J. M. Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1179, p. 171-188, 1993.
- LÖNNQVIST, F.; WAHRENBERG, H.; HELLSTRÖM, L. *et al.* Lipolytic catecholamine resistance due to decreased β_2 -adrenoceptor expression in fat cells. **J. Clin. Invest.**, v. 90, p. 2175-2186, 1992.
- MACHIDA, C. A.; BRUNZOW, J. R.; SEARLES, R. P. *et al.* Molecular cloning and expression of the rat β_1 receptor gene. **J. Biol. Chem.** v. 265, p. 12960-12965, 1990.
- MARCONDES, F. K.; VANDERLEI, L. C. M.; LANZA, L. L. B. *et al.* Stress-induced subsensitivity to catecholamines depends on the estrous-cycle. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 74, p. 663-669, 1996.
- MAURIÈGE, P.; GALITZKY, J.; BERLAN, M. *et al.* Heterogenous distribution of β - and α_2 -adrenoceptor binding sites in human fat cells from various deposits: functional consequences. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 7, p. 156-165, 1987.
- MEWES, T.; DUTZ, S.; RAVENS, U. and JAKOBS, K. H. Activation of calcium currents in cardiac myocytes by empty β -adrenoceptors. **Circulation**, v. 88, p. 2916-2922, 1993.
- MILANO, C. A.; ALLEN, L. F.; ROCKMAAN *et al.* Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the β_2 -adrenergic receptor. **Science**, v. 264, 582-586, 1994.

- NAHMIAS, C.; BLIN, N.; ELALOUF, J-M. *et al.* Molecular characterization of the mouse β_3 -adrenergic receptor: relationship with the atypical receptor of adipocytes. **EMBO J.**, v. 10, p. 3721-3727, 1991.
- NOMURA, S., WATANABE, M., UKEI, N. *et al.* Stress and β -adrenergic receptor binding in rat's brain. **Brain Res.**, v. 224, n. 1, p. 199-203, 1981.
- POLLARD I.; WHITE, B.; BASSET, J. R. *et al.* Plasma glucocorticoid elevation and desynchronization of the estrus cycle following unpredictable stress in rat. **Behav. Biol.**, v. 14, p. 103-108, 1975.
- RODBELL, M. Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. **J. Biol. Chem.**, v. 239, p. 375-380, 1964.
- RODRIGUES, M. L. V.; MARCONDES, F. K.; SPADARI-BRATFISCH, R. C. Relationship among sensitivity to adrenaline, plasma corticosterone level, and estrous cycle in rats. **Can. J. Physiol. Pharmac.**, v. 73, p. 602-607, 1995.
- SCARPACE, P.J. Decreased receptor activation with age can it be explained by desensitization ? **JAGS**, v. 36, p. 1067-1071, 1988.
- SELYE, H. **The stress of life.** MacGraw-Hill Books: New York, 324 p., 1956.
- SPADARI, R. C.; DE MORAES, S. Repeated swimming stress and responsiveness of the isolated rat pacemaker to the chronotropic effects of noradrenaline and isoprenaline: role of adrenal corticosteroids. **Gen. Pharmac.**, v. 19, n. 4, p. 553-557, 1988.

- TAOUI, M.; BERLAN, M.; MONTASTRUC, P. *et al.* Characterization of dog fat cell adrenoceptors: variation in α_2 - and β -adrenergic receptors distribution according to the extent of the fat deposit and the anatomical location. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 242, p. 1041-1049, 1987.
- TAOUI, M.; VALET, P.; ESTAN, L. *et al.* Obesity modifies the adrenergic status of adipose tissue. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 250, p. 1061-1066, 1989.
- U'PRICHARD, D. C.; KVETNANSKY, R. Catecholamines and stress. In: USDIN, E., KVETNANSKY, R.; KOPIN, I. J. **Catecholamines and stress: recent advances**. New York: Pergamon, 1980. p. 299-308.
- VALET, P.; MONTASTRUC, J. L.; BERLAN, M. *et al.* Differential regulation of fat cell β_2 - and β_1 -adrenoceptors by endogenous norepinephrine in dog. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 249, p. 271-277, 1989.
- VANDERLEI, L. C. M.; MARCONDES, F. K.; LANZA, L. L. B. *et al.* Influence of the estrous cycle on the sensitivity to catecholamines in right atria from rats submitted to foot-shock stress. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 74, p. 670-678, 1996.
- XIAO, R.; JI, X. & LAKATTA, E. G. Functional coupling of the β_2 -adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. **Mol. Pharmacol.**, v. 47, p. 322-329, 1995.

...Que a música que eu ouço ao longe seja linda, ainda que triste...

Porque metade de mim é partida e a outra metade é saudade.

Que as palavras que falo não sejam ouvidas como prece, nem repetidas com fervor, apenas respeitadas como a única coisa que resta a um homem inundado de sentimento...

Que essa tensão que me corroe por dentro seja um dia recompensada.

Porque metade de mim é o que penso e a outra metade é um vulcão.

...Que o espelho reflita em meu rosto o doce sorriso que eu me lembro de ter dado na infância.

Que não seja preciso mais do que uma simples alegria para me fazer aquietar o espírito...E que minha loucura seja perdoada. Porque metade de mim é amor e a outra metade...também.

Oswaldo Montenegro