

MONICA LUIZA VIEGAS [RODRIGUES 618

SENSIBILIDADE AS CATECOLAMINAS
DOS ATRIOS DIREITOS DE RATAS:
INFLUENCIA DAS FASES DO CICLO ESTRAL
E DO " STRESS "

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
Monica Luiza V. Rodrigues
R.V.C.
e aprovada para a concessão do grau de Mestrado.

TESE SUBMETIDA AO INSTITUTO DE
BIOLOGIA DA UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE CAMPINAS, COMO
PARTE DOS REQUISITOS PARA A
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM CIENCIAS BIOLÓGICAS NA
ÁREA DE FISILOGIA.

ORIENTADORA:
PROFª DRª REGINA CÉLIA [SPADARI

Campinas - São Paulo
1993

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

6568726

*A meus pais e irmãos,
pelo apoio e incentivo.*

*Ao Marc e Pedrinho,
pela compreensão e carinho.*

AGRADECIMENTOS

- À Profa. Dra. Regina Célia Spadari, pela orientação, confiança e amizade.

- Aos colegas do Depto. de Fisiologia e Biofísica da UNICAMP, em especial a Prof. Maria José C. S. Moura, pela colaboração durante a dosagem de corticosterona, e principalmente pela amizade.

- À Fernanda Klein Marcondes pela ajuda na confecção dos gráficos da tese.

- À Vanderci Aparecida dos Santos, pela ajuda constante no trabalho laboratorial.

- A todos os professores do Depto. de Fisiologia e Biofísica da UNICAMP, pelo crescimento científico.

- Aos funcionários do Depto. de Fisiologia e Biofísica da UNICAMP, em especial ao Sr. Machado pela disposição na aquisição das ratas.

- Aos Profs. Drs. Naomi Shinomiya Hell, Ernesto José Dottaviano e Gilberto D'Assunção Fernandes pela leitura, críticas e sugestões, que tornaram mais clara a forma final do texto.

- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro.

INDICE

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1. Animais	11
3.2. Determinação das Fases do Ciclo Estral	11
3.3. Estresse por Natação	12
3.4. Átrio Direito Isolado	12
3.5. Curvas Concentração-Efeito	13
3.6. Tratamento "in vitro" do Tecido Atrial com Inibidores da Captação Extraneuronal	14
3.6.1. Desnervação	14
3.6.2. Adição de Fenoxibenzamina	14
3.6.3. Adição de Corticosterona	14
3.7. Determinação dos Níveis Plasmáticos de Corticosterona	15
3.8. Fármacos e Reagentes	16
3.8.1. Análises Farmacológicas	16
3.8.2. Dosagem de Corticosterona	16
3.9. Análise dos Resultados	17
4. RESULTADOS	19
4.1. Sensibilidade do Átrio Direito de Ratos e Ratas Normais a Agonistas de Adrenoceptores Beta.....	19
4.2. Níveis Plasmáticos de Corticosterona em Ratos e Ratas Normais.....	24
4.3. Efeito da Natação sobre a Sensibilidade do Átrio	

Direito a Agonistas de Adrenoceptores.....	26
4.4. Efeito da Natação sobre os Níveis Plasmáticos de Corticosterona.....	33
5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÕES	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
8. RESUMO.....	71
9. SUMMARY.....	73

1 . I N T R O D U Ç Ã O

Quando a integridade ou a homeostasia de um organismo é ameaçada por fatores externos e/ou internos, instala-se um estado conhecido como estresse, o qual representa uma reação relacionada à resistência do organismo frente aos agentes agressores.

O sistema endócrino participa da reação através da liberação de hormônios hipofisários tais como o hormônio do crescimento, o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e a prolactina, além de vários outros peptídeos (FUJIE & ET AL., 1983; HOKFELT & ET AL., 1983; KANT & ET AL., 1983). O aumento dos níveis plasmáticos de ACTH determina a síntese e a liberação de glicocorticóides pelo córtex da adrenal, enquanto a ativação do sistema nervoso simpático e da medula adrenal resulta em aumento dos níveis plasmáticos de catecolaminas (CANNON & ET AL., 1927; LE BLANC & NADEU, 1961; LEDUC, 1961; LE BLANC & VILLEMARIES, 1970; OSTMAN-SMITH, 1979; NATELSON & ET AL., 1981).

As catecolaminas atuam no organismo modulando processos fisiológicos através da interação com receptores específicos localizados na membrana plasmática das células de diferentes tecidos. Dois tipos de adrenoceptores foram inicialmente identificados por AHLQUIST (1948), que os classificou como alfa e beta.

Atualmente, aceita-se que haja quatro sub-tipos de adrenoceptores alfa (LANGER, 1974; BYLUND, 1985; BOYAJIAN & ET AL., 1987; BOYAJIAN & LESLIE, 1987; HAN & ET AL., 1987) e pelo menos três subtipos de adrenoceptores beta (LANDS ET AL., 1967 a,b; SANO & ET AL., 1993). Os

tipos e sub-tipos de adrenoceptores podem coexistir num mesmo tecido e, neste caso, a resposta final às catecolaminas dependerá da proporção relativa de cada um dos subtipos.

Os sub-tipos de adrenoceptores beta possuem uma via comum de ação que inclui a ativação de uma proteína Gs a qual, por sua vez, estimula a adenilil ciclase, cuja atividade resulta na formação e acúmulo de AMP_c. Este atua como segundo mensageiro intracelular (BYLUND & ET AL., 1985). O AMP_c formado estimula enzimas do tipo quinase-a, que então, atuam fosforilando proteínas (BERRIDGE, 1985).

Os adrenoceptores alfa₁ e alfa₂ possuem mecanismos distintos para iniciar o sinal nas células alvo. Enquanto os adrenoceptores alfa₁ tem como segundo mensageiro o íon cálcio e a sequência de reações intracelulares que envolve a relação fosfatidilinositol-ácido fosfatídico, os adrenoceptores alfa₂ atuam através da proteína Gi na inibição da adenilato-ciclase, o que provoca a diminuição do nível de AMP_c (LIMBIRD, 1984; GRAHAM & HOMCY, 1985). Além da inibição da adenilil-ciclase, outros mecanismos bioquímicos e eletrofisiológicos parecem ocorrer após a ativação dos adrenoceptores alfa₂: aceleração da troca Na⁺/H⁺, ativação dos canais de potássio ou inibição de canais de cálcio sensíveis à voltagem. Tais alterações adicionais desempenham importante papel no acoplamento excitação-contração de células musculares (LIMBIRD, 1984).

O átrio direito de rato é um tecido densamente innervado e, em condições normais, o efeito cronotrópico das catecolaminas é farmacologicamente mediado por uma população homogênea de adrenoceptores do subtipo beta₁ (LANDS & ET AL., 1967 a; MINNEMAN & MOLINOFF, 1980; BRYAN & ET AL., 1981; CALLIA & DE MORAES, 1984).

Utilizando radioligantes, MINNEMAN & ET AL. (1979) analisaram a distribuição dos adrenoceptores beta-cardíacos em várias espécies, demonstrando que o coração de ratos contém cerca de 80% de adrenoceptores do subtipo beta₁ e 20% do subtipo beta₂. Porém, não se conhece o papel desempenhado pelos adrenoceptores beta₂, neste tecido.

Diversos fatores podem modular a função dos adrenoceptores, alterando a sua densidade e/ou a sua afinidade por agonistas ou, ainda, interferindo com os demais componentes do sistema adenilil-ciclase e seu acoplamento.

O primeiro fator identificado como modulador dos adrenoceptores foram as próprias catecolaminas. Está amplamente demonstrado que variações da concentração de agonistas adrenérgicos podem alterar o número de adrenoceptores beta das células-alvo.

O aumento crônico do contato de adrenoceptores beta com agonistas, por infusão de catecolaminas (MICKEY & ET AL., 1975; SCARPACE & ABRASS, 1982; KENAKIN & FERRIS, 1983; SNAVELY & ET AL., 1985), pela presença de tumores produtores de catecolaminas (SNAVELY & ET AL., 1982) ou pelo tratamento com antidepressivos tricíclicos (BANERJEE & ET AL., 1977; STONE & ET AL., 1985; 1986), causa redução da densidade de adrenoceptores beta denominada "down regulation". O aumento da exposição de adrenoceptores beta a agonistas também pode determinar desacoplamento do receptor com o sistema efetuator (TSE & ET AL., 1979; STRASSER & ET AL., 1984).

Por outro lado, a "up regulation" dos adrenoceptores beta e a supersensibilidade aos efeitos das catecolaminas foram demonstrados após tratamento que diminuem a concentração dos agonistas (SPORN & ET

AL., 1976; GLAUBIGER & LEFKOWITZ, 1981; KAJIYAMA & ET AL., 1982; SEVERSON & ET AL., 1986).

Dois importantes fatores moduladores da sensibilidade do marca-passo às catecolaminas são os mecanismos de recaptção neuronal e de captação extra-neuronal. Estes sistemas podem ser identificados e descritos através de sua localização topográfica e de particularidades cinéticas específicas (IVERSEN, 1963; TRENDELENEBURG, 1963; BURGEN & IVERSEN, 1965; CALLINGHAM & BURGEN, 1966). A ordem de afinidade do sistema de captação extra-neuronal pelas catecolaminas é a seguinte: isoprenalina > adrenalina > noradrenalina (BONISCH, 1980 a,b). O inverso ocorre para o processo de recaptção neuronal (CALLINGHAM & BURGEN, 1966; IVERSEN, 1965).

A isoprenalina presente na fenda juncional é transportada por um processo de difusão facilitada através das membranas pós-juncionais e metabolizada, intracelularmente por O-metilação (BONISCH & TRENDELENEBURG, 1974).

A afinidade do sistema de captação-extraneuronal pela noradrenalina é baixa. Esta catecolamina é metabolizada principalmente pela monoaminoxidase (MAO), após ser recaptada pela terminação adrenérgica (IVERSEN, 1963).

O sistema de captação extra-neuronal pode ser inibido pelas beta-haloalquilaminas (LIGTHMAN & IVERSEN, 1969), pelo betaestradiol (SALT, 1972), por catecolaminas O-metiladas (KAUMANN, 1972) e pela corticosterona (BONISCH, 1980a,b).

O envolvimento de diversos hormônios como, por exemplo, os hormônios tireoideanos (KUPFER & COL, 1986) e os glicocorticóides (DAVIES & LEFKOWITZ, 1981) com a modulação da sensibilidade tissular

aos agonistas de adrenoceptores beta tem sido enfaticamente ressaltado. A hidrocortisona aumenta os efeitos cronotrópico e inotrópico das catecolaminas (BAXTER & FORSHAM, 1972). A administração de glicocorticóides a ratos causa aumento do número de adrenoceptores beta pulmonares (MANO & ET AL., 1979) e reverte a "down regulation" destes receptores produzida pelo agonista seletivo betaz, metaproterenol (SCARPACE & ABRASS, 1982). Porém, os efeitos dos glicocorticóides sobre adrenoceptores beta cardíacos ainda não estão bem determinados. ABRASS & SCARPASCE (1981,b) verificaram, em coração de ratos adrenalectomizados, um aumento de número de adrenoceptores beta, que foi evitado pela administração de cortisol.

DAVIES & LEFKOWITZ (1981), ao contrário, não detectaram modificações no número de adrenoceptores beta cardíacos após adrenalectomia observando, no entanto, evidências de desacoplamento destes receptores com o sistema de adenil-ciclase.

NOURANI & COL (1992) demonstraram que o RU-48486, um corticosteróide sintético, poderia induzir a participação de adrenoceptores betaz na resposta cronotrópica à isoprenalina em átrio direito de ratos sendo, conseqüentemente, responsável pela alteração de sensibilidade observada durante o estresse por choque nas patas (BASSANI, 1988).

CAPAZ & DE MORAES (1988) demonstraram que a infusão de corticosterona em ratos normais, não submetidos a estresse induziu subsensibilidade do átrio direito à noradrenalina.

Alterações da sensibilidade adrenérgica também podem ser causadas pelas modificações de natureza neural e hormonal ligadas à reação de estresse.

Vários trabalhos tem demonstrado alteração da resposta cronotrópica e inotrópica às catecolaminas, em átrios direitos e esquerdos isolados de ratos submetidos a estresse por frio (HARRI & ET AL., 1974; CALLIA & DE MORAES, 1983; 1984), choque nas patas (BASSANI & DE MORAES, 1986; 1987; NOURANI & ET AL., 1992), imobilização (CAPAZ & DE MORAES, 1988) ou natação (SPADARI & ET AL., 1988).

SPADARI & ET AL. (1988) demonstraram que átrios direitos isolados de ratos submetidos a sessão única de natação desenvolvem supersensibilidade ao efeito cronotrópico da isoprenalina e da adrenalina. Tal supersensibilidade está relacionada à inibição do sistema de captação extraneuronal de catecolaminas, e depende da presença das glândulas adrenais. A adrenalectomia ou o tratamento com metirapona, substância que inibe a síntese de corticosterona, abolem este fenômeno. Por outro lado, átrios direitos isolados de ratos submetidos a três sessões de natação, apresentam subsensibilidade ao efeito cronotrópico da isoprenalina e da noradrenalina. Neste caso esta subsensibilidade é acompanhada por alteração da constante de dissociação do antagonista de adrenoceptores beta₁, metoprolol, indicando que o mecanismo envolvido neste fenômeno inclui alterações conformacionais dos adrenoceptores beta₁ cardíacos (SPADARI & DE MORAES, 1988).

Estes trabalhos estabeleceram claramente a participação da corticosterona nos fenômenos de alteração de sensibilidade ao efeito cronotrópico das catecolaminas em átrios direitos isolados de ratos machos submetidos ao estresse, ao demonstrarem que tais alterações não ocorrem se for evitado o aumento dos níveis de corticosterona que normalmente ocorrem durante exposição ao estresse.

O nível plasmático de corticosterona em ratos normais apresenta grandes flutuações circadianas, sendo mais elevados antes do início dos períodos de escuro e mais baixos no início dos períodos de luminosidade (TORELLAS & ET AL., 1981).

Há diferença entre adrenais de machos e fêmeas, quanto ao tamanho: fêmeas tem glândulas maiores do que machos. Entretanto, o córtex adrenal de ambos contém um número similar de células parenquimais. Nem a gonadectomia, nem a terapia hormonal substitutiva causa alteração no número destas células (KASPRZAK & ET AL., 1986). O tamanho da glândula está relacionado com diferenças funcionais: a taxa de secreção de corticosterona é mais elevada em ratas do que em ratos; estas diferenças dependem da ação inibitória da testosterona, e da ação estimulatória do estradiol sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (KITAY, 1968; MALENDOWICZ & ET AL., 1976; KIME & ET AL., 1980; LESNIEWSKA & ET AL., 1990)

HIROSHIGE & WADA-OKADA (1973) observaram que o ritmo circadiano de secreção de fator liberador hipotalâmico de corticotrofina (CRF) pelo hipotálamo e, conseqüentemente, de ACTH pela adenohipófise e de corticosterona pelo córtex adrenal, diferem em ratos e ratas.

O ciclo estral de ratas apresenta duração média de 4 dias e é caracterizado por 4 fases: proestro, estro, metaestro e diestro (LONG & EVANS, 1922; ASTWOOD, 1939; HOUSSAY, 1980). Durante estas fases, ocorrem alterações na liberação de gonadotrofinas (FREEMAN, 1988).

O nível plasmático de corticosterona apresenta grandes oscilações ao longo das fases do ciclo estral. Como nos machos, os níveis pela manhã são significativamente menores que os vespertinos (HIROSHIGE & WADA-OKADA, 1973; PHYLLIPS & POOLSANGUAN, 1978), sendo

significativamente maiores durante o proestro do que durante as demais fases do ciclo (CRITCHLOW & ET AL., 1963; RAPS & ET AL., 1971; BUCKINGHAM & ET AL., 1978; PHYLLYPS & POOLSANGUAN, 1978; BARON & BRUSH, 1979).

O aumento do nível plasmático de corticosterona em resposta ao estresse também é diferente, quando se comparam ratos com ratas. Machos apresentam um aumento mais rápido e efêmero do que fêmeas; embora, nestas, a vida média da corticosterona no plasma seja menor (KITAY, 1961; DUPOUY & ET AL., 1987).

Os autores são unânimes em afirmar que a resposta ao estresse também varia de acordo com as fases do ciclo. Entretanto há discordâncias com respeito às fases do ciclo estral nas quais o animal é mais suscetível ao estresse. POLLARD & ET AL. (1975) verificaram que choques nas patas, aplicados durante o proestro, resultam em aumentos maiores nos níveis plasmáticos de corticosterona do que se aplicados durante o estro e/ou o diestro. Já BARON & BRUSH (1979) observaram um aumento significativo na corticosterona plasmática após estresse por imobilização apenas durante o estro.

Considerando as oscilações circadianas no ritmo de secreção de corticosterona, peculiares de ratas, e o papel que este hormônio desempenha no estabelecimento de variações de sensibilidade às catecolaminas em átrios direitos isolados de ratos, BORDIN & SPADARI (1988) analisaram a sensibilidade ao efeito cronotrópico do isoproterenol em átrios direitos isolados de ratas adultas não submetidas a estresse, nas diferentes fases do ciclo estral. Estas autoras verificaram que a sensibilidade ao isoproterenol é idêntica

àquela apresentada por átrios de ratos adultos normais e não varia durante as fases do ciclo.

Baseadas nesses resultados, nós nos propomos a analisar os níveis plasmáticos de corticosterona em ratas normais ou submetidas a uma sessão de natação e avaliar, nos átrios direitos isolados destes animais, a sensibilidade ao efeito cronotrópico das catecolaminas em diferentes fases do ciclo estral.

2. OBJETIVOS

1. Determinar a resposta cronotrópica à isoprenalina, noradrenalina e adrenalina em átrios direitos de ratas normais, em cada fase do ciclo estral.
2. analisar o efeito do estresse por natação, aplicado durante o diestro ou o estro, sobre a sensibilidade da resposta cronotrópica às catecolaminas,
3. avaliar o nível plasmático de corticosterona em ratas normais ou submetidas ao estresse.
4. estabelecer uma correlação entre alterações de sensibilidade às catecolaminas do átrio direito isolado, fases do ciclo estral e níveis plasmáticos de corticosterona e
5. comparar os resultados com aqueles obtidos em átrios de machos submetidos ao mesmo agente causador de estresse.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos e ratas (*Rattus norvegicus*, Berkenhout, var. albina) Wistar, com idade entre 100 e 150 dias, pesando entre 200 e 250g. Os animais fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) foram alojados, pelo menos por uma semana, no Biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Instituto de Biologia, da UNICAMP, em gaiolas plásticas (30x16x19cm), em grupos de 4, dispostos em sala climatizada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12/12h (luzes acesas às 7:00h). Água e ração foram fornecidos "ad libitum" e, durante este período de adaptação, os animais não sofreram nenhuma manipulação, exceto aquelas relacionadas à limpeza das gaiolas e ao fornecimento de ração e de água.

3.2. DETERMINAÇÃO DAS FASES DO CICLO ESTRAL.

A determinação das fases do ciclo estral foi feita diariamente (entre 8:00 e 9:00hs) por meio de esfregaço vaginal, durante duas semanas. Foram descartadas as ratas que apresentaram ciclos irregulares, caracterizados por ausência de uma ou mais fases ou permanência em uma das fases além do período médio normal. As ratas que apresentaram ciclos de 4 dias (proestro, estro, metaestro e diestro) foram utilizadas.

3.3. ESTRESSE POR NATAÇÃO.

Os animais dos grupos experimentais foram submetidos à natação em um tanque de vidro medindo 100x50x60cm, contendo água a 35 +/- 1°C, em quantidade suficiente para se obter uma profundidade de 30cm. Cada animal foi retirado de sua gaiola moradia e submetido a uma sessão de 50 minutos de natação (estress agudo).

Os ratos dos grupos normais não sofreram qualquer tipo de manipulação, exceto aquelas já mencionadas.

3.4. ATRIO DIREITO ISOLADO

Os animais foram sacrificados por contusão cerebral seguido de secção dos vasos cervicais. O tórax foi aberto e o coração removido. Os átrios direitos foram excisados e preparados para registro isométrico das contrações espontâneas, sob tensão diastólica de 0.5g, em câmaras para órgãos isolados, contendo 20 ml de solução de Krebs-Henseleit, com a seguinte composição (mM): NaCl 115; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄ 2,5; NaHCO₃ 25,0; glicose 11,0; ácido ascórbico 0,11 (HAWKINS, 1962). Este último foi adicionado para diminuir a oxidação das catecolaminas, durante a obtenção das curvas concentração-efeito. O líquido de incubação foi borbulhado continuamente com 95% de O₂ e 5% de CO₂ e a temperatura mantida a 36,5 +/- 0,1° C, com auxílio de uma bomba de perfusão HAAKE (modelo FEN). Para registro das contrações espontâneas foi utilizado um transdutor isométrico de tensão Narco Bio -System, modelo F-60, acoplado a um polígrafo Narco Bio - System, modelo DMP-4.

A estabilização da frequência do átrio isolado ocorreu entre 30 e 45 min após a montagem da preparação e foi determinada por flutuações de frequência menores que 5 batimentos por minuto (bat/min), durante 15 minutos, com contagens sucessivas a cada 5 minutos. Átrios que apresentaram irregularidades rítmicas, ou que não estabilizaram sua frequência após 60 minutos de incubação foram descartados. Durante o período de incubação, o líquido foi substituído a intervalos de 15 minutos.

3.5. CURVAS CONCENTRAÇÃO-EFEITO

Após o período de estabilização, foram obtidas curvas concentração-efeito cronotrópico para a isoprenalina, noradrenalina e adrenalina, utilizando o método cumulativo (VAN ROSSUM, 1963). Os incrementos sucessivos da concentração molar do agonista foram de 0,5 unidade logarítmica. O efeito máximo foi determinado quando três concentrações sucessivas e crescentes do agonista não alteraram a resposta obtida com a concentração imediatamente anterior.

A sensibilidade do átrio direito foi avaliada pela determinação do valor pD_2 . Este corresponde ao logaritmo negativo da concentração molar do agonista que determina um efeito correspondente a 50% do máximo, em experimentos individuais. Os valores pD_2 foram expressos como médias aritméticas, com seus respectivos erros padrões (FLEMING & ET AL., 1972). As variações de sensibilidade foram estimadas pelos quocientes entre os valores pD_2 .

3.6. TRATAMENTO "in vitro" DO TECIDO ATRIAL COM INIBIDORES DA CAPTAÇÃO EXTRANEURONAL.

Em alguns experimentos, os átrios direitos foram submetidos ao seguinte tratamento "in vitro", imediatamente antes da obtenção das curvas concentração-efeito aos agonistas de adrenoceptores.

3.6.1. Desnervação (APRIGLIANO & HERMSMEYER, 1976): após estabilização da frequência, os átrios foram submetidos à ação da 6-hidroxi-dopamina (12 μ M) por 10 minutos. Para evitar a oxidação da 6-hidroxi-dopamina, retiramos o NaHCO_3 da solução de Krebs-Henseleit e adicionamos o anti-oxidante glutathion (20 μ M), reduzindo o pH da solução para 5.0. Após 10 minutos de contato, o líquido de incubação foi substituído por Krebs-Henseleit completo, trocado novamente aos 15 e aos 30 minutos. Experimentos preliminares estabeleceram que não ocorre deterioração do tecido, embora a remoção do NaHCO_3 e a adição de glutathion resultem em acidificação do meio.

3.6.2. Adição de Fenoxibenzamina (PBZ): Após a exposição da preparação à 6-hidroxi-dopamina, adicionamos PBZ (10 μ M) ao líquido de incubação. O tempo de contato foi de 15 minutos, seguido por duas trocas do líquido a intervalos de 15 minutos.

3.6.3. Adição de Corticosterona: Após a retirada do excesso de fenoxibenzamina e obtenção de uma frequência estável, adicionamos corticosterona, na concentração de 10 μ g/ml, permanecendo o esteróide no líquido de incubação durante a obtenção da curva concentração-efeito à isoprenalina. A fenoxibenzamina e a corticosterona são potentes inibidores da captação extraneuronal (IVERSEN & SALT, 1970; BONISCH & ET AL., 1974).

A sensibilidade da preparação, após este tratamento, foi avaliada pela determinação do valor pD_2 como descrito acima.

3.7. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CORTICOSTERONA.

Os níveis plasmáticos de corticosterona foram determinados em ratos e em ratas normais, nas diferentes fases do ciclo estral e, em ratas submetidas a 50 minutos de natação durante o diestro ou estro. Utilizamos o método fluorimétrico de ZENKER & BERNSTEIN (1958) modificado por MATTINGLY (1962).

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, por via intraperitoneal). Após laparotomia, coletamos aproximadamente 5 ml de sangue da veia renal. O sangue foi centrifugado por 15 minutos (10000 r.p.m) e o plasma foi separado e estocado a -20° C até o momento da dosagem.

Os esteróides foram extraídos do plasma em diclorometano. Adição de NaOH (0,1 N) garantiu a destruição dos outros esteróides plasmáticos. A corticosterona foi convertida em um produto fluorescente pela adição de uma mistura de ácido sulfúrico e etanol na proporção de 7.0 volumes de ácido sulfúrico concentrado para 3.0 volumes de etanol a 95%. A fluorescência foi medida em espectrofotofluorímetro Perkin - Elmer, modelo 204-a, com os comprimentos de onda de 475 nm para excitação e 520 nm para emissão. Para cada leitura foram feitas correções usando-se "brancos" e padrões internos adequados. As amostras foram analisadas em duplicata. A

recuperação do método foi 122% e os resultados foram apresentados corrigidos.

3.8. FARMACOS E REAGENTES

3.8.1. Análises Farmacológicas

Para a solução de Krebs-Henseleit, foram utilizados sais de padrão analítico e água deionizada. Os fármacos empregados foram: (-) - adrenalina (base livre), cloridrato de isoproterenol, (-) - noradrenalina (base livre), corticosterona e 6-hidroxidopamina (Sigma Co), cloridrato de fenoxibenzamina (SKF Labs) e glutation (Fisher Sc Co).

As soluções de estoque foram preparadas em água desionizada e diluídas em Krebs-Henseleit imediatamente antes do uso.

A fenoxibenzamina foi dissolvida em etanol acidificado com HCl e a corticosterona dissolvida em etanol a 95%. Ambas as drogas foram utilizadas após diluição subsequente em Krebs-Henseleit.

3.8.2. Dosagem de Corticosterona

Ácido sulfúrico 96% (Carlo Erba), corticosterona (Sigma Co.), diclorometano (Mallinckodt), etanol 95% (Merck), heparina ("Liquemine", Roche) e hidróxido de sódio (pastilhas, Química Moderna) foram utilizados.

A solução-padrão de corticosterona foi preparada em etanol absoluto e estocada a -20° C. Todas as outras soluções foram preparadas em água deionizada.

3.9. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados foram analisados empregando-se o teste "t" de Student, quando foram comparadas as médias de um grupo experimental com seu respectivo controle. Para identificar diferenças entre mais de dois grupos foi empregada a análise de variância (ANOVA). Após a obtenção de um F significativa, foram determinados onde se localizavam as diferenças significantes aplicando o teste de Tuckey para a comparação múltipla de médias. Valores de P menores ou iguais a 0,05 indicaram significância estatística.

Nas tabelas e figuras os resultados da análise foram apresentados da seguinte maneira:

1- Um asterisco (*) indica diferença significativa do grupo experimental em relação ao respectivo grupo controle, evidenciada através do teste "t" de Student.

2- Letras maiúsculas ilustram o resultado da análise de variância. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados; letras iguais indicam que a diferença não atingiu o nível de significância previamente estabelecido.

Utilizamos, ainda, a regressão linear e a determinação do coeficiente de correlação linear, que expressam numericamente, tanto a força quanto o sentido da correlação.

4 . RESULTADOS

4.1. SENSIBILIDADE DO ATRIO DIREITO DE RATOS E RATAS NORMAIS A AGONISTAS DE ADRENOCEPTORES BETA.

Em nenhum dos grupos analisados foi detectada alteração ($p > 0.05$) da frequência de estabilização dos átrios direitos de ratas, aqui referida como frequência inicial, ou das respostas máximas induzidas pelas adições cumulativas de vários agonistas.

As variações de sensibilidade da resposta de átrios direitos aos efeitos cronotrópicos das catecolaminas foram determinadas considerando-se os deslocamentos horizontais das curvas concentração-efeito ao nível dos respectivos valores de pD_2 . Deslocamentos a direita, são interpretados como diminuição da sensibilidade da preparação ao agonista, uma vez que concentrações maiores do agonista são necessárias para determinar a mesma resposta. Deslocamentos a esquerda são indicativos de supersensibilidade; neste caso, concentrações menores do agonista resultam na resposta definida. Este procedimento, apresenta validade metodológica, uma vez que as curvas concentração-efeito são paralelas e não há diferenças significativas quanto às respostas máximas obtidas para cada agonista.

As tabelas 1 e 2 mostram os valores de pD_2 da isoprenalina e da noradrenalina, respectivamente, obtidos em átrios direitos isolados de ratos e ratas normais. Os resultados indicam que a sensibilidade à isoprenalina ou à noradrenalina não difere entre átrios de ratos e de ratas nas diferentes fases do ciclo.

Os resultados apresentados na tabela 3 indicam que, átrios de ratos machos apresentam-se supersensíveis à adrenalina quando comparados àqueles de fêmeas sacrificadas durante as manhãs do metaestro ou do estro.

Entre as ratas, observamos que a sensibilidade do átrio direito à adrenalina oscila ao longo do ciclo estral: o valor mais baixo é observado no estro. Este aumenta progressivamente para alcançar um pico durante o proestro (figura 1). Assim sendo, poderíamos estabelecer a seguinte ordem crescente de sensibilidade do átrio direito de ratas à adrenalina de acordo com as fases do ciclo estral: estro \leq metaestro \leq diestro \leq proestro. A diferença é estatisticamente significativa apenas entre estro e proestro (3,25 vezes ao nível do valor pDz ; $p < 0,05$). A diferença não é significativa entre proestro, metaestro e diestro, nem entre estro, metaestro e diestro (tabela 3 e figura 1).

TABELA 1. Efeito cronotrópico da ISOPRENALINA em átrios direitos isolados de ratos normais, machos e fêmeas nas diferentes fases do ciclo estral.

GRUPO	N ^a	pD ₂ ^b	FI ^c (bat/min)	RM ^c (bat/min)
MACHOS	6	8,74(0,14)	290(10)	115(15)
FÊMEAS/ESTRO	6	8,79(0,11)	290(16)	138(10)
FÊMEAS/METAESTRO	6	8,44(0,07)	272(5)	160(6)
FÊMEAS/DIESTRO	6	8,69(0,04)	283(8)	168(5)
FÊMEAS/PROESTRO	6	8,84(0,09)	262(10)	155(5)

a número de experimentos

b logaritmo negativo da concentração molar de isoprenalina que determina uma resposta igual a 50% da resposta máxima; valores médios acompanhados dos erros padrões das médias.

c valores médios de frequência inicial (FI) e de resposta máxima (RM) em batimentos por minuto, acompanhados dos respectivos erros padrões das médias.

TABELA 2. Efeito cronotrópico da NORADRENALINA em átrios direitos isolados de ratos normais, machos e fêmeas nas diferentes fases do ciclo.

GRUPO	N ^a	pD ₂ ^b	FI ^c (bat\min)	RM ^c (bat\min)
MACHOS	6	7,40(0,17)	264(8)	155(6)
FÊMEAS/ESTRO	6	7,31(0,12)	260(4)	146(14)
FÊMEAS/METAESTRO	6	7,33(0,09)	263(7)	131(6)
FÊMEAS/DIESTRO	6	7,61(0,11)	268(5)	151(14)
FÊMEAS/PROESTRO	6	7,33(0,14)	265(6,7)	128(7)

a número de experimentos.

b logaritmo negativo da concentração molar de noradrenalina que determina uma resposta igual a 50% da resposta máxima; valores médios acompanhados dos erros padrões das médias.

c valores médios de frequência inicial (FI) e de resposta máxima (RM) em batimentos por minuto, acompanhados dos respectivos erros padrões das médias.

TABELA 3. Efeito cronotrópico da ADRENALINA em átrios direitos de ratos e ratas normais nas diferentes fases do ciclo estral.

GRUPO	N ^a	pD ₂	FI ^c (bat/min Sx)	RM ^c (bat/min)
MACHOS	6	7,56(0,14) A	247(8)	142(10)
FEMEAS/ESTRO	6	6,92(0,11) C	248(8)	145(15)
FEMEAS/METAESTRO	6	7,05(0,07) BC	265(5)	153(9)
FEMEAS/DIESTRO	6	7,34(0,09) ABC	251(10)	141(10)
FEMEAS/PROESTRO	6	7,43(0,08) AB	251(7)	138(12)

a número de experimentos

b logaritmo negativo da concentração molar de adrenalina que determina uma resposta igual a 50% da resposta máxima; valores médios acompanhados do erro padrão da média.

c valores médios de frequência inicial (FI) e de resposta máxima (RM) em batimentos por minuto, acompanhados dos respectivos erros padrões da média.

A, B e C mostram o resultado da análise de variância.

Letras diferentes indicam diferenças significativas a nível de 5%.

4.2. NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CORTICOSTERONA EM RATOS E RATAS NORMAIS.

A tabela 4 mostra que ratas normais apresentam variações nos níveis plasmáticos de corticosterona, de acordo com as fases do ciclo estral. Durante o proestro o nível plasmático de corticosterona é significativamente maior do que àquele observado nas demais fases do ciclo estral e em machos ($p < 0,05$). O valor mais baixo é observado durante o estro porém, excetuando-se o proestro, a diferença é estatisticamente significativa apenas entre estro e metaestro ($p < 0,05$). A diferença não é significativa quando se compara estro com diestro ou com machos, como ilustra a figura 2.

Quando comparamos somente as ratas entre si, observamos que há um aumento no nível plasmático de corticosterona ao longo do ciclo estral: O valor mais baixo, observado durante o estro aumenta progressivamente para alcançar um pico durante o proestro.

Este padrão de oscilação correlaciona-se positivamente com a oscilação de sensibilidade à adrenalina (figura 1). Para evidenciar esta correlação os dados foram apresentados juntos na figura 3. O índice de correlação entre estas duas variáveis é igual a 0,75, o que pode ser interpretado como alto.

TABELA 4. Níveis plasmáticos de corticosterona em ratos normais, machos e fêmeas nas diferentes fases do ciclo estral.

GRUPO	N ^a	CORTICOSTERONA ^b (ug/100ml plasma)
MACHOS	6	13,2(2,0) BC
FÊMEAS/ESTRO	6	9,8(0,6) C
FÊMEA/METAESTRO	6	17,5(0,7) B
FÊMEA/DIESTRO	6	14,9(1,7) BC
FÊMEAS/PROESTRO	6	46,5(2,0) A

a número de experimentos.

b valores médios acompanhados de erros padrões das médias.

A, B e C mostram o resultado da análise de variância.

Letras diferentes indicam diferenças significativas a nível de 5%.

4.3. O EFEITO DA NATAÇÃO SOBRE A SENSIBILIDADE DO ÁTRIO DIREITO A AGONISTAS DE ADRENOCEPTORES.

A natação por 50 minutos determinou supersensibilidade ao efeito cronotrópico da isoprenalina ($p < 0.05$) em átrios isolados de ratos e de ratas durante o diestro ($p < 0,05$; figura 4 e tabela 5). No entanto, o valor pD_2 para o efeito cronotrópico da isoprenalina em átrios de ratas submetidas à natação durante o estro não apresenta diferença estatisticamente significativa, quando comparado àquele do respectivo grupo normal (figura 5 e tabela 5).

Observa-se também, que o deslocamento das curvas concentração-efeito à isoprenalina é de 3 vezes em átrios de ratas no diestro, enquanto que este deslocamento é de 30 vezes em átrios de ratos, submetidos ao mesmo agente estressor.

Os efeitos da natação durante 50 minutos sobre a sensibilidade à isoprenalina, noradrenalina e adrenalina do átrio direito de ratas em diestro são mostrados na tabela 6. Não houve alteração de sensibilidade à noradrenalina (figura 6) e nem à adrenalina (figura 7).

A natação por 50 minutos durante o estro, também não alterou a sensibilidade do marcapasso à noradrenalina e à adrenalina (tabela 7). As curvas concentração-efeito para os três agonistas de átrios direitos isolados de ratas submetidas à natação durante o estro, estão ilustradas nas figuras 5, 8 e 9.

A avaliação indireta da atividade do sistema de captação extraneuronal foi realizada pelo emprego de inibidores deste

sistema, seguida da obtenção de curvas concentração efeito à isoprenalina.

A tabela 8 e a figura 10 mostram que, após este tratamento, a supersensibilidade à isoprenalina ainda está presente, embora atenuada. Porém, as curvas concentração-efeito à isoprenalina, obtidas em átrios direitos isolados de ratas durante o diestro pertencentes ao grupo normal antes e após a desnervação "in vitro", apresentam-se deslocadas à direita e a magnitude desta alteração de sensibilidade, avaliada pela comparação dos respectivos pD_2 , foi de 1,7 vezes ($p < 0,05$).

Resultados similares foram obtidos em átrios de ratas submetidas à natação e sacrificadas durante o diestro antes e após a tratamento "in vitro"; as respectivas curvas concentração-efeito apresentam-se também deslocadas à direita (2,8 vezes, $p < 0,05$). A tabela 9 apresenta de forma quantitativa os resultados ilustrados pelas figuras 11 e 12.

TABELA 5. Efeitos da NATAÇÃO durante 50 minutos sobre a sensibilidade do átrio direito de ratos e ratas à ISOPRENALINA.

GRUPO	N ^a	pD ₂ ^b	RAZÃO ^c	FI ^d (bat/min)	RM ^d (bat/min)
MACHOS					
normal	6	8,74(0,14)	-	290(10)	115(15)
natação	9	10,22(0,17)*	30,1	320(55)	120(10)
FEMEAS/DIESTRO					
normal	6	8,69(0,04)	-	283(8)	145(16)
natação	6	9,15(0,15)*	2,9	277(11)	152(15)
FEMEAS/ESTRO					
normal	6	8,79(0,11)	-	290(16)	138(10)
natação	6	8,79(0,10)	1,0	260(7)	142(12)

a número de experimentos

b logaritmo negativo da concentração molar de isoproterenol que determina uma resposta igual a 50% da resposta máxima; valores médios acompanhados dos erros padrões das médias.

c antilog das diferenças entre os valores pD₂.

* diferença significativa (p<0,05).

d valores médios de frequência inicial (FI) e de resposta máxima (RM) em batimentos por minuto, acompanhados dos respectivos erros padrões da média.

TABELA 6. Efeitos da NATAÇÃO durante 50 minutos sobre a sensibilidade do átrio direitos isolados de ratas em DIESTRO à isoprenalina (ISO), noradrenalina (NA) e adrenalina (ADR).

GRUPO	N ^a	pD ₂ ^b	RAZÃO ^c	FI ^d (bat/min)	RM ^d (bat/min)
ISO					
normal	6	8.69(0.03)	-	350(17)	145(16)
natação	6	9.15(0.15)*	2.9	277(11)	152(15)
NA					
normal	6	7.61(0.12)	-	272(5)	152(14)
natação	6	7.74(0.06)	1.4	262(10)	138(11)
ADR					
normal	6	7.34(0.09)	-	252(10)	142(10)
natação	6	7.68(0.16)	2.2	270(13)	132(9)

a número de experimentos.

b logaritmo negativo da concentração molar de isoprenalina, noradrenalina e adrenalina que determina uma resposta igual a 50% da resposta máxima; valores médios acompanhados do erro padrão da média.

c antilog das diferenças entre os valores pD₂.

d valores médios de frequência inicial (FI) e de resposta máxima (RM) em batimentos por minuto, acompanhados dos respectivos erros padrões da média.

* diferença significativa ($p < 0.05$) com o respectivo grupo normal.

TABELA 7. Efeito da NATAÇÃO durante 50 minutos sobre a sensibilidade do átrio direito isolado de ratas em ESTRO à isoprenalina (ISO), noradrenalina (NA), adrenalina (ADR).

GRUPO	N ^a	pD ₂ ^b	RAZAO ^c	FI ^d (bat/min)	RM ^d (bat/min)
ISO					
normal	6	8.79(0.11)	-	290(16)	138(10)
natação	6	8.79(0.10)	1.0	267(7)	142(12)
NA					
normal	6	7.31(0.12)	-	246(8)	136(11)
natação	6	7.39(0.07)	1,2	260(4)	146(14)
ADR					
normal	6	6.92(0.11)	-	248(8)	145(15)
natação	6	6.99(0.06)	1,1	260(4)	158(9)

a número de experimentos

b logaritmo negativo da concentração molar de isoprenalina, noradrenalina ou adrenalina que determina uma resposta igual a 50% de resposta máxima; valores médios acompanhados do erro padrão da média.

c antilogaritmo das diferenças entre os valores pD₂

d valores médios de frequência inicial (FI) e de resposta máxima (RM) em batimentos por minuto, acompanhados dos respectivos erros padrões da média.

TABELA 8. Efeito cronotrópico da ISOPRENALINA em átrios direitos isolados de ratas em diestro normais e submetidas à natação durante 50 minutos. Os experimentos foram realizados após TRATAMENTO "in vitro" com 6-hidroxidopamina, fenoxibenzamina e corticosterona.

GRUPO	N ^a	pD ₂ ^b	RAZÃO ^c	FI ^d (bat/min)	RM ^d (bat/min)
FEMEAS/DIESTRO					
normal	6	8,46(0,05)	-	273(5)	182(8)
natação	6	8,69(0,04)*	1,7	260(5)	178(13)

a número de experimentos

b logaritmo negativo da concentração molar de isoprenalina que determina uma resposta igual a 50% de resposta máxima; valores médios acompanhados do erros padrões das médias.

c antilogaritmo das diferenças entre os valores pD₂.

d valores médios de frequência inicial (FI) e de resposta máxima (RM) em batimentos por minuto, acompanhados dos respectivos erros padrões das médias.

* diferença significativa (p<0,05) com o respectivo grupo normal.

TABELA 9. Efeito do TRATAMENTO "in vitro" com 6-hidroxidopamina, fenoxibenzamina e corticosterona sobre a sensibilidade à ISOPRENALINA em átrios direitos de ratas em diestro submetidas à natação.

GRUPOS	N ^a	TRATAMENTO	pD ₂ ^b	RAZÃO ^c	FI ^d (bat/min)	RM ^d (bat/min)
normal	6	NÃO	8,69(0,03)	-	350(17)	145(16)
normal	6	SIM	8,46(0,05)*	1,7	273(5,5)	182(8)
natação	6	NÃO	9,15(0,15)	-	277(11)	152(15)
natação	6	SIM	8,69(0,04)*	2,8	260(5)	178(13)

a número de experimentos.

b logaritmo negativo da concentração molar de isoprenalina que determina uma resposta igual a 50% de resposta máxima; valores médios acompanhados dos erros padrões das médias.

c antilogaritmo das diferenças entre os valores pD₂.

d valores médios da frequência inicial (FI) e de resposta máxima (RM) em batimentos por minuto, acompanhados dos respectivos erros padrões das médias.

* diferença significativa ($p < 0,05$) com o respectivo grupo normal.

4.4. EFEITO DA NATAÇÃO SOBRE OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CORTICOSTERONA.

Ratos submetidos à natação apresentam um aumento significativo ($p < 0,05$) na concentração plasmática de corticosterona (cerca de 2,2 vezes) em relação ao grupo controle (tabela 10).

Ratas submetidas à natação também apresentam, como os machos, um aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona. Entretanto, a magnitude deste aumento depende da fase do ciclo em que o "stress" é aplicado. A natação durante o diestro, determina um aumento de cerca de 5.0 vezes ($p < 0,05$) na corticosterona circulante, enquanto que o mesmo procedimento durante o estro, determina um aumento de apenas 2.0 vezes ($p < 0,05$), em relação aos respectivos grupos controles (figura 13).

TABELA 10. Níveis plasmáticos de corticosterona em ratos machos e fêmeas normais ou submetidas à natação durante o diestro ou o estro.

GRUPO	N ^a	CORTICOSTERONA ^b (ug/100 ml plasma)	RAZÃO ^c
MACHOS			
normal	7	12.4(2.0)	-
natação	5	27.1(4.3)*	2.2
FEMEAS/DIESTRO			
normal	6	14.9(1.7)	-
natação	6	75.8(8.3)*	5.1
FEMEAS/ESTRO			
normal	6	9.8(0.6)	-
natação	6	20.0(4.9)*	2.0

a números de experimentos

b valores médios acompanhados de erro padrão da média.

c diferença entre os valores médios relacionados ao grupo controle e natação.

* diferença significativa ($p < 0,05$) com relação ao respectivo grupo normal.

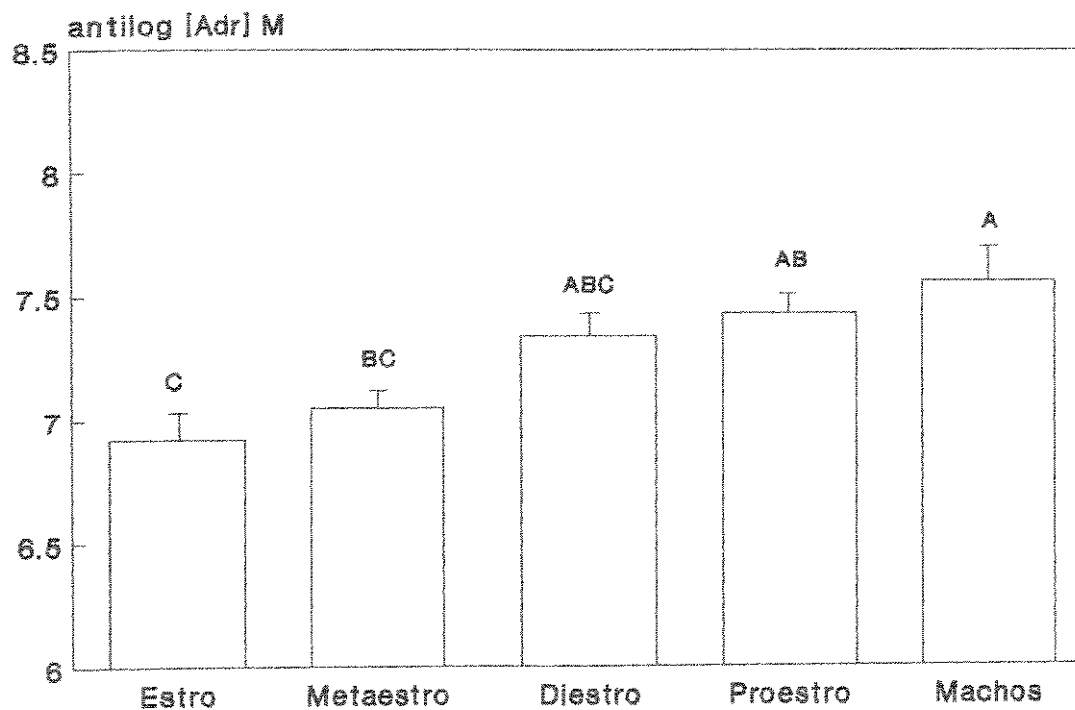


Figura 1. Valores médios de pD_2 para o efeito cronotrópico da adrenalina em átrios direitos de ratos normais, machos e fêmeas nas diferentes fases do ciclo estral. As barras verticais indicam o erros padrões das médias. A, B, C e D mostram o resultado da análise de variância. Letras diferentes indicam diferenças significativas a nível de 5%.

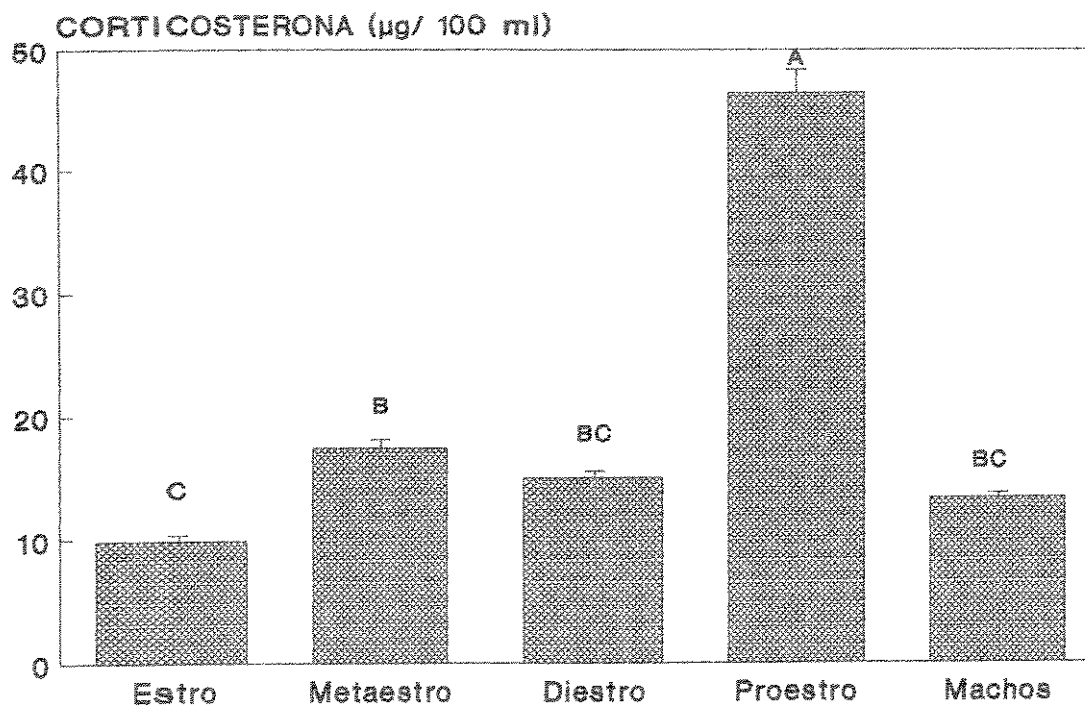


Figura 2. Níveis plasmáticos de corticosterona em ratos normais machos e fêmeas durante as diferentes fases do ciclo estral. As barras verticais indicam o erros padrões das médias. A, B, C e D mostram o resultados da análise de variância. Letras diferentes indicam diferenças significativas a nível de 5%.

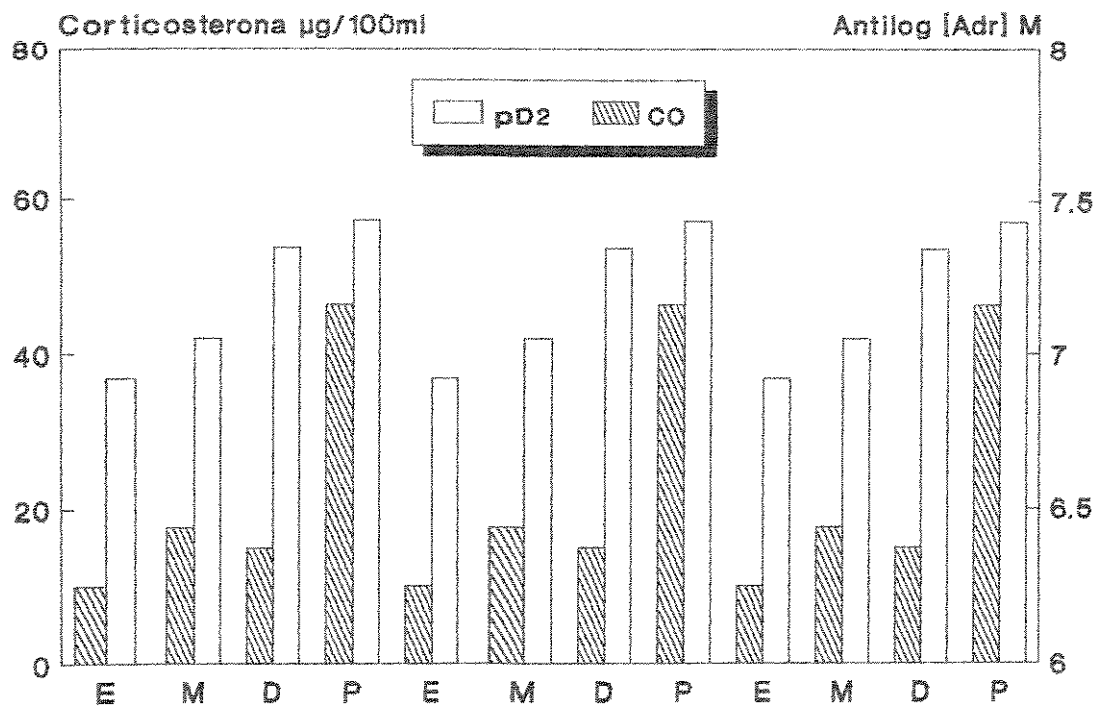


Figura 3. Valores médios de pD₂ para o efeito cronotrópico da adrenalina em átrios direitos e níveis plasmáticos de corticosterona, em ratas normais nas fases do ciclo estral ($r=0,75$).

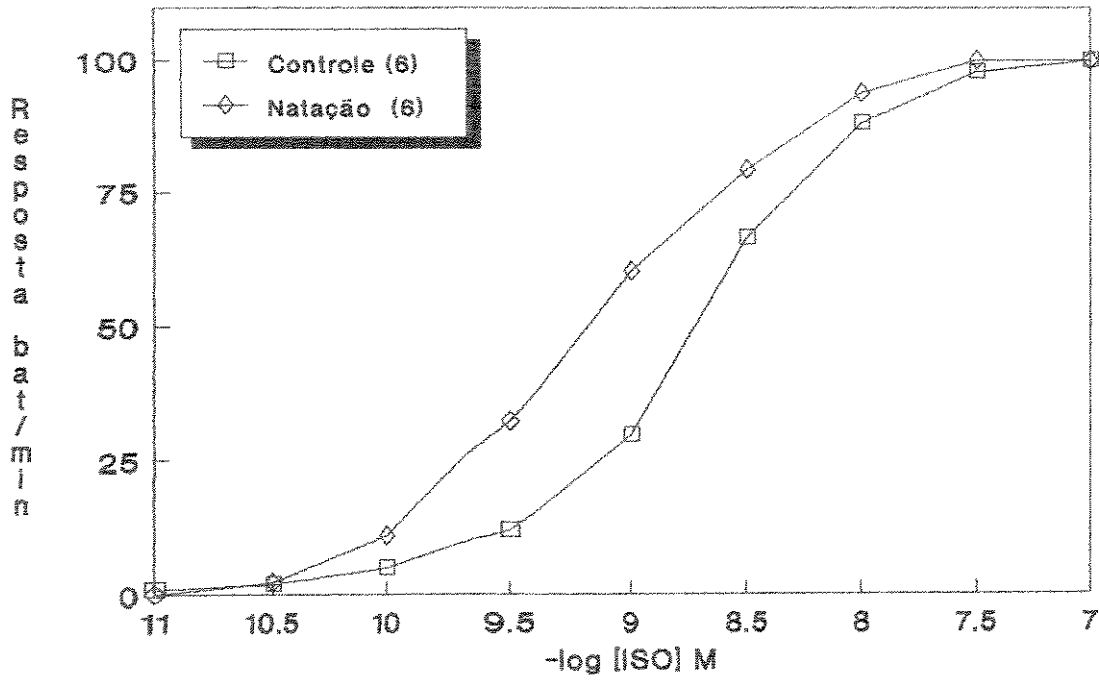


Figura 4 . Curvas concentração-efeito para a ISOPRENALINA em átrios direitos de ratas normais ou submetidas à natação durante o DIESTRO. Os números entre parênteses representam o número de experimentos.

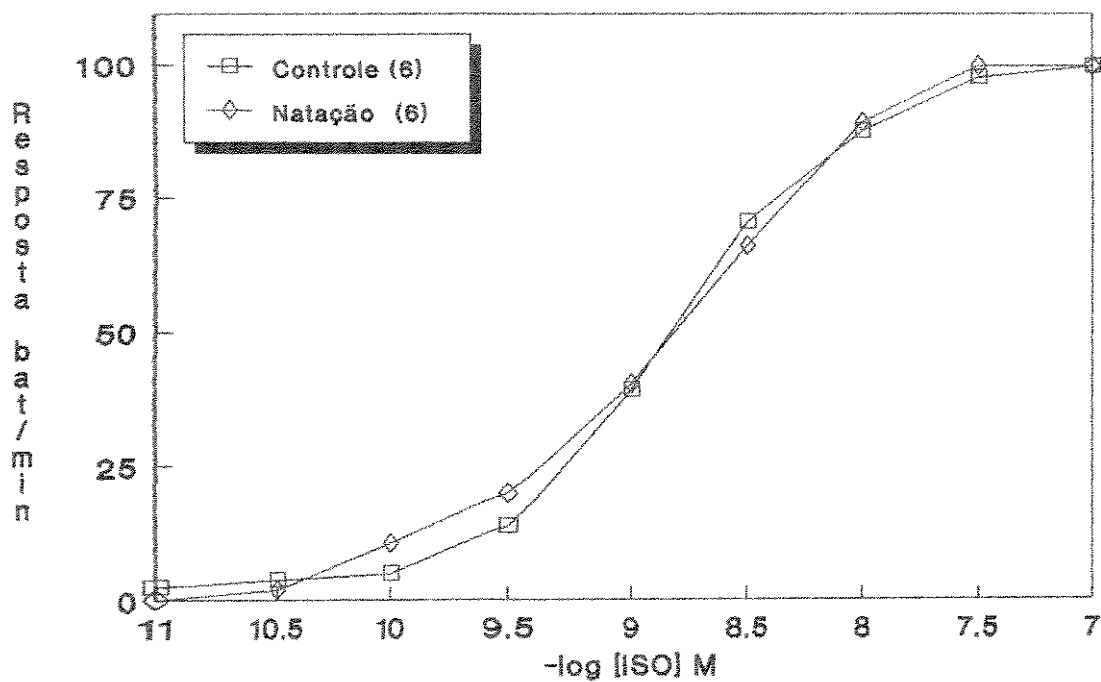


Figura 5. Curvas concentração-efeito para a ISOPRENALINA em átrios direitos de ratas normais ou submetidas à natação durante o ESTRO. Os números entre parênteses representam o número de experimentos.

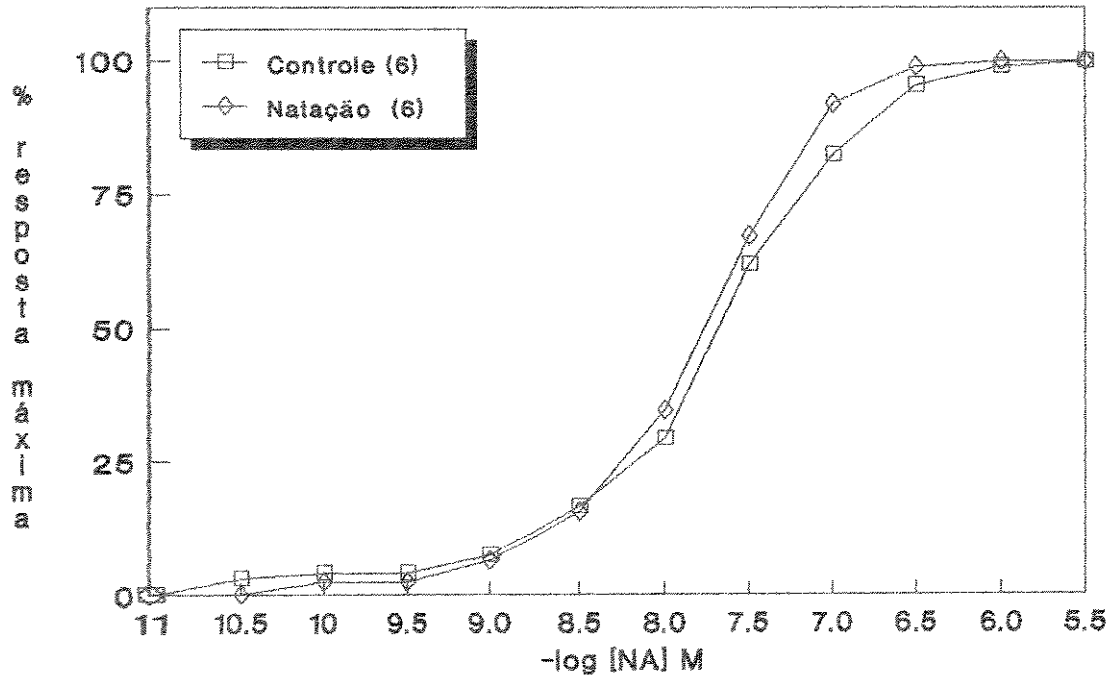


Figura 6. Curvas concentração-efeito para a NORADRENALINA em átrios direitos de ratas normais ou submetidas à natação durante o DI ESTRO. Os números entre parênteses representam o número de experimentos.

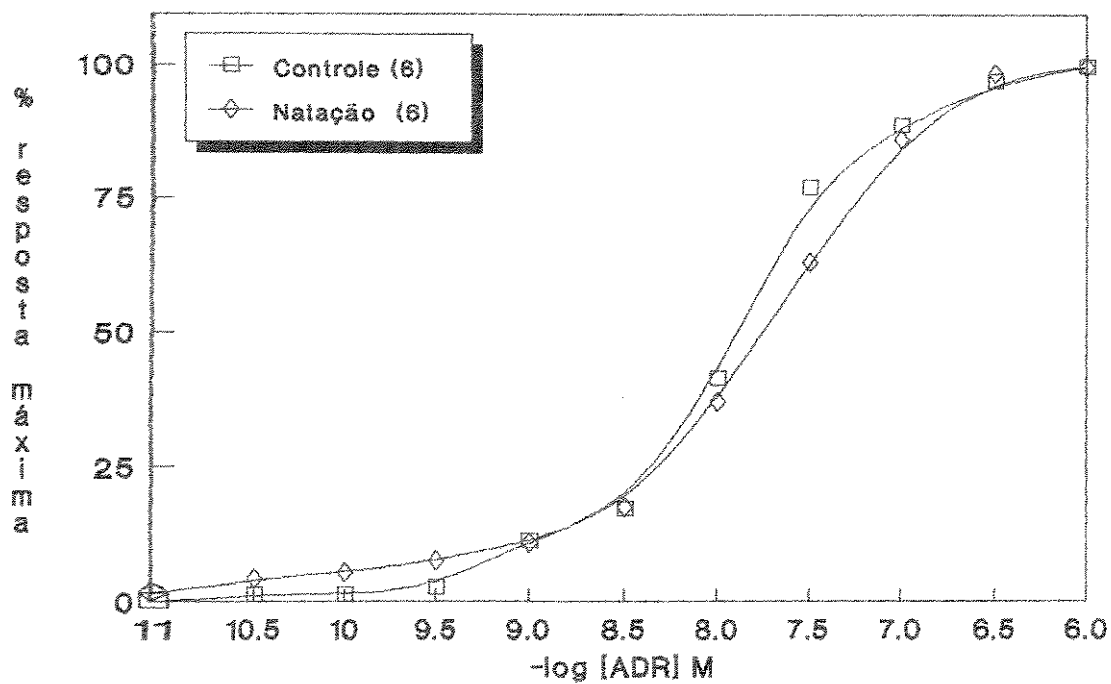


Figura 7. Curvas concentração-efeito para a **ADRENALINA** em átrios direitos de ratas normais ou submetidas à natação durante o **DIESTRO**. Os números entre parênteses representam o número de experimentos.

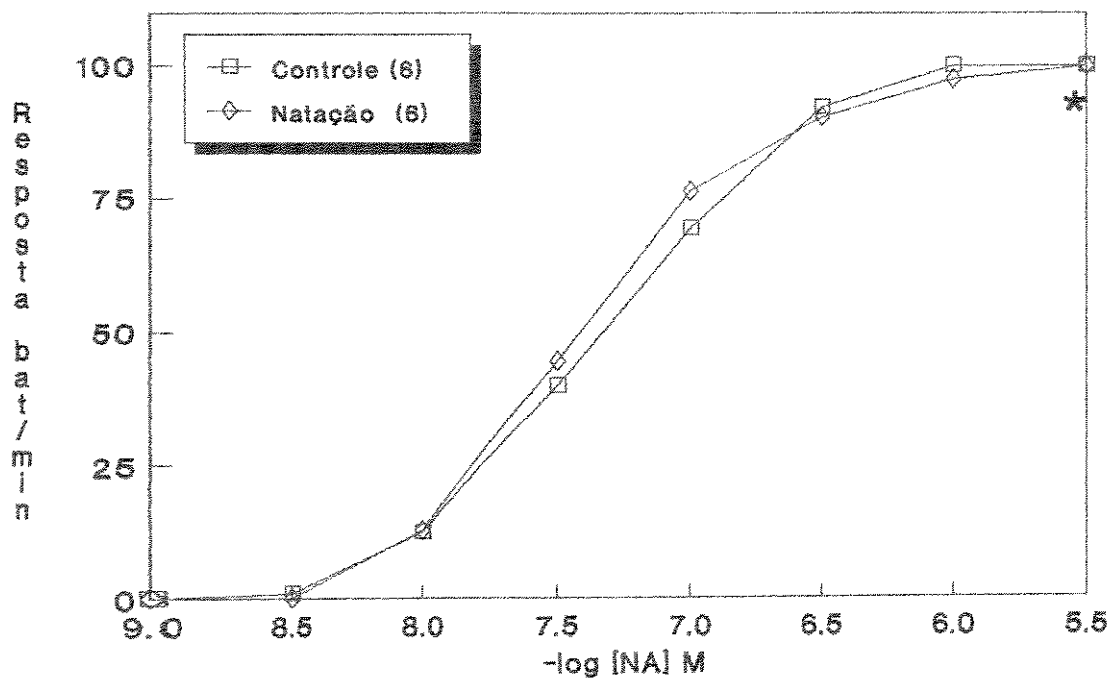


Figura 8. Curvas concentração-efeito para a **NORADRENALINA** em átrios direitos de ratas normais ou submetidas à natação durante o **ESTRO**. Os números entre parênteses representam o número de experimentos.

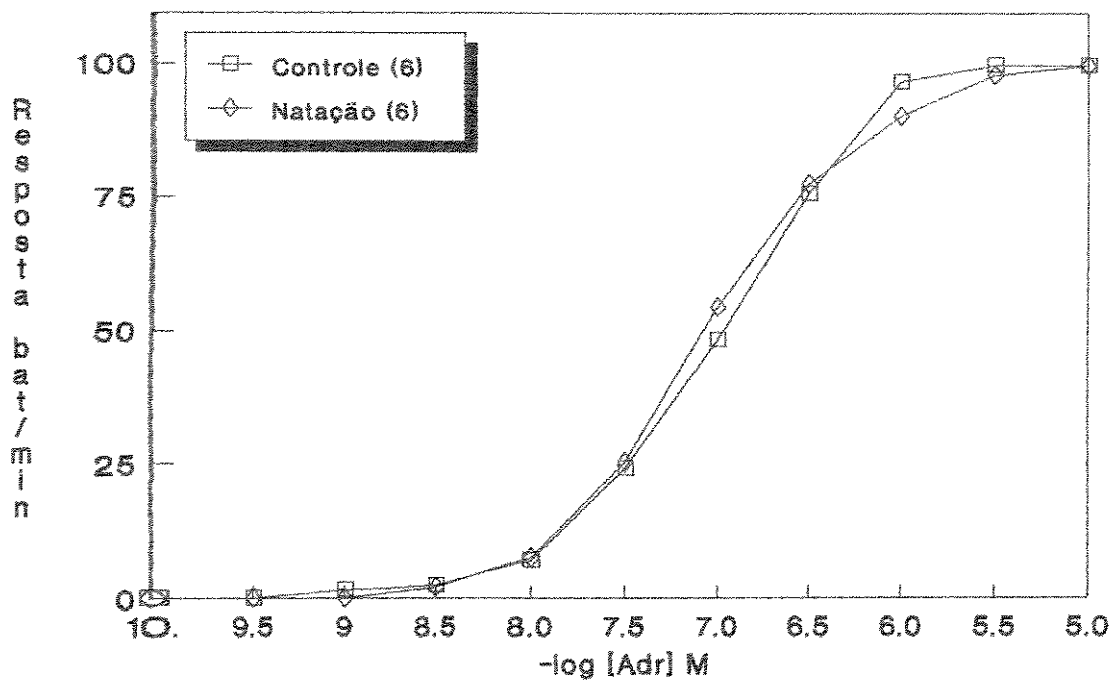


Figura 9. Curvas concentração-efeito para a ADRENALINA em átrios direitos de ratas normais ou submetidas à natação durante o ESTRO. Os números entre parênteses representam o número de experimentos.

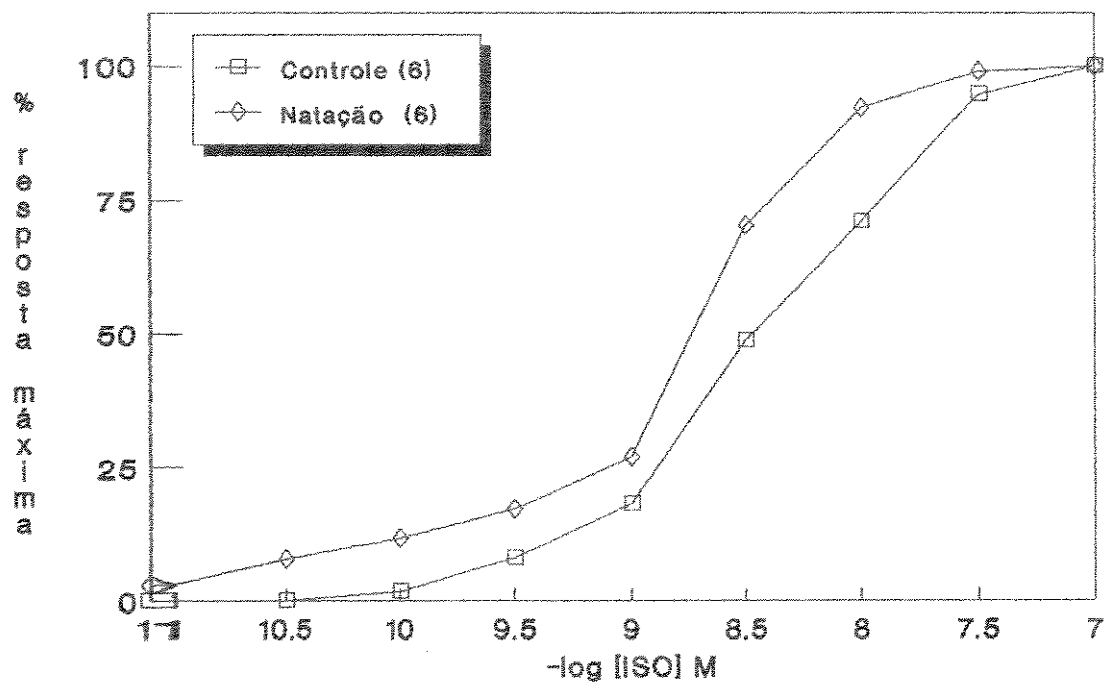


Figura 10. Curvas concentração-efeito para a ISOPRENALINA em átrios direitos de ratas, normais ou submetidas à natação durante o DIESTRO. Os átrios foram pré-tratados "in vitro" com fenoxibenzamina, 6-hidroxidopamina e corticosterona. Os números entre parênteses representam o número de experimentos.

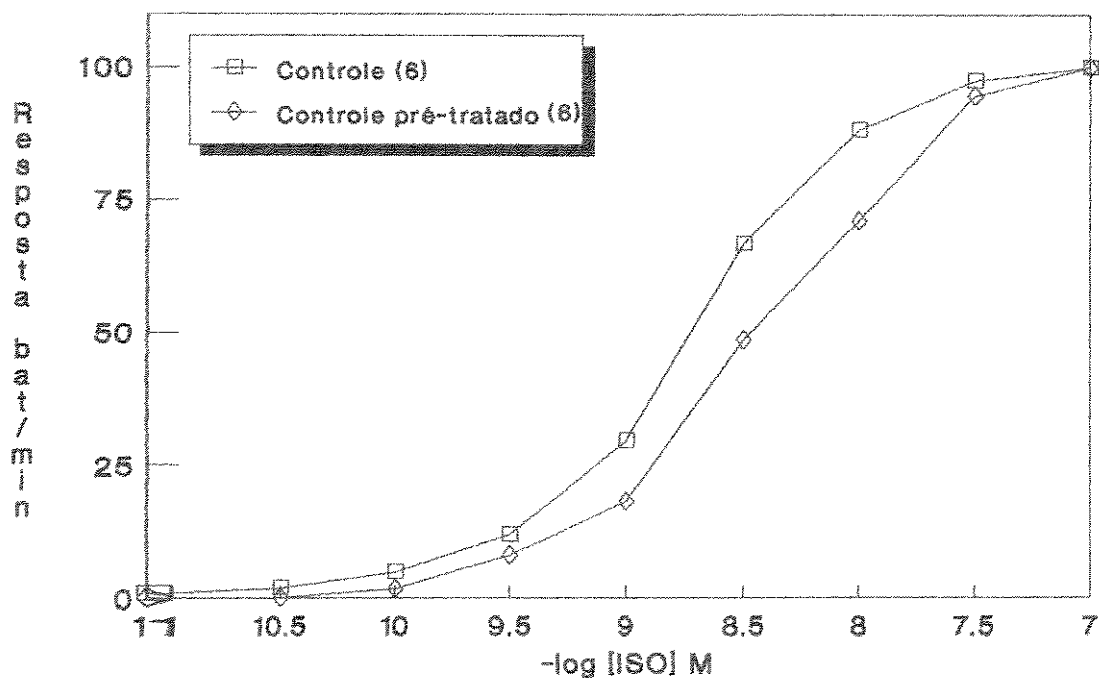


Figura 11. Curvas concentração-efeito para a ISOPRENALINA, antes e depois de pré-tratamento, em átrios direitos de ratas, normais durante o DIESTRO. Os átrios foram pré-tratados "in vitro" com fenoxibenzamina, 6-hidroxidopamina e corticosterona. Os números entre parênteses representam o número de experimentos.

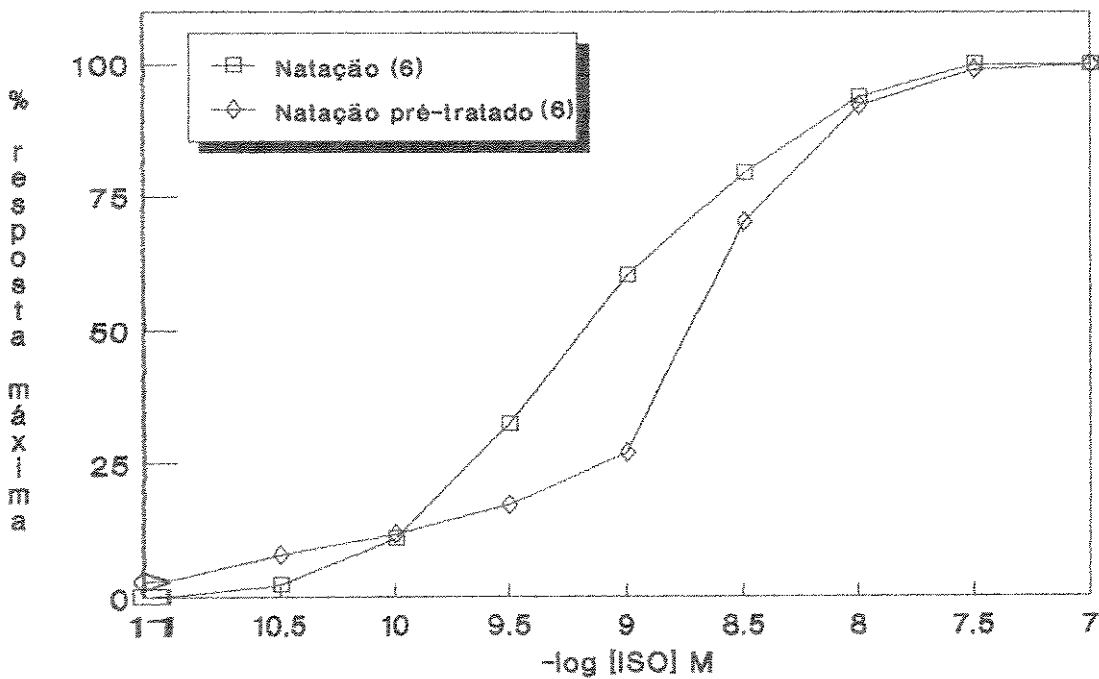


Figura 12. Curvas concentração-efeito para a ISOPRENALINA, antes e depois de pré-tratamento, em átrios direitos de ratas submetidas à natação durante o DIESTRO. Os átrios foram pré-tratados "in vitro" com fenoxibenzamina, 6-hidroxidopamina e corticosterona. Os números entre parênteses representam o número de experimentos.

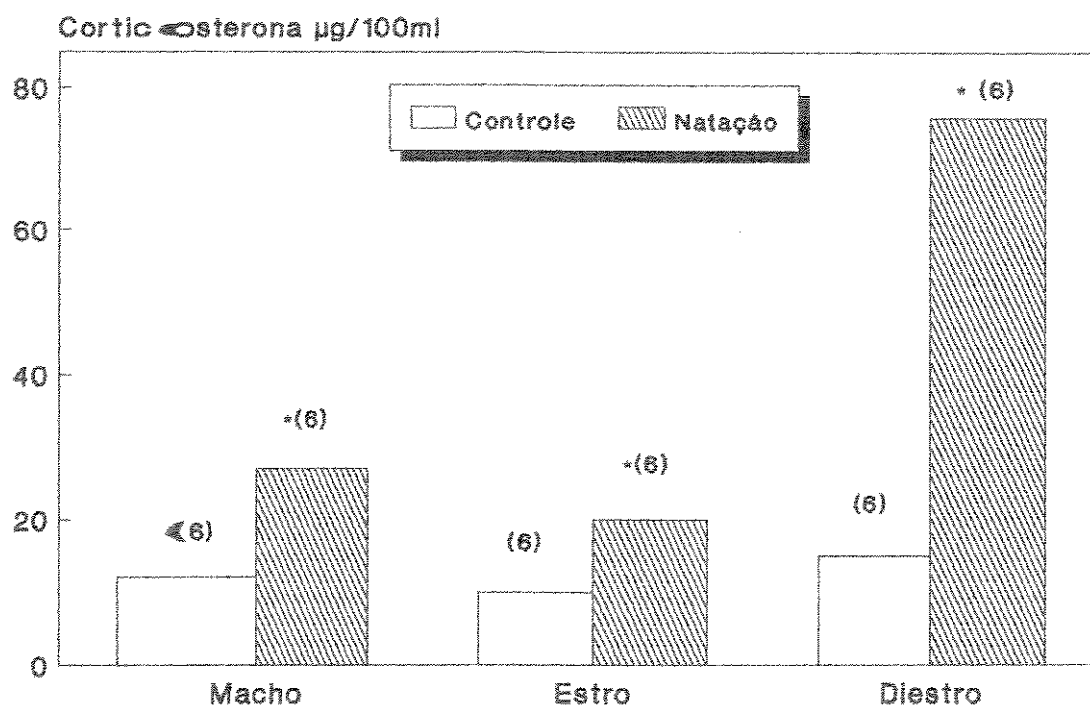


Figura 13. Níveis plasmáticos de corticosterona de ratos machos e fêmeas em diestro e estro, normais ou submetidos à natação durante 50 minutos. Os números entre parênteses representam o número de experimentos.

5. DISCUSSÃO

Ao iniciarmos este trabalho, era nosso objetivo comparar as alterações de sensibilidade às catecolaminas desencadeadas pelo estresse, em átrios direitos de ratas, com aquelas observadas anteriormente no mesmo tecido isolado de ratos (SPADARI & DE MORAES, 1988), uma vez que fêmeas apresentam diferenças importantes em relação aos machos, quanto ao padrão de secreção de corticosterona.

Embora a literatura fosse rica em informações quanto aos níveis plasmáticos de corticosterona observados em ratas normais durante o ciclo estral, não encontramos estudos relacionando a sensibilidade às catecolaminas com as fases do ciclo reprodutivo.

Iniciamos, por esta razão, pela determinação da sensibilidade à isoprenalina, noradrenalina e adrenalina de átrios direitos isolados de ratas normais, em cada uma das fases do ciclo estral.

Nossos resultados mostraram que não houve diferença significativa na sensibilidade à isoprenalina e à noradrenalina, quando comparávamos átrios direitos isolados de machos e de fêmeas em diestro, proestro, estro ou metaestro. Entretanto, verificamos que a sensibilidade do tecido atrial de ratas à adrenalina oscilava em consonância com as fases do ciclo: o menor valor de sensibilidade foi observado na manhã do estro; esta aumentava progressivamente, até alcançar um pico durante o proestro.

O teste de correlação demonstrou que havia correlação positiva entre a sensibilidade à adrenalina dos átrios direitos de ratas e os níveis basais de corticosterona: os valores mais baixos das duas variáveis eram observados durante o estro, aumentavam progressivamente no decorrer do ciclo estral até atingirem o pico durante o proestro.

Entre os hormônios sexuais, o estradiol é apontado como responsável pela ação estimulatória exercida pelas gônadas sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (KITAY, 1968; PHYLLIPS & POOLSANGUAN, 1978; LENIEWSKA & ET AL., 1990). Como consequência desta ação, fêmeas apresentam níveis plasmáticos de ACTH e de corticosterona mais elevados do que machos (KITAY, 1968; LENIEWSKA & ET AL., 1990). Os níveis plasmáticos de corticosterona e de estradiol exibem correlação positiva entre si durante o ciclo estral (YOSHINAGA & ET AL., 1969; PHYLLIPS & POOLSANGUAN, 1978): os níveis basais de estradiol observados durante o estro, começam a aumentar na manhã do metaestro, continuam aumentando no diestro, e atingem o pico de concentração na tarde do proestro (YOSHINAGA & ET AL., 1969), como ocorre com os níveis plasmáticos de corticosterona.

Assim como o estradiol, níveis basais de LH, FSH, prolactina e progesterona são observados durante o estro, após os picos de secreção característicos da tarde do proestro (FREEMAN, 1988).

O estradiol e a corticosterona exercem importante ação inibitória sobre o sistema de captação extra-neuronal de catecolaminas (IVERSEN, 1963). Assim sendo, é provável que a cinética deste sistema oscile ao longo do ciclo estral, de acordo com os níveis hormonais vigentes.

A afinidade do sistema de captação extra-neuronal pela noradrenalina é baixa. É alta, entretanto, a afinidade deste sistema pela isoprenalina e pela adrenalina (IVERSEN, 1963; 1965; BONISCH, 1980 a, b). Deste modo, no estro quando são baixos os níveis plasmáticos de corticosterona e de estradiol, o sistema de captação extra-neuronal estaria operando livremente para captar e metabolizar a adrenalina. A medida que os níveis destes hormônios se elevam progressivamente nas fases seguintes, o sistema seria inibido, também progressivamente, permitindo que uma maior concentração do

agonista permaneça em contato com seus receptores. Este efeito determinaria aumentos dos valores pD_2 , condizentes com desvios proporcionais, à esquerda, das curvas concentração-efeito à adrenalina, obtidas no estro, metaestro, diestro e proestro. O pico de inibição do sistema de captação extra-neuronal seria simultâneo aos valores máximos de corticosterona e de estradiol, ou seja, no proestro, como demonstram nossos resultados.

Em vista destes resultados, passamos a estudar a sensibilidade às catecolaminas de átrios direitos isolados de ratas submetidas ao estresse por uma sessão de natação durante o diestro ou o estro. Optamos pelas fases de diestro e estro porque não havia diferença de sensibilidade a nenhum dos três agonistas de adrenoceptores em átrios direitos isolados de ratas sacrificadas nestas duas fases do ciclo, embora o ambiente hormonal apresentasse características bem diferentes.

Durante o estro são registrados níveis basais de LH, FSH, prolactina, estradiol e progestágenos, após os picos de secreção característicos da tarde do proestro (FREEMAN, 1988).

No diestro, prolactina e FSH estão baixos, ocorre um pico de secreção de progesterona e a secreção de estradiol está aumentando. O padrão de secreção de LH mostra picos horários durante o diestro (FREEMAN, 1988).

Os resultados aqui apresentados demonstram que átrios isolados de ratas submetidas ao estresse, também apresentam alterações de sensibilidade ao efeito cronotrópico das catecolaminas, como ocorre em átrios isolados de machos submetidos ao mesmo agente. Entretanto, em fêmeas, estas alterações dependem da fase do ciclo estral em que o animal se encontra no momento do estresse e do sacrifício.

Durante o diestro, 50 minutos de natação determinaram aumento de sensibilidade à isoprenalina no átrio direito de ratas. Esta supersensibilidade foi evidenciada por um desvio à esquerda na curva concentração-efeito a este agonista de adrenoreceptores beta, de cerca de três vezes. O mesmo procedimento determinava um desvio de dez vezes na curva concentração-efeito à isoprenalina em átrios direitos isolados de ratos (SPADARI & DE MORAES, 1988). Estes resultados parecem indicar que mecanismos semelhantes, porém não idênticos, são desencadeados em átrios direitos de ratos e de ratas em diestro e que, como ocorria em machos, a corticosterona poderia mediar este efeito.

A natação não determina alterações de sensibilidade a nenhum dos agonistas, se aplicada durante o estro.

O aumento provocado no nível plasmático de corticosterona em ratas submetidas a uma sessão de natação foi de 5 vezes, durante o diestro e de 2 vezes durante o estro; enquanto que em machos o aumento foi de 3 vezes (SPADARI & DE MORAES, 1988).

Vários autores afirmam que a magnitude do aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona em resposta ao estresse depende da fase do ciclo estral (KITAY, 1961; POLLARD & ET AL., 1965; BARON & BRUSH, 1979; DUPOUY & ET AL., 1987). BARON & BRUSH (1979) observaram que estresse por imobilização provoca aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona, apenas durante o estro. VIAU & MEANEY (1991) observaram aumento maior da corticosterona plasmática durante o proestro do que durante o estro ou o diestro. Ratas ovariectomizadas e tratadas com esteróides sexuais de modo a mimetizar cada uma das fases do ciclo estral apresentavam aumentos similares na corticosterona, após imobilização. Entretanto, aquelas mantidas a níveis estrogênicos mais elevados mantiveram por mais tempo os

altos níveis de corticosterona em resposta ao estresse (VIAU & MEANEY, 1991).

Estes dados sugerem que níveis estrogênicos altos estimulam a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em resposta a estímulos estressores. Assim sendo, o maior aumento de corticosterona em resposta ao estresse por natação que nós observamos durante o diestro poderia ser explicado pelos níveis estrogênicos em ascensão, nesta fase do ciclo. Durante o estro, quando os níveis de estrógenos são baixos, a secreção de corticosterona em resposta à natação seria atenuada.

O pré-tratamento do tecido atrial com inibidores do sistema de captação extraneuronal revelou que parte da supersensibilidade à isoprenalina, observada após natação durante o diestro, deve-se à inibição deste sistema, provavelmente exercida pela corticosterona. Este mecanismo é semelhante ao que ocorre em ratos (SPADARI & DE MORAES, 1988) porém apresenta maior complexidade uma vez que, em machos, a inibição do sistema de captação extra-neuronal abole completamente a supersensibilidade, enquanto que, em ratas, o tecido ainda apresenta supersensibilidade à isoprenalina.

Durante o estro, embora ocorra um aumento de 2 vezes na corticosterona plasmática, não registramos aumento de sensibilidade à isoprenalina no tecido atrial direito.

Este fato poderia indicar que as fêmeas, por apresentarem alterações cíclicas nos níveis plasmáticos de corticosterona, teriam desenvolvido algum mecanismo adaptativo, atenuando as alterações de sensibilidade adrenérgica do tecido cardíaco em resposta às oscilações da corticosterona. Neste caso, apenas aumentos muito maiores nas taxas de secreção de corticosterona seriam suficientes para determinar alteração de

sensibilidade à isoprenalina, como acontece em machos. Além disso, a inibição do sistema de captação extraneuronal não cancelou completamente a sensibilidade à isoprenalina e adrenalina de ratas em diestro como ocorreu em átrios direitos de ratos (SPADARI & DE MORAES, 1988), sugerindo que os mecanismos adaptativos desencadeados pelo estresse, em machos e em fêmeas, são diferentes.

6. CONCLUSÕES

A análise dos dados aqui apresentados permite concluir que:

1. átrios direitos isolados de ratas normais apresentam oscilações cíclicas de sensibilidade à adrenalina, a qual é baixa no estro e aumenta progressivamente nas fases seguintes, para atingir um pico no proestro,

2. há uma correlação positiva entre a sensibilidade do átrio direito à adrenalina, os níveis plasmáticos de corticosterona e as fases do ciclo estral,

3. a sensibilidade à noradrenalina e à isoprenalina do átrio direito isolado de ratas normais não varia durante o ciclo estral,

4. estresse por uma sessão de natação determina supersensibilidade à isoprenalina em átrios direitos de ratas, se aplicado durante o diestro, mas não durante o estro,

5. esta supersensibilidade é atenuada após desnervação e inibição do sistema de captação extra-neuronal,

6. as alterações de sensibilidade às catecolaminas observadas em átrios direitos isolados de ratos submetidos a estresse dependem do sexo do animal, da fase do ciclo estral (no caso das fêmeas), e do aumento dos níveis de corticosterona provocado pelo estresse.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABRASS, I.B. & SCARPACE, P.I. (1981b). Glucocorticoid regulation of myocardial beta-adrenergic receptors. *Endocrinology*, 108: 977-980.
- APRIGLIANO, O. & HERMSMEYER, K.(1976). In vitro denervation of the portal vein and caudal artery of the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 198: 568-577.
- AHLQUIST, R.P.(1948). A study of adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol.*, 153: 586-600.
- ASTWOOD, E.B. (1939). Changes in the weight and water content of the uterus of the normal adult rat. *Amer. J. Med.*, 126: 162-170.
- BANERJEE, S.P.; RIGGI, J.J. & CHANDA, S.K. (1977). Development of beta-adrenergic receptor subsensitivity by acute-depressants. *Nature (London)*, 268: 455-456.
- BARON, S. & BRUSH, R. (1979). Effects of acute and chronic restraint and oestrous cycle on pituitary-adrenal function in the rat. *Horm. Beh.*, 12: 218-224.

BASSANI, R.A. & DE MORAES, S. (1986). Variações de sensibilidade a catecolaminas em átrios direitos isolados de ratos submetidos a choque na pata. I Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, São Paulo. Anais, p.299.

_____. Subsensitivity to beta adrenoceptor agonists in right atria isolated from footshock stressed rats. Gen. Pharmacol., 18: 473-477.

BASSANI, R.A. (1988). Alterações de sensibilidade às catecolaminas em átrios direitos isolados de ratos submetidos a choque na pata. Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - Departamento de Fisiologia e Biofísica.

BAXTER, J.D. & FORSHAM, P.H. (1972). Tissue effect of glucocorticoids. Am. J. Med., 53: 573.

BORDIN, S.A. & SPADARI, R.C. (1988). Sensibilidade do átrio direito de ratas ao efeito cronotrópico do isoproterenol: efeito das fases do ciclo estral. III Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Anais, 7.2.

BERRIDGE, D.B. (1985). The molecular bases of communication within the cell. Scientific American., 253: 124-136.

- BONISCH, H. & TRENDELENBURG, U. (1974). Extraneuronal removal, accumulation and O-methylation of isoprenaline in the perfused heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 283: 191-218.
- BONISCH, H. (1980a). Extraneuronal transport of catecholamines. *Pharmacology*, 21: 93-108.
- _____. Further studies on the extraneuronal uptake and metabolism of isoprenaline in the perfused rat heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 303: 121-131.
- BOYAJIAN, C. L. & LESLIE, F.M. (1987). Pharmacological evidence for alpha2 adrenoceptor heterogeneity: Differential binding properties of H3 idazoxan in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 241: 1092-1098.
- BOYAJIAN, C. L.; LOUGHLIN, S.E. & LESLIE, F.M. (1987). Anatomical evidence for alpha2 adrenoceptor heterogeneity: Differential autoradiographic distribution of H3 rauwoscine and H3 idazoxan in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 241: 1079-1090.
- BRYAN, L.J., COLE, J.J., O'DONNELL, S.R. & WANSTALL, J.C. (1981). A study designed to explore the hypothesis that beta1 adrenoceptors are innervated receptors and beta2 adrenoceptors are "hormonal" receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 216: 395-400.

- BUCKINGHAM, J.; DOHLER, K.D. & WILSON, C. (1978). Activity of the pituitary—adrenocortical system and thyroid gland during the oestrous cycle of the rat. *J. Endocrinol.*, 78: 359-366.
- BURGEN, A.S. & IVERSEN, L.L. (1965). The inhibition of noreadrenaline uptake by sympathomimetic amines in the rat isolated heart. *Br. J. Pharmacol. - Chemother.*, 25: 34-49.
- BYLUND, D.B. (1985). Heterogeneity of alpha2 adrenergic receptors. *Pharmacol. - Biochem. Behav.*, 22: 835-843.
- CALLIA, M.L. & DE MORAES, S. (1983). Supersensitivity to isoprenaline in right atria isolated from cold-exposed rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, 35: 196-197.
- _____. Heterogeneity of beta adrenoceptors in right atria isolated from cold-exposed rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 230: 450-454.
- CALLIGHAM, B. A. & BURGEN, A.S.V. (1966). The uptake of isoprenaline and noradrenaline by the perfused rat heart. *Mol. Pharmacol.*, 2: 37-42.
- CANNON, W.B. = QUERIDO, S.; BRITON, S.W. & BRIGHT, E.M. (1927). Studies on the conditions of activity in endocrine glands. The role of adrenal excretion in the chemical control of body temperature. *Am. J. Physiol.*, 79: 466-506.

CAPAZ, F.R. & DE MORAES, S. (1988). Reduction by acute restraint stress of norepinephrine sensitivity in the isolated rat pacemaker. *Eur. J. Pharmacol.*, 147: 295-298.

CRITCHLOW, V., LIEBELT, R.A., BAR-SELA, M., MENTCALTE, W. & LIPSCOMB, H.S. (1963). Sex difference in the resting pituitary-adrenal function in the rat. *Am. J. Physiol.*, 205: 807-815.

DAVIES, A.O. & LEFKOWITZ, R.J. (1981). Myocardial beta-adrenergic receptors from adrenalectomized rats impaired formation on high affinity agonist-receptors complexes. *Endocrinology*, 108: 720-722.

DUPOUY, J.P.; HARRY, L.; LALAU, J.D.; GREGOIRE, I. & CHATELAIN, A. (1987). Influence perinatale des hormones sexuelles sur l'activation differentielle de la fonction corticotrope au cours d'un stress chez le mâle et la femelle. *Ann. Endocrinol. (Paris)*, 48: 385-392.

FLEMING, W.W., WESTFALL, D.P., DE LA LAND, I.S. & JELLET, F.B. (1972). Log-normal distribution of equieffective doses of norepinephrine and acetylcholine in several tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 181: 339-345.

FREEMAN, M.E. (1988). The ovarian cycle of the rat. In: *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil & J. Neil (Ed.) Raven Press, LTD. New York.

- FUXE, K.; ANDERSON, K.; ENEROTH, P.; SIEGEL, R. A. & AGNATI, L. F. (1983). Immobilization stress-induced changes in discrete hypothalamic catecholamine levels and turnover: their modulation by nicotine and relationship to neuroendocrine function. *Acta Physiol. Scand.*, 117: 421-426.
- GLAUBIGER, C. & LEFKOWITZ, R. J. (1981). Elevated beta-adrenergic receptor number after chronic propranolol treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 78: 720-725.
- GRAHAM, R.M. & HOMCY, C.J. (1985). Molecular characterization of adrenergic receptors. *Cir. Res.*, 56: 635-650.
- HAN, C.; ABEL, P. W. & MINNEMAN, K. P. Alpha1 adrenoceptor subtypes linked to different mechanisms for increasing intracellular Ca²⁺ in smooth muscle. *Nature (London)*, 329: 333-335.
- HARRI, M. N. E.; MENDER, L. & TIRRI, R. (1974). Changed chronotropic sensitivity to sympathomimetic amines in isolated atria from rats following cold acclimation. *Experientia*, 30: 1041-1043.
- HAWINS, D.F. (1962). Studies on veratum alkaloid XXXIV. Actions of veratramine on spontaneously beating Guinea-pig atrium preparation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 137: 306-12.

- HIROSHIGE, T. & WADA-OKADA, S. (1973). Diurnal changes of hypothalamic content of corticotropin-releasing activity in female rats at various stages of estrous cycle. *Neuroendocrinology*, 12: 312-319.
- HOKFELT, T.; FAHRENKRUG, J.; TATEMOTO, K.; MUTT, V.; WERNER, S.; HULTING, A. L.; TRERENIUS, L. & CHANG, K. J. (1983). The PHI (PHI-27)/corticotropin releasing factor/enkephalin immunoreactive hypothalamic neuron: possible morphological basis for integrated control of prolactin, corticotropin and growth hormone secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 895-898.
- HOUSSAY, B. (1980) Ciclos Sexuais Femininos. In: *Fisiologia Humana*. Guanabara Koogan (Ed.) Rio de Janeiro.
- IVERSEN, L.L. (1963). The uptake of noradrenaline by the isolated perfused rat heart. *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, 21: 523-537.
- IVERSEN, L.L. & SALT, P.S. (1970). Inhibition of catecholamine uptake by steroids in the isolated rat heart. *Br. J. Pharmacol.*, 40: 528-530.
- KAJIYAMA, H.; OBARA, K.; NOMURA, Y. & SEGAWA, T. (1982). The increase of cardiac beta1 subtype of beta-adrenergic receptors in adult rats following neonatal 6-hydroxydopamine treatment. *Eur. J. Pharmacol.*, 77: 75-77.

- KANT, G.J.; OUGUY, E.H.; PENNINGTON, L.L. & MEYERHOFF, J.L. (1983). Graded footshock stress elevates pituitary cyclic AMP and plasma beta-endorphin, beta-LPH, corticosterone and prolactin. *Life Sci.*, 33: 2657-2663.
- KASPRZAK, A.; LESNIEWSKA, B. & MALENDOWICZ, L.C. (1986). Sex differences in adrenocortical structure and function. The effects of gonadectomy and testosterone or estradiol replacement on mitotic activity of the rat adrenal cortex. *Exp. Clin. Endocrinology*, 87: 26-30.
- KAUMANN, A.J. (1972). Potentiation of the effects of isoprenaline and noradrenaline by hydrocortisone in rat heart muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 273: 134-153.
- KENAKIN, T.P. & FERRIS, R.M. (1983). Effects of "in vivo" beta-adrenoceptor down-regulation on cardiac responses to penalterol and pirbuterol. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 5: 90-97.
- KIME, D.E.; VISON, G.P.; MAJOR, P.W. & KILPATRICK, R. (1980). Adrenal gonadal relationships. In: General, comparative and clinical endocrinology of the adrenal cortex. I. Chester-Jones, I.W.Henderson (eds), New York: Academic Press, vol.III, 183-264.
- KITAY, J. I. (1961). Sex differences in adrenal cortical secretion in the rat. *Endocrinology*, 68: 818-824.

- _____. Effects of estrogen and androgen on the adrenal cortex. K.W. McKerns (Ed.), New York: Appleton-Century Crofts Vol.II, 775-810.
- KUPFER, L.E. ; BILEZIKIAN, J.P. & ROBINSON, R.B. (1986). Regulation of alpha and beta adrenergic receptors by triiodothyronine in cultured rat myocardial cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 334: 2755-281.
- LANDS, A.M.; ARNOLD, A.; McAULIFF, J.P.; LUDUENA, F.P. & BROWN, I.B. (1967a). Differentiation of receptors systems activated by sympathomimetic amines. *Nature*, 241: 597-598.
- LANDS, A.M., LUDUENA, F.P. & BUZZO, H.J. (1967b). Differentiation of receptor responsiveness to isoproterenol. *Life Sci.*, 6: 2241-2249.
- LANGER, S.Z. (1974). Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochem. Pharmacol.*, 23: 1793-1800.
- LE BLANC, J. & NADEU, G. (1961). Urinary excretion of adrenaline in normal and cold adapted animals. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 39: 215-217.
- LE BLANC, J. & VILLEMAIRES, A. (1970). Thyroxine and noradrenaline sensitivity, cold resistance and brownfat. *Am. J. Physiol.*, 222: 1043-1046.

- LEDUC, J. (1961). Catecholamine production and release in exposure and acclimation to cold. *Acta Physiol. Scand. (suppl.)*, 183: 1-101.
- LENIEWSKA, B.; NOWAK, M. & MALENDOWICZ, K. (1990). Sex differences in adrenocortical structure and function XXVIII. ACTH and corticosterone in intact, gonadectomized and gonadal hormone replaced rats. *Horm. Met. Res.*, 22: 378-381.
- LIGHTMAN, S. L. & IVERSEN, L.L. (1969). The role of uptake₂ in the extraneuronal metabolism of catecholamines in the isolated rat heart. *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, 37: 638-649.
- LIMBIRD, L.E. (1984). GTP and Na⁺ modulate receptor-adenyl-cyclase coupling and receptor-mediated function. *Am. J. Physiol.*, 247: 59-68.
- LONG, J.A. & EVANS, H.M. (1922). The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Mem. Univ. Calif.*, 6: 1-148.
- MALENDOWICZ, L.K. (1976). Sex difference in adrenocortical structure and function. III. The effects of post-puberal gonadectomy and gonadal hormone replacement on adrenal cholesterol sidechain cleavage activity and on steroid biosynthesis by rat adrenal homogenates. *Endocrinology*, 67: 26-35.

- MANO, K., AKBARZADEH, H & TOWLEY, R.G. (1979). Effect of hydrocortisone on beta-adrenergic receptors in lung membranes. *Life Sci.*, 25: 1925-1930.
- MATTINGLY, D.A. (1962). A simple fluorimetric method for the estimation of free 11-hydroxycorticoids in human plasma. *J. Clin. Pathol.*, 15: 374-379.
- MINNEMAN, K.P., HEGSTRAND, L.R. & MOLINOFF, P.B. (1979). The pharmacological specificity of beta1 and beta2 adrenergic receptors in rat heart and lung "in vitro". *Mol. Pharmacol.*, 16: 21-33.
- MINNEMAN, K.P. & MOLINOFF, P.B. (1980). Classification and quantification of beta adrenergic receptor subtypes. *Biochem. Pharmacol.*, 29: 1317-1323.
- MICKEY, J.; TATE, R. & LEFKOWITZ, R.J. (1975). Subsensitivity of adenylate-cyclase and decreased beta-adrenergic receptor binding after chronic exposure to isoproterenol "in vivo". *J. Biol. Chem.*, 250: 2727-2729.
- NATELSON, B.H.; TAPP, W.N.; ADAMUS, J.E. & LEVIN, B.E. (1981). Humoral indices of stress in rats. *Physiol. Behav.*, 26: 1049-1054.

- NOURANI, F.R. R.; SPADARI, R.C. & DE MORAES, S. (1992) Footshock stress-induced supersensitivity to isoprenaline in the isolated pacemaker of the rat: effects of the compounds RU-38486 and RU-28362. *Gen. Pharmacol.* 23: 787-791.
- OSTMAN-SMITH, I. (1979). Adaptative changes in the sympathetic nervous system and some effector organs of the rat following long-term exercise or cold acclimation and the role of the cardiac sympathetic nerves in the genesis of compensatory cardiac hypertrophy. *Acta Physiol. Scand. (suppl.)*, 477: 1-118.
- PHYLLIPS, J. G. & POOLSANGUAN, W. (1978). A method to study temporal changes in adrenal activity in relation to sexual status in the female laboratory rat. *Br. J. Pharmacol.*, 84: 227-235.
- POLLARD, I.; WHITE, B.; BASSETT, J.R. & CAIRNCROSS, K.D. (1975). Plasma glucocorticoid elevation and desynchronization to sexual status in the female laboratory rat. *Behav. Biol.*, 14: 103-108.
- RAPS, D.; BARTHE, P.L. & DESAULLES, P.A. (1971). Plasma and adrenal corticosterone levels during the different phases of the sexual cycle in normal female rats. *Specialia*, 3: 339-340.
- SALT, P.J. (1972). Inhibition of noradrenaline uptake₂ in the isolated rat heart by steroids, clonidine and methoxylate phenmethyamines. *Eur. J. Pharmacol.*, 20: 329-340.

- SANO, M.; YOSHIHIRO, Y & YOMAMOTO, I. (1993). Non-homogeneous distribution of β_1 -and β_2 -adrenoceptors in various human tissues. *Life Sci.* , 52: 1063-1070.
- SCARPACE, P. J. & ABRASS, I.B. (1982). Desensitization of adenylyate-regulation of beta-adrenergic receptors after in vivo administration of beta agonistas. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 236: 24-29.
- SEVERSON, J. A.; PITTMAN, R.N.; GAL, J.; MOLLINOFF, P.B. & FINCH, C.E. (1986). Genetic influence on the regulation of beta adrenergic receptor in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 236: 24-29.
- SNAVELY, M.D.; MOTULSKY, H.J.; MOUSTAFA, E; MAHA, L.C. & MSEL, P.S. (1982). Beta-adrenergic sub-types in the rat renal cortex-selective regulation of beta-adrenergic receptors by pheochromocytoma. *Circ. Res.*, 51: 504-513.
- SNAVELY, M.D.; ZIEGLER, M.G. & INSEL, P.A. (1985). Subtype selective down-regulation of rat renal cortical alpha and beta-adrenergic receptors by catecholamines. *Endocrinology*, 117: 2182-2189.
- SPADARI, R.C. & DE MORAES, S. (1988). Repeated swimming stress and responsiveness of isolated rat pacemaker to chronotropic effect of noradrenaline and isoprenaline: role of adrenal corticosteroids. *Gen. Pharmacol.*, 19 (4): 553-5557.

- SPADARI, R.C. ; BASSANI, R.A. & DE MORAES, S. (1988). Supersensitivity to isoprenaline and epinephrine in right atria isolated from rats submitted to a single swimming session. *Gen. Pharmac.*, 19: 129-135.
- SPORN, F. R. ; HARDEN, T.K.; WOLFE, B.B. & MOLINOFF, P.B. (1976). Beta-adrenergic receptor involvement in 6-hydroxydopamine supersensitivity in rat cerebral cortex. *Nature*, 194: 624-626.
- STONE, E.A.; SHECKY, A.V.; PLATT, J.E. & TRULLAS, R. (1985). Reduction of the cyclic adenosine 3-5 monophosphate response to catecholamines in rat brain slices after repeated restraint stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* , 233: 382-388.
- STONE, E.A.; PLATT, J.E.; HERRERA, A.S. & KIRK, K.L. (1986). Effect of repeated restraint stress, desmethyl-imipramine or adrenocorticotropin on the alpha and beta components of the cyclic AMP response to norepinephrine in rat brain slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* , 237: 702-707.
- STRASSER, R.H.; STILES, G.L. & LEFKOWITZ, R.J. (1984). Translocation and uncoupling of the beta adrenergic receptor in rat lung after catecholamine promoted desensitization in vivo. *Endocrinology*, 115: 1329-1400 .

- TORRELLAS, A.; GUAZA, C.; BORRELL, J. & BORRELL, S. (1981). Adrenal hormones and brain catecholamines responses to morning and afternoon immobilization stress in rats. *Phys. Beh.* 26(1): 129-133.
- TRENDELENBURG, U. (1963). Supersensitivity and subsensitivity to sympathomimetic amines. *Pharmacol. Rev.*, 15: 225-276.
- TRENDELENBURG, U. (1963). Extraneuronal uptake and metabolism of catecholamines as a site of loss. *Life Sci.*, 22: 1217-1222.
- TSE, J.; POWELL, J.R.; BASTE, C.A.; PRIEST, R.E. & KWO, J.F. (1979). Isoproterenol-induced cardiac hypertrophy: modulations in characteristics of beta-adrenergic receptor, adenylate-cyclase and ventricular contraction. *Endocrinology*, 105:246-255.
- VAN ROSSUN, J.M. (1963). 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.
- VIAU, V. & MEANEY, M.J. (1991). Variations in the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Response to stress during the estrous cycle in the rat. *Endocrinology*, 129 (5): 25503-2510.

YOSHINAGA, K. ; HAWKINS, R.A. & STOCHER, J.F. (1969). Estrogen secretion by rat ovary in vivo during the estrous cycle and pregnancy. *Endocrinology*, 85: 103-111

ZENKER, M. & BERSTEIN, D.E. (1958). The estimation of small amounts of corticosterone in rat plasma. *J. Biol. Chem.*, 231: 695-701.

8. RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram: analisar a sensibilidade ao efeito cronotrópico da isoprenalina, noradrenalina e adrenalina de átrios direitos isolados de ratas normais, em cada uma das fases do ciclo estral, ou após 50 minutos de natação, durante o estro ou o diestro; correlacionar as alterações de sensibilidade com as fases do ciclo estral e/ou com os níveis plasmáticos de corticosterona.

Utilizamos ratas adultas, Wistar, normais, sedentárias, ou imediatamente após 50 min de natação, em água a 35°C, nas fases de estro ou diestro. As fases do ciclo estral foram determinadas por meio de esfregaço vaginal diário. Aquelas com ciclos regulares de 4 dias foram selecionadas.

Para a análise da sensibilidade às catecolaminas, os animais foram sacrificados e seus átrios direitos preparados para registro isométrico dos batimentos espontâneos. Foram obtidas curvas para o efeito cronotrópico da isoprenalina, noradrenalina ou adrenalina. Em alguns experimentos, as curvas concentração-efeito à isoprenalina foram precedidas de desnervação da preparação e inibição do sistema de captação neuronal e extra-neuronal.

Para avaliação dos níveis plasmáticos de corticosterona, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (65 mg/Kg, ip) e o sangue foi coletado da veia renal. A corticosterona foi determinada no plasma por método fluorimétrico.

Os resultados obtidos permitem afirmar que:

1. átrios direitos isolados de ratas normais apresentam oscilações cíclicas de sensibilidade à adrenalina, a qual é baixa no estro e aumenta progressivamente nas fases seguintes, para atingir um pico no proestro.

2. há uma correlação positiva entre a sensibilidade do átrio direito à adrenalina, os níveis plasmáticos de corticosterona e as fases do ciclo estral.

3. a sensibilidade à noradrenalina e à isoprenalina do átrio direito isolado de ratas normais não varia durante o ciclo estral.

4. estresse por uma sessão de natação determina supersensibilidade à isoprenalina em átrios direitos de ratas, se aplicado durante o diestro, mas não durante o estro.

5. esta supersensibilidade é atenuada após desnervação e inibição do sistema de captação extra-neuronal.

6. as alterações de sensibilidade às catecolaminas observadas em átrios direitos isolados de ratos submetidos a estresse dependem do sexo do animal, da fase do ciclo estral (no caso das fêmeas), e do aumento dos níveis de corticosterona provocado pelo estresse.

9. SUMMARY

The purpose of this work was to analyse the female rat right atria sensitivity to the chronotropic effect of isoprenaline, noradrenaline and adrenaline, along the oestrous cycle phases and after stress applied during oestrous or dioestrous. We also correlated changes in sensitivity with oestrous cycle phases and/or plasmatic levels of corticosterone.

Female adult Wistar rats were used. The phases of oestrous cycle were determined daily at 9:00 - 10:00 a.m. by means of vaginal smear. Those animals constituting the stressed groups were submitted to a 50 minute swimming session in water at 35° C, during oestrous or dioestrous. Isolated spontaneous beating right atria were used to obtain cumulative dose-reponse curves to noradrenaline, isoprenaline and adrenaline. Some experiments were performed after in vitro denervation and inhibition of neuronal and extraneuronal uptake. Corticosterone plasmatic levels were determined fluorimetricly.

Results showed that:

1. Right atria isolated from normal, non-stressed female rats present cyclic oscilation of adrenaline sensitivity, low during oestrous, but increasing progressively in the following phases to peak at proestrous.

2. There is a positive correlation between sensitivity to adrenaline, plasmatic levels of corticosterone and oestrous cycle phases.

3. There was no variation of noradrenaline and isoprenaline sensitivity durring the oestrous cycle.

4. Right atrium isolated from swimming stressed rats were supersensitive to isoprenaline during dioestrous but not during oestrous.

5. This supersensitivity is attenuated after denervation and inhibition of neuronal and extra-neuronal uptake.

6. The alterations in sensitivity to isoprenaline observed in right atria of rats submitted to stress depend on the oestrous cycle phase and the increase in corticosterone plasma level induced by stress.