

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

ALEXANDRE MARCUCCI MIOTTO

**PERFIL LIPÍDICO E SENSIBILIDADE ADRENÉRGICA
EM ÁTRIO DIREITO DE RATOS NORMO E
HIPERCOLESTEROLÊMICOS TRATADOS OU NÃO COM
INFUSO DAS CASCAS DE *Croton cajucara* Benth.**

**Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título
de Mestre em Biologia Funcional
e Molecular – Área de Fisiologia.**

Orientação

Prof^a. Dr^a. Dora Maria Grassi-Kassisse.

Co-Orientação

Prof^a. Dr^a. Regina Célia Spadari-Bratfisch.

IB-UNICAMP

2001

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

M669s **Miotto, Alexandre Marcucci**
Perfil lipídico e sensibilidade adrenérgica em átrio direito de ratos normo e hipercolesterolêmicos tratados ou não com infuso das cascas de *Croton cajucara* Benth/Alexandre Marcucci Miotto. -- Campinas, SP:[s.n.], 2000.
73f: ilus.

Orientadora: Dora Maria Grassi-Kassisse
Co-Orientadora: Regina Célia Spadari-Bratfisch
Dissertação(mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Adrenoceptor beta. 2. Hipercolesterolemia. 3. Rato como animal de laboratório. 4. *Croton* (Botânica). I. Spadari-Bratfisch, Regina Célia. II. Grassi-Kassisse, Dora Maria. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Data de Defesa: 24 de abril de 2001

Banca Examinadora da Tese

Profa. Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Áreas

Prof. Dr. José Antônio Lapa

Prof. Dr. José Roberto Moreira de Azevedo

DEDICO

Primeiramente a esta energia, também chamada de Deus, que nos dá a vida e nos conduz por ela.

Depois à família onde Deus considerou que eu deveria nascer e aprender meus primeiros passos e que, dentre tantas condições necessárias, sem dúvida é a primária para que a vida evolua e seja frutífera.

Assim, dedico este trabalho ao meu pai Joel Carlos Miotto e à minha mãe, Maria Aparecida Marcucci Miotto, que formaram o alicerce de minha vida e que continuam e continuarão para sempre sendo uma contínua fonte de energia para mim. Devo a vocês dois muito mais do que poderei pagar ao longo de minha vida.

Amo vocês de todo meu coração.

Obrigado!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço à Profa. Dra. Regina Célia Spadari-Bratfisch e à Profa. Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse que, ao me receberem há alguns anos atrás, confiaram em minha pessoa e demonstraram ao longo destes anos a mesma confiança (como a Profa. Regina na qualificação). Agradeço a vocês pela orientação, profissional e ética, pelas críticas, comentários e observações sempre pertinentes, pela disposição e paciência, pelo incentivo, pelas broncas, enfim, por toda atenção. Vocês se tornaram para mim grandes exemplos de pessoas a serem seguidas, pelo fato de conciliar tarefas profissionais, principalmente aquelas que envolvem um grupo de pessoas, além das tarefas pessoais que todos nós possuímos, e realizá-las criteriosa e eticamente.

Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a toda minha família. Meus avós (inclusive in memoriam), tio e primos, e à minha irmã Vivian. E novamente: vocês são a base de tudo! Ah!, não posso deixar de agradecer também aos membros caninos de minha família: Ísis, Tom, Brida, Nina e Kauê e outros que já estiveram conosco e que significam muito para mim.

Agradeço especialmente à minha namorada Josiléia, que me tem incentivado sempre, principalmente naqueles momentos em que as coisas parecem perder o sentido, e nós a vontade. Obrigado pelo amor e carinho que você tem me dado. Te amo!

Agradecimentos especiais às pessoas e amigos que trabalharam e conviveram comigo neste laboratório. À Iraídes Nunes dos Santos (Ira) com a qual sempre pude contar (“sempre fiz de um tudo por esse menino!”), sempre tendo muita paciência comigo (mesmo quando eu destruí seus experimentos!). Ah!, e que me ensinou que ônibus eu devia pegar para chegar na minha primeira casa aqui em Campinas. À Rita de Cássia Ferreira (Ritinha), uma das pessoas mais maravilhosas que já conheci em minha vida e que nunca esquecerei (como já disse a você uma vez Rita: posso até esquecer teu nome, pois minha cabeça não funciona bem para guardar estas coisas, porém nunca te esquecerei). Além disso, Rita, como diz o ditado: “por tal pessoa coloco minha mão no fogo!” para você eu coloco as duas. Obrigado por tudo Ritinha. À Valéria Wolf-Nunes, minha grande parceira de trabalho. Saiba que foi um prazer trabalhar ao teu lado e dividir todos os problemas e broncas, pois agüenta-los sozinho não é nada fácil, e dividir a alegria das vezes que deram certo por decisões tomadas em grupo (lembra da dívida da temperatura com que deveríamos centrifugar?). Valeu pela força Val, adoro você! À Marília Mantovani Sampaio Barros (Ma), pilar de paciência e organização dentro do laboratório, e sempre disposta a nos auxiliar. Outra coisa que não esquecerei é que apesar de tantos problemas enfrentados por ser pesquisadora, esposa e mãe ao mesmo tempo, sempre estava de cabeça erguida e sempre de bom humor, o que eu pessoalmente admiro e tentarei me espelhar ao longo de minha vida. À Elisângela Farias-Silva (Elis) sempre pronta para um debate (alguns muito acalorados!) ou mesmo uma conversa inteligente e sempre disposta a ensinar as pessoas. Além disso, obrigado Elis por me ensinar a técnica básica para eu realizar este trabalho. À Josiane Verago (Josi), sempre trazendo muita alegria a este laboratório com suas performances e dublagens. Ao Gustavo Endrigo, que teve uma passagem relativamente rápida por este laboratório, mas suficiente para se tornar amigo de todos por méritos próprios. À Katia Jaqueline Miguel, outra que passou rápido por aqui mas que já é “da casa”. Agora espera por nós lá no Pingüim em Ribeirão Preto. Finalmente agradeço ao André Luis de Moura, que já se tornou um grande amigo dentro e fora do departamento. Sempre acessível e disposto a ajudar na realização de qualquer “bagaça”!

Às amigas adquiridas ao longo deste período, especialmente àqueles com os quais convivi mais intensamente e que engrandeceram e me deram forças nesta fase de minha vida. Um obrigado especial para a inesquecível turma Takatakataka!: Cláudia Magno (Claudinha), Davi Santiago, Francisco José A. Prada (Chicão), Jairo A. Berti e Maria Carolina M. Villani (Carol). Para as amigas mais recentes Eliane Bogo (Lilica) e Júlia Y. Costa (Jú). Agradeço também a todos os outros alunos com os quais compartilhei minha estadia aqui neste departamento e a todos os meus “velhos” amigos

com os quais convivi desde minha infância e que me são muito caros, pois tiveram grande importância em minha formação.

A todo corpo docente do Departamento de Fisiologia e Biofísica – IB - Unicamp, por me transmitirem conhecimentos de forma competente. Agradeço também especialmente ao Prof. Dr. Afonso Antônio Machado e Prof. Dr. José Roberto M. de Azevedo, da Unesp de Rio Claro, que se tornaram além de professores amigos muito queridos e a quem devo muito pelos ensinamentos e incentivos que me passaram. Teus ensinamentos não se baseiam apenas nas aulas por vocês oferecidas, nem somente às atividades laboratoriais, que incluem ética e responsabilidade, mas também às características pessoais que nos surgem com o convívio, e que são grandes moldadores da personalidade de seus alunos.

A todos os funcionários deste departamento, pelo suporte técnico que, de uma forma ou de outra, foram necessários para a conclusão de todas as teses deste departamento. Obrigado.

Agradeço a todas as pessoas que me ajudaram, direta ou indiretamente, na conclusão deste trabalho.

Às entidades de fomento à pesquisa CNPq e FAPESP que financiaram este projeto. E, parafraseando minha amiga de trabalho Josiane, agradeço aos cidadãos brasileiros (nós todos), de onde sai o suporte financeiro para que as universidades continuem em atividade.

“Meu avô me disse uma vez que existe dois tipos de pessoas: aquelas que trabalhavam e aquelas que tomavam o crédito. Ele me disse para tentar ficar no primeiro grupo - há menos competição ali!”

Indira Gandhi

<i>ÍNDICE</i>	<i>Página</i>
ÍNDICE DE TABELAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	xvi
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	10
METODOLOGIA	11
RESULTADOS	20
DISCUSSÃO	43
CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
APÊNDICES	71

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1

pág. 21

Evolução do peso corporal de ratos normocolesterolêmicos que beberam água (NA), normocolesterolêmicos que beberam infuso de sacaca a 10% (NI); hipercolesterolêmicos que beberam água (HA) e hipercolesterolêmicos que beberam infuso de sacaca a 10% (HI) e peso hepático ao final do experimento.

TABELA 2

pág. 25

Ingesta alimentar e líquida média diária de ratos normocolesterolêmicos que beberam água (NA), normocolesterolêmicos que beberam infuso de sacaca a 10% (NI); hipercolesterolêmicos que beberam água (HA) e hipercolesterolêmicos que beberam infuso de sacaca a 10% (HI).

TABELA 3

pág. 28

Concentração sangüínea de colesterol total (mg/dL) em ratos com 6, 10 e 12 semanas de idade que ingeriram ração com 4% ou 15% de lipídeos, e beberam água (NA e HA) ou infuso a 10% de sacaca (NI e HI).

TABELA 4

pág. 30

Concentrações sangüíneas de colesterol total, HDL, LDL e VLDL (mg/dL) de ratos que ingeriram ração com 4% ou 15% de lipídeos, e beberam água (NA e HA) ou infuso a 10% de sacaca (NI e HI). Os ratos que ingeriram ração hipercolesterolêmica estão divididos em sensível e resistente ao efeito da ração.

TABELA 5

pág. 32

Concentração sangüínea de triacilglicerol (mg/dL) em ratos com 6, 10 e 12 semanas de idade que ingeriram ração com 4% ou 15% de lipídeos, e beberam água (NA e HA) ou infuso a 10% de sacaca (NI e HI).

TABELA 6

pág. 35

Frequência de batimentos espontâneos (FI), sensibilidade (pD_2), resposta máxima (RM) e coeficiente de Hill das curvas concentração-efeito à isoprenalina em átrios direitos de ratos normocolesterolêmicos que beberam água (NA) ou infuso (NI); e de ratos hipercolesterolêmicos que beberam água (HA) ou infuso das cascas da sacaca a 10% (HI).

TABELA 7

pág. 36

Frequência de batimentos espontâneos (FI), sensibilidade (pD_2), resposta máxima (RM) e coeficiente de Hill das curvas concentração-efeito à noradrenalina em átrios direitos de ratos normocolesterolêmicos que beberam água (NA) ou infuso (NI); e de ratos hipercolesterolêmicos que beberam água (HA) ou infuso das cascas da sacaca a 10% (HI).

TABELA 8

pág. 39

Frequência de batimentos espontâneos (FI), sensibilidade (pD_2), resposta máxima (RM) e coeficiente de Hill das curvas concentração-efeito ao soterenol em átrios direitos

de ratos normocolesterolêmicos que beberam água (NA) ou infuso (NI); e de ratos hipercolesterolêmicos que beberam água (HA) ou infuso das cascas da sacaca a 10% (HI).

TABELA 9

pág. 42

Frequência de batimentos espontâneos (FI), sensibilidade (pD_2) e resposta máxima (RM) das curvas concentração-efeito à isoprenalina na presença e na ausência de 10 ηM de CGP20712A e valores pK_B do CGP20712A em átrios direitos de ratos normocolesterolêmicos que beberam com água (NA) ou infuso (NI); e de ratos hipercolesterolêmicos que beberam água (HA) ou infuso das cascas da sacaca a 10% (HI).

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1a, b

pág. 09

Croton cajucara Benth.: habitat e as cascas do caule.

FIGURA 2

pág. 22

Fotografia do fígado de um animal normocolesterolêmico e de outro hipercolesterolêmico.

FIGURA 3

pág. 24

Ingesta alimentar e líquida média diária de ratos normocolesterolêmicos que beberam água (NA), normocolesterolêmicos que beberam infuso de sacaca a 10% (NI); hipercolesterolêmicos que beberam água (HA) e hipercolesterolêmicos que beberam infuso de sacaca a 10% (HI), entre a 10^a e a 12^a semanas de idade.

FIGURA 4

pág. 34

Curvas concentração-efeito à isoprenalina (A) e à noradrenalina (B) em átrios direitos isolados de ratos normocolesterolêmicos que beberam água (NA) ou infuso de sacaca (NI); e de ratos hipercolesterolêmicos que beberam água (HA) ou infuso das cascas da sacaca a 10% (HI).

FIGURA 5

pág. 38

Curvas concentração-efeito ao soterenol em átrios direitos isolados de ratos normocolesterolêmicos que beberam água (NA) ou infuso (NI); e de ratos hipercolesterolêmicos que beberam água (HA) ou infuso das cascas da sacaca a 10% (HI). Para comparação, foi acrescentada à figura a curva dose-resposta da isoprenalina do grupo normocolesterolêmico que bebeu água (ISO-NA).

FIGURA 6

pág. 41

Curvas concentração-efeito para o antagonismo do efeito cronotrópico da isoprenalina (ISO) pelo CGP20712A em átrios direitos isolados de ratos normocolesterolêmicos que beberam água (NA) ou infuso (NI); e de ratos hipercolesterolêmicos que beberam água (HA) ou infuso das cascas da sacaca a 10% (HI).

RESUMO

Adrenoceptores são receptores de membrana que traduzem um estímulo externo, mediado por agonistas adrenérgicos, em respostas intracelulares. O *milieu* lipídico da bicamada da membrana celular oferece um ambiente dinâmico perfeito para o funcionamento destas proteínas, e qualquer alteração em sua concentração lipídica e/ou colesterolêmica pode alterar este funcionamento, por proporcionar mudanças conformacionais nos segmentos transmembrana dos receptores.

A hipercolesterolemia é apontada como sendo um importante fator na incidência de diversas patologias, razão pela qual agentes eficazes na redução do colesterol plasmático e de suas conseqüências tem sido intensamente investigados. *Croton cajucara* Benth., pertencente à família Euphorbiaceae, é uma planta típica da região amazônica, conhecida como ‘sacaca’, que é utilizada, naquela região, para o tratamento de distúrbios gástricos, hepáticos, renais, e para reduzir a concentração plasmática de colesterol.

O objetivo deste trabalho foi induzir hipercolesterolemia em ratos por meio da ingesta de dieta contendo 15% de gordura, 1,25% de colesterol e 0,5% de ácido cólico; analisar o efeito do tratamento com o infuso das cascas de sacaca sobre o perfil lipídico no plasma de ratos normocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos, além de analisar a sensibilidade ao efeito cronotrópico de agonistas de β -AR em átrio direito isolado de ratos hipercolesterolêmicos, tratados ou não com o infuso de sacaca.

Ratos Wistar pesando até 160g, ao início do tratamento, foram alimentados com dieta hipercolesterolêmica durante seis semanas. Após este período a concentração plasmática de colesterol total estava significativamente elevada em comparação aos ratos alimentados com ração dieteticamente equilibrada. Não observamos alterações da concentração plasmática de HDL, mas houve aumento da concentração plasmática de LDL, VLDL e triacilgliceróis. Nestes animais hipercolesterolêmicos, 15 dias de administração de infuso de sacaca não levou a alterações nas concentrações plasmáticas destas substâncias, exceto para a LDL, a qual reduziu significativamente, porém não atingindo valores controle.

O átrio direito de ratos hipercolesterolêmicos apresentou uma subsensibilidade para os agonistas beta adrenérgicos isoproterenol e noradrenalina, a qual foi revertida pelo

tratamento com infuso de sacaca. O número de receptores, verificado pelo estudo com o agonista parcial soterenol, apresentou-se inalterado e modificações da estrutura do receptor não foram confirmados pelo estudo da afinidade do receptor pelo antagonista CGP20712A.

ABSTRACT

Adrenoceptors couple adrenergic stimuli to intracellular responses. The lipid bilayer of the cell membrane offers a dynamic environment for these proteins to function and alterations in membranes lipid composition may facilitate conformational changes in the transmembrane segments of these receptors. Hypercholesterolemia is an important factor in the incidence of several diseases, and various ways of lowering the high blood cholesterol levels have been investigated. *Croton cajucara* Benth. (sacaca) is an endemic Brazilian plant typical of the Amazon region. *C cajucara* belongs to the family Euphorbiaceae and is used to treat renal, gastric and hepatic diseases, as well as diabetes and to reduce blood cholesterol. The objective of this work was to investigate the beta adrenoceptor sensitivity of right atria from rats fed with a rich cholesterol diet and treated with an infusion of sacaca bark. We also evaluated the effect of this treatment on the cholesterol plasma concentration. Male Wistar rats (250-350 g) were distributed in a normocholesterolemic group that received a balanced diet containing 4% fat and a hypercholesterolemic group fed a hypercholesterolemic diet. These two groups were further divided into subgroups which received a 10% sacaca infusion or water. The rats fed the hypercholesterolemic diet showed variations in their blood total cholesterol levels, although these were elevated in all rats. There were no changes in the HDL and triacylglycerols levels whereas there were increases in LDL and VLDL levels. The sacaca infusion did not alter the plasma concentrations of these lipids, except for a reduction in LDL-cholesterol. Right atria from hypercholesterolemic rats were less sensitive to the beta adrenergic agonists isoproterenol and noradrenaline and this reduction was reverted by the sacaca infusion. The number of receptors, determined using the partial agonist soterenol, remained unaltered. Similarly, and the structure of the receptor was not affected, as shown by the unaltered affinity for the antagonist CGP20712A.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

α	alfa
ANOVA	análise de variância
AMPc	monofosfato de adenosina cíclico
AR	adrenoceptor
β	beta
β ARK	proteína quinase específica do receptor beta
bpm	batimentos por minuto
CDR	curva dose resposta
CGP20712A	antagonista adrenérgico seletivo β_1
DHC	desidrocrotonina
DR	dose-razão – aumento múltiplo na concentração do agonista requerido para alcaçar uma dada resposta
EC ₅₀	concentração equiefetiva a 50%
FC	freqüência cardíaca
FI	freqüência inicial
G _s	proteína G estimulatória
G _i	proteína G inibitória
HDL	lipoproteína de alta densidade
i.p.	via intraperitoneal
K _A	constante do equilíbrio de dissociação para o complexo agonista- receptor
K _B	constante do equilíbrio de dissociação para o complexo antagonista- receptor
LDL	lipoproteína de baixa densidade
MAO	enzima monoamino oxidase
mg	miligramo
ml	mililitro
n	quantidade de experimentos realizados (amostra)
η M	nanomolar
pA ₂	corresponde numericamente ao logarítimo negativo da concentração molar do antagonista que provoca um deslocamento de duas vezes à direita na curva dose-resposta de um agonista
PBZ	fenoxibenzamina
pD ₂	logarítimo negativo da concentração do agonista que produz metade da resposta máxima
PKA	proteína quinase A
pK _B	logarítimo negativo da constante de dissociação do complexo antagonista-receptor. Corresponde a pA ₂ quando na equação $-\log (DR-1)$, DR=2
RM	resposta máxima
SNS	sistema nervoso autônomo simpático
SO	soterenol
TAG	triglicerídeos
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade

INTRODUÇÃO

Os adrenoceptores β são os primeiros elementos na cadeia de transdução do sinal mediando a estimulação adrenérgica. No coração, e em condições fisiológicas tal estimulação representa um passo chave na resposta do rendimento cardíaco a um aumento da demanda periférica por oxigênio e nutrientes (CASTELLANO & BÖHM, 1997). Adrenoceptores pertencem a uma família de receptores integrais de membrana, com sete alças transmembrana, que usam proteína G ligada a uma enzima efetora para acoplar o estímulo externo a respostas intracelulares (GREENSPAN & BAXTER, 1994). Em corações humanos há, agora, evidências da existência de quatro subtipos de adrenoceptores β (β -AR), três possuindo uma elevada homologia (β_1 , β_2 e β_3 -AR) e um quarto subtipo, ainda não clonado, o qual foi designado provisoriamente como adrenoceptor β_4 cardíaco (KAUMANN & MOLENAAR, 1997). A principal diferença fisiológica entre adrenoceptores β_1 e β_2 reside na sensibilidade para noradrenalina. Os adrenoceptores β_1 têm aproximadamente a mesma afinidade para adrenalina e noradrenalina, enquanto β_2 -AR tem muito maior afinidade para adrenalina do que para noradrenalina. Conseqüentemente, β_1 -AR podem ser estimulados pela adrenalina circulante ou noradrenalina liberada neuralmente. Por outro lado, β_2 -AR provavelmente respondem à adrenalina como seu agonista natural. Alguns autores sugeriram que β_2 -AR seria um receptor hormonal, enquanto β_1 -AR seria um receptor neuronal (MINNEMAN *et al.*, 1981). Contudo, β_1 -AR responde tanto à estimulação hormonal quanto neuronal e β_2 -AR são também ativados por altas concentrações de noradrenalina. Ambos adrenoceptores β_1 e β_2 são funcionalmente acoplados à adenilil ciclase (MOTOMURA *et al.*, 1990), e podem contribuir *in vitro* e *in vivo* para os efeitos inotrópicos e cronotrópicos de agonistas beta adrenérgicos neste órgão.

Adrenoceptores β_3 cardíacos parecem ser acoplados à proteína G sensível à toxina pertussis (G_i). Agonistas seletivos de adrenoceptores β_3 encurtam o potencial de ação e causam cardiodepressão, sugerindo acoplagem direta de uma proteína G_i a um canal de K^+ (STROSBERG & PIETRI-RUXEL, 1996; KAUMANN & MOLENAAR, 1997).

Os supostos adrenoceptores β_4 cardíacos mediarão efeitos cardio-estimulantes de agonistas parciais não convencionais, como bloqueadores de alta afinidade por β_1 - e β_2 -AR, causando efeitos agonísticos a concentrações consideravelmente maiores que aquelas que bloqueiam estes receptores. Os supostos adrenoceptores β_4 parecem estar acoplados positivamente à cascata dependente de AMPc e podem sofrer alguma dessensibilização (KAUMANN, 1997; KAUMANN & MOLENAAR, 1997).

Foi demonstrado experimentalmente que β_2 -AR podem funcionar como heterodímeros tendo dois domínios principais: domínio A (do terminal amino até o centro da terceira alça intracelular) e domínio B (do meio da terceira alça intracelular até o terminal carboxila). Quando sintetizados como proteínas separadas, os domínios A e B podem se associar não covalentemente para formar um receptor funcional. A flexibilidade da terceira alça assim como o importante papel funcional desempenhado pelos terminais amino e carboxila da terceira alça no acoplamento com a proteína G, sugerem que a ativação do agonista pode envolver o movimento do domínio A em relação ao domínio B. HEIN & KOBILKA (1995) acreditam que, na ausência de agonistas ou antagonistas, estes dois domínios sejam móveis um em relação ao outro. Agonistas e antagonistas estabilizariam a associação dos domínios A e B, por interagirem com aminoácidos específicos em ambos os domínios, sendo que agonistas estabilizariam um arranjo específico destes domínios que pode ser reconhecido pela proteína G, enquanto antagonistas estabilizariam um arranjo que não pode ser reconhecido pela proteína G. Na ausência de ligante, o receptor poderia flutuar entre a conformação ativa e a inativa, com a conformação inativa sendo mais estável. Esta observação fornece suporte à hipótese da atividade constitucional dos receptores e de que agonistas e antagonistas podem, assim, induzir mudanças conformacionais nos receptores. Antagonistas puros poderiam agir bloqueando o acesso dos agonistas ao receptor, sem, contudo, alterar sua conformação e, desta forma permitindo um baixo nível de ativação basal da proteína G pelo receptor. Em contraste, antagonistas negativos não apenas bloqueariam o acesso do agonista ao receptor, mas também induziriam uma mudança conformacional que evitaria a ativação basal da proteína G (HEIN & KOBILKA, 1995).

Dessensibilização é um fenômeno biológico muito comum onde a resposta a estímulos diminui, apesar da contínua presença de estímulo de intensidade constante. Três

processos estão associados com o desenvolvimento de dessensibilização de β adrenoreceptores: 1-um rápido desacoplamento do receptor de suas unidades efetoras através de sua fosforilação por diversas quinases, incluindo proteína quinase A (PKA) e quinase do adrenoreceptor beta (β ARK); 2-sequestro do receptor para o interior celular, o qual envolve, provavelmente, alguma mudança conformacional no próprio receptor, possivelmente facilitada por fosforilação, mas independentemente desta. Esta internalização pode ser irreversível mas freqüentemente é reversível e o receptor retorna à superfície da membrana; 3-*downregulation*, a qual demora diversas horas para ocorrer e resulta em uma diminuição do número de receptores na membrana por sua destruição pelos lisossomos (COLLINS *et al.*, 1990; BÜNEMANN *et al.*, 1999). Assim, ativação do receptor pelo agonista resulta em aumento da concentração intracelular de AMPc que ativa a PKA, fosforilando o receptor ocupado pelo agonista. Isto faria com que o receptor desviasse sua acoplagem para uma proteína G_i (DAAKA *et al.*, 1997). Logo, após exposição prolongada a altas concentrações de catecolaminas ocorreria dessensibilização da adenilil ciclase (STROSBERG, 1995; CASTELLANO & BÖHM, 1997; BÜNEMANN *et al.*, 1999).

Ambos, β_1 e β_2 -AR possuem sítios de fosforilação em seus domínios citoplasmáticos, os quais são reconhecidos por duas diferentes quinases: PKA e β ARK. A primeira enfraquece a habilidade do receptor ativar G_s , enquanto a segunda fosforila apenas os receptores ocupados por agonista (dessensibilização homóloga). O processo é rápido e resulta na fixação de uma proteína citoplasmática, a β arrestina, ao receptor, resultando em desacoplamento do β -AR de G_s (CASTELLANO & BÖHM, 1997).

Os três subtipos de β -AR não são igualmente sensíveis à dessensibilização. O β_1 -AR, o qual possui poucos sítios de fosforilação e faltam os resíduos de tirosina implicados na *downregulation* dos β_2 -AR, é menos sensível do que o β_2 -AR para ambos os tipos de dessensibilização (a curto e longo prazo). Já o subtipo β_3 -AR é quase completamente resistente à dessensibilização a curto prazo, primariamente porque este receptor não sofre fosforilação induzida por PKA ou β ARK, devido à ausência das seqüências-alvo identificadas no subtipo β_2 -AR (STROSBERG, 1995).

Além disso, adrenoreceptores β_1 e β_2 são muito susceptíveis à oxidações através de peróxidos, pois possuem os resíduos extracelulares que são atacados por estes oxidantes.

Adrenoceptores β_3 , por sua vez, não são tão susceptíveis assim, podendo representar um “seguro contra falhas” dos outros beta-adrenoceptores (WHALEN & LEWIS, 1999).

Alguns autores propuseram que a atividade do sistema β -AR/adenilil ciclase (β AR/AC) seria dependente da composição lipídica da membrana, e que esta seria influenciada pela dieta lipídica (LURIE *et al.*, 1985; PATTEN *et al.*, 1989; GUDBJARNASON & BENEDIKTSDÓTTIR, 1996). O efeito de dieta lipídica no sistema sinalizador transmembrana, em coração, é de particular importância na arritmogênese cardíaca. Este efeito arritmogênico poderia, em parte, ser devido a alterações na composição colesterolêmica da membrana, as quais poderiam influenciar a atividade do sistema β AR/AC e, subseqüentemente, as respostas inotrópica e cronotrópica do coração, sob influência simpática (PATTEN *et al.*, 1989). No entanto, a resposta dos tecidos à estimulação adrenérgica é resultado de uma cadeia de eventos e, o passo desta seqüência que estaria alterado pela hipercolesterolemia não está claramente definido (MOKLER *et al.*, 1985).

Membranas celulares são compostas principalmente de proteínas e lipídeos polares, como glicerofosfolipídeos e glicosfingolipídeos, além de esteróis, os quais formam a matriz da bicamada. O ambiente lipídico dentro da bicamada consiste de esteróis e das cadeias de ácidos graxos destes fosfolipídeos, mas a composição deste meio é variável e pode ser significativamente alterada pela dieta, pela idade e pela ação de diversos hormônios (PATTEN *et al.*, 1989; FIELD *et al.*, 1990). A bicamada lipídica da membrana celular oferece um ambiente dinâmico para o funcionamento de enzimas, canais iônicos e receptores, de modo que mudanças na composição lipídica das membranas podem causar alterações em suas funções. As células podem controlar a absorção lipídica em suas membranas, alterando sua composição e, desta forma, a organização dos componentes lipídicos, modulando o microambiente das proteínas de membrana. Assim, as mudanças no ambiente lipídico da membrana podem facilitar mudanças conformacionais nos segmentos transmembrana do receptor, liberando ou obstruindo sítios de fixação do ligante no receptor (GUDBJARNASON & BENEDIKTSDÓTTIR 1996). Logo, o aumento ou a diminuição da proporção de colesterol da membrana pode afetar grandemente a atividade de algumas proteínas transmembrana e, conseqüentemente, o funcionamento do órgão. (LURIE *et al.*, 1985; BRODERICK *et al.*, 1989).

O metabolismo de colesterol é regulado e influenciado por diversos fatores. Dentre eles encontram-se a ingesta alimentar, os hormônios tireoideanos, os estrógenos, as beta-endorfinas e a insulina. Os hormônios tireoideanos e os estrógenos exercem um efeito redutor do colesterol; a deficiência de insulina promove aumento na concentração sérica de colesterol. Também a melatonina influencia o metabolismo de colesterol por promover a liberação de hormônios tireoideanos, insulina e beta-endorfinas (SANDYK & AWERBUCH, 1994). Estudos recentes também mostram uma ligação do metabolismo de colesterol à serotonina cerebral, um neurotransmissor regulado pela melatonina, e que poderia funcionar como mediador dos efeitos desta sobre o colesterol. Assim, a hipercolesterolemia pode ser originada por diversos fatores e caracteriza-se por defeitos do metabolismo de lipoproteínas, constituindo-se o principal fator de risco para doenças cardiovasculares (LURIE *et al.*, 1985; MOKLER *et al.*, 1985; GRUNDY & BEARN, 1988; MARINETTI, 1990; RUBATTU *et al.*, 1993; WALD & LAW, 1995; DANEV *et al.*, 1997), por promover alterações na contratilidade cardíaca e na responsividade vascular (MOKLER *et al.*, 1985). Estudos indicam que hipercolesterolemia é capaz de alterar a responsividade vascular a inúmeros agentes vasoconstritores. Aumentadas respostas pressoras à noradrenalina foram demonstradas em vasos sangüíneos isolados e perfundidos com plasma hipercolesterolêmico, bem como *in vivo*, em animais hipercolesterolêmicos (BLOOM *et al.*, 1975; MOKLER *et al.*, 1985).

O sistema nervoso simpático (SNS), por sua vez, também parece ser grandemente influenciado pela ingesta alimentar. Evidências experimentais indicam que a atividade do sistema nervoso simpático pode se alterar rapidamente em função do estado dietético do animal, onde jejum pode suprimir sua atividade enquanto dietas ricas em gorduras e carboidratos podem aumentá-la (CRANDALL *et al.*, 1983; KAUFMAN *et al.*, 1991), podendo a insulina constituir o elo de ligação entre a captação dos nutrientes da dieta e a atividade simpática. Insulina possui também importante papel na síntese endógena de colesterol, visto ser sua principal moduladora pela ativação da enzima chave da síntese de colesterol (MARINETTI, 1990). Foi proposto que a resistência à captação de glicose estimulada por insulina e hiperinsulinemia compensatória resultam em dislipidemia e hipertensão (BØNAA & ARNESEN, 1992). Especificamente, após 48h de jejum ocorre diminuição da atividade do sistema nervoso simpático no coração e no pâncreas, enquanto

alimentos calóricos promovem aumento (CRANDALL *et al.*, 1983). Regimes dietéticos resultando em diminuição do peso corpóreo causam aumento do tônus parassimpático. Assim, aumentados níveis de lipídeos plasmáticos correlacionam-se com um tônus simpático cronicamente aumentado (DANEV *et al.*, 1997).

O mecanismo que embasa a associação entre lipídeos sanguíneos e frequência cardíaca pode estar sob influência do sistema nervoso autonômico. A atividade do sistema nervoso simpático está aumentada em alguns indivíduos com hipertensão essencial, o que também influencia a atividade cardíaca (KAUFMAN *et al.*, 1991; CASTELLANO & BÖHM, 1997). Frequência cardíaca elevada é frequentemente observada em indivíduos hipertensos, os quais possuem também alterações nas concentrações plasmáticas de lipídeos (BØNNA & ARNESEN, 1992; WANNAMETHEE & SHAPER, 1994; MA *et al.*, 1996; DANEV *et al.*, 1997). Assim, alterações na atividade do SNS que resultam em elevada frequência cardíaca e/ou elevada pressão arterial podem ser favoráveis à ocorrência de arritmias, com conseqüente progressão para fibrilação ventricular, uma causa comum de morte cardíaca súbita.

Há também evidências que mecanismos adrenérgicos podem influenciar o metabolismo lipídico e energético, pois catecolaminas são os mais importantes hormônios que estimulam agudamente a degradação dos estoques de triacilgliceróis a ácidos graxos e glicerol, e modulam o metabolismo lipoproteico. Estimulação de adrenoreceptores α_1 , resultante de aumentada atividade nervosa simpática, pode induzir mudanças no tônus de esfíncteres pré-capilares, diminuindo assim a oferta de lipoproteínas ricas em triacilgliceróis para a ação da lipase endotelial, o que resulta em diminuição do catabolismo de VLDL e da síntese de HDL (BØNNA & ARNESEN, 1992). É possível que mudanças na atividade simpática, induzidas por dieta, possam justificar a relação entre frequência cardíaca e concentração sanguínea de lipídeos. Elevada frequência cardíaca, refletindo aumentada atividade nervosa simpática, pode desempenhar importante papel no desenvolvimento de aterosclerose através dos lipídeos sanguíneos e da pressão arterial, além de ter importante e mais direto papel na ocorrência de mortes súbitas cardíacas, contribuindo para o grande número de óbitos relacionados a estes fatores (RUBATTU *et al.*, 1993; WANNAMETHEE & SHAPER, 1994; KOSKINEN *et al.*, 1995). Um estudo realizado em homens brancos e saudáveis demonstrou que a frequência cardíaca

correlaciona-se positivamente com níveis séricos de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e inversamente com lipoproteínas de alta densidade (HDL) (BØNAA & ARNESEN, 1992). Além disso, existe um complexo *cross-talk* entre receptores β adrenérgicos, que promovem vasodilatação, e receptores de LDL, visto que um aumento nos níveis de AMPc resulta em elevada expressão de receptores de LDL. Estudos em porcos com níveis elevados de colesterol (dez vezes superior ao dos animais controle) mostraram que β -AR diminuíram em torno de 30% nas membranas plasmáticas cardíacas. Contudo, foi demonstrado que a vaso-regulação está alterada a concentrações séricas de LDL muito mais baixas, e que a leve oxidação desta lipoproteína, modificando o funcionamento dos β -AR, conduz a alterações da atividade vasomotora (BREHM *et al.*, 1998).

GANGULY (1991) observou que alteração na concentração plasmática de noradrenalina sugere modificações na atividade simpática, após o aumento da carga de trabalho imposta ao coração por constrição aórtica. Este efeito foi associado com aumentado nível de adrenolutina e aumento do número de receptores adrenérgicos presentes no miocárdio, mas com diminuição da responsividade aos agonistas adrenérgicos. Este autor sugere que os radicais livres, gerados durante a oxidação das catecolaminas derivadas da persistente ativação simpática, possam promover alterações no funcionamento dos β -AR ou mecanismos pós-receptor.

Como o colesterol plasmático tem sido implicado como um dos importantes fatores na incidência de doenças cardiovasculares e na hipertensão, isto tem gerado uma busca por formas efetivas de diminuir seus níveis plasmáticos objetivando a redução na incidência destas doenças na sociedade. Agentes hipocolesterolêmicos, de origem natural ou sintética, além de uma re-educação alimentar, com consumo de gorduras e proteínas de fontes vegetais, bem como dietas com alta quantidade de fibras efetivas na redução dos níveis de colesterol plasmático têm sido valorizadas (GRUNDY & BEARN, 1988; MARINETTI, 1990; MARFO *et al.*, 1990; FARIAS *et al.*, 1996).

A *Croton cajucara* Benth. é uma planta tipicamente brasileira, da região amazônica, sendo citada como espécie medicinal no Acre e Amazonas (DI STASI *et al.*, 1989). Pertence à família Euphorbiaceae, e vem sendo comercializada em feiras livres, em Belém do Pará, para o tratamento de variados sinais e sintomas. É conhecida com o nome de “sacaca”, que significa “feitiço” (SIMÕES, 1979). Extratos de folhas e cascas de *C.*

cajucara são utilizadas no tratamento de distúrbios renais, gástricos, hepáticos, no tratamento de diabetes e também para reduzir o colesterol sanguíneo (VAN DER BERG, 1982; ITOKAWA *et al.*, 1989; KUBO *et al.*, 1991; FARIAS *et al.*, 1996). Além disso, o chá das cascas de sacaca é tido como auxiliar no tratamento da malária, diabetes, inflamação do fígado, vesículas e rins (VAN DER BERG, 1982). O chá das folhas é utilizado pelos índios Tenharins (Humaitá-AM) contra dores de estômago, febres, icterícia e malária. Além disso, trata-se hepatite incluindo-se folhas de melão de São Caetano ou *Mormodica charantia* L. no preparo do chá de sacaca (DI STASI *et al.*, 1989).

Além disso, certas substâncias extraídas desta planta apresentaram atividades anti-inflamatórias, antinociceptivas, significativo efeito hipoglicêmico em ratos diabéticos induzidos por aloxano, atividade anti-ulcerogênicos e, mais recentemente, estuda-se sua possível atividade antitumoral (CARVALHO *et al.*, 1996; FARIAS *et al.*, 1997; MACIEL *et al.*, 2000).

Os objetivos do nosso trabalho foram induzir hipercolesterolemia em ratos, por meio da ingestão de dieta contendo 15% de gordura, e analisar o efeito do tratamento com o infuso de cascas de sacaca sobre o perfil lipídico plasmático destes animais. Analisamos também a sensibilidade ao efeito cronotrópico de agonistas de adrenoreceptores β do átrio isolado de ratos hipercolesterolêmicos, tratados ou não com infuso de sacaca.



FIGURA 1a - *Croton. cajucara* em seu habitat.



FIGURA 1b - As cascas do caule *C. cajucara*.

OBJETIVOS

Induzir hipercolesterolemia em ratos por meio da ingestão de dieta hipercolesterolêmica;

Analisar o efeito do tratamento com o infuso das cascas de sacaca sobre o perfil lipídico no plasma de ratos normocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos;

Analisar a sensibilidade ao efeito cronotrópico de agonistas de β -AR em átrio direito isolado de ratos normocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos, tratados ou não com o infuso de sacaca.

METODOLOGIA

1. Preparo do infuso a partir das cascas de sacaca

As cascas de sacaca foram adquiridas em Belém do Pará e moídas na Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp para serem acondicionadas à vácuo, em embalagem inviolável, e armazenadas em temperatura ambiente, até o momento do uso. As cascas de *Croton cajucara* foram coletadas em uma plantação experimental em Benfica, próxima a Belém do Pará. Uma amostra foi identificada por Néelson A. Rosa e depositada no herbário do “Museu Paraense Emílio Goeldi” sob número 247.

O infuso das cascas de sacaca a 10% foi preparado, diariamente, misturando-se 10 g do pó das cascas de sacaca em 100 mL de água fervente. A mistura foi tampada e deixada em contato durante 20 minutos. Em seguida, escorriam-se as gotículas contidas na tampa de vidro para o infuso, pois estas contêm o óleo com o princípio ativo da planta, e processava-se a filtração do infuso, fazendo-o passar através de filtro de papel. Este infuso foi fornecidos *ad libitum* a cada rato, em substituição à água de beber, durante 15 dias.

2. Animais

Utilizamos ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. albina, Rodentia, Mammalia, S.P.F.), com idade de 6, 10 e 12 semanas, os quais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas e pela Anilab-Centro de Criação e Fornecimento de Animais de Laboratório, sendo mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, pelo menos por uma semana antes do início do tratamento.

Os animais foram alojados, a partir da décima semana, em gaiolas metabólicas individuais para controle de ingesta alimentar e hídrica. A sala era dotada de controle de temperatura, a qual era mantida constante ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e do ciclo claro-escuro de 12/12 horas, com o ciclo claro iniciando-se às 6:30 horas.

O peso corporal dos animais foi avaliado semanalmente para determinar suas alterações com relação à ingesta alimentar e/ou ao efeito do infuso de sacaca.

3. Grupos experimentais e tratamento

3.1. Animais Normocolesterolêmicos (N)

Entre dez e doze semanas de idade os animais foram pesados e continuaram a receber como alimento ração balanceada para roedores, Marca Purina, contendo 4% de gordura. Diariamente foi avaliado o consumo de ração e líquido ingerido pelos animais, que tinham acesso livre a 100 g de ração/dia e 100 ml de água ou infuso/dia.

3.2. Animais Hipercolesterolêmicos (H)

Os animais deste grupo, ao completarem seis semanas de idade foram pesados e, em seguida foram distribuídos em gaiolas coletivas (três animais por gaiola) onde passaram a receber uma dieta especialmente preparada para induzir concentrações plasmáticas elevadas de colesterol, sob marca Purina (ração # 5001) e fabricada por Dyets Inc. (2508 Easton Avenue, P.O. Box Bethlehem, PA 18017). Esta dieta contém 15% de gordura proveniente de manteiga de cacau, 1,25% de colesterol e 0,5% de ácido cólico (PAIGEN *et al.*, 1987). Ácido cólico é sintetizado no fígado a partir do colesterol, sendo um dos componentes primários dos ácidos biliares que atuam na emulsificação dos lipídeos, facilitando sua digestão e, conseqüentemente, sua absorção.

Quatro semanas após o início deste tratamento, ao completarem 10 semanas de idade, catorze animais permaneceram em jejum por 16 horas. Ao término deste período foram anestesiados com pentobarbital sódico (60 mg/Kg, i.p.) para retirada de uma amostra de sangue, por punção cardíaca, para avaliação da concentração plasmática de colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triacilgliceróis, sendo posteriormente reincorporados aos seus respectivos grupos. A partir da décima semana de idade os ratos redistribuídos em quatro grupos de acordo com o líquido que receberam para beber.

Assim, os grupos experimentais se delinearam da seguinte forma:

Normocolesterolêmico-Água (NA): animais normocolesterolêmicos que receberam água para beber;

Normocolesterolêmico-Infuso (NI): animais normocolesterolêmicos que receberam o infuso de sacaca a 10% diariamente, em substituição à água;

Hipercolesterolêmicos-Água (HA): animais onde a hipercolesterolemia foi induzida pela dieta e que receberam água para beber;

Hipercolesterolêmicos-Infuso (HI): animais onde a hipercolesterolemia foi induzida pela dieta e que a água de beber foi substituída por infuso das cascas de sacaca a 10% oferecido diariamente.

Delineamento experimental:

GRUPO/IDADE	6 ^a a 10 ^a semana	11 ^a e 12 ^a semana	Final da 12 ^a semana
<i>Normocolesterolêmicos</i>			
NA	Dieta 4% gordura+água	Dieta 4% gordura+água	
NI	Dieta 4% gordura+água	Dieta 4% gordura+infuso 10%	
<i>Hipercolesterolêmicos</i>			Coleta de dados
HA	Dieta 15% gordura+água	Dieta 15% gordura+água	
HI	Dieta 15% gordura+água	Dieta 15% gordura+infuso 10%	

4. Coleta de sangue para avaliação das concentrações plasmáticas de indicadores do metabolismo lipídico

Quando os animais completaram 12 semanas de vida, no 14º dia de tratamento com o infuso das cascas de sacaca, a ração foi retirada e os animais foram mantidos em jejum, durante 16 horas. Todos os animais do estudo (normocolesterolêmicos água ou infuso e hipercolesterolêmicos água ou infuso) tiveram tratamento semelhante.

Na manhã do 15º dia os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (60 mg/Kg; i.p.). Após 45 minutos, tempo necessário para o efeito do anestésico, foi realizada a coleta de cerca de cinco ml de sangue, por punção cardíaca, com seringa descartável e agulha hipodérmica 30x8. O sangue foi, em seguida, centrifugado (2500 rpm por 10 min) e o soro obtido armazenado em geladeira ou freezer a -20°C até a dosagem de colesterol total, HDL e TAG. Os valores de LDL e VLDL foram obtidos indiretamente a partir da fórmula de FRIEDEWALD (1972).

5. Avaliação das concentrações plasmáticas

5.1. Análise do colesterol plasmático

Os níveis plasmáticos de colesterol total foram avaliados por colorimetria através da utilização de *kit* para dosagem de colesterol (Laborlab). O método se baseia em uma reação enzimática-colorimétrica utilizando-se as enzimas lipase, colesterol oxidase e a peroxidase, para determinação do colesterol no plasma ou no soro.

5.2. Análise dos triacilgliceróis

Os níveis plasmáticos de triacilgliceróis foram avaliados por colorimetria, utilizando-se *kit* para dosagem enzimática (Laborlab). O método possui o seguinte fundamento: a hidrólise dos triacilgliceróis é catalisada por uma lipase que induz a produção de glicerol e ácidos graxos livres. O glicerol gerado é posteriormente fosforilado por adenosina 5-trifosfato em presença de gliceroquinase, resultando em glicerol-3-fosfato.

Este, por sua vez, sofre uma oxidação catalisada pela enzima L-glicerol-3-fosfato oxidase produzindo água oxigenada. Um intenso cromógeno vermelho é produzido pela peroxidase que catalisa a copulação oxidativa da 4-aminoantipirina e 2-hidroxi-3,5-diclorobenzenosulfonato de sódio com água oxigenada.

5.3. *Lipoproteínas*

Os níveis plasmáticos de HDL foram avaliados por espectrofotometria utilizando-se um *kit* de dosagem (Laborlab) de HDL colesterol precipitante. A lipoproteínas de alta densidade (HDL) são separadas seletivamente, por precipitação, das de baixa e muito baixa densidade (LDL e VLDL, respectivamente), usando-se o sulfato de dextran em presença de íons Mg^{2+} .

Após a obtenção direta dos valores de HDL calculamos os níveis de LDL e VLDL a partir da fórmula de FRIEDEWALD (1972), onde:

$$VLDL \text{ colesterol (mg/dL)} = \text{triacilgliceróis (mg/dL)} / 5;$$

$$LDL \text{ colesterol (mg/dL)} = \text{colesterol total} - (\text{HDL colesterol} + \text{VLDL colesterol})$$

Todas as leituras foram realizadas em espectrofotômetro com comprimento de onda (λ) = 505 nm.

6. *Isolamento do Átrio Direito*

6.1. *Preparo do Átrio Direito Isolado*

Para o estudo da sensibilidade às catecolaminas em átrio isolado, os animais foram sacrificados por imediata secção dos vasos e coluna cervical. O tórax foi aberto (laparotomia mediana), o coração rapidamente removido e o átrio direito isolado, assegurando-se a integridade do nodo sino-atrial. Em seguida, este átrio foi preparado para registro isométrico de suas contrações espontâneas, sob tensão diastólica de 0,5g, em uma cuba para órgão isolado contendo 20 mL de solução fisiológica de Krebs-Hanseleit

(BASSANI & DE MORAES, 1988) com a seguinte composição química em milimolar: NaCl: 115; KCl: 4,6; $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 2,5; KH_2PO_4 : 1,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$: 2,5; NaHCO_3 : 25; glicose: 11; ácido ascórbico: 0,11. O ácido ascórbico adicionado à solução tem a finalidade de reduzir a oxidação das catecolaminas durante a obtenção das curvas concentração-efeito.

Para registro das contrações espontâneas foi utilizado um transdutor isométrico de tensão Narco BioSystem (modelo F-60), conectado a um polígrafo Narco Bio-System (modelo DMP-4). As preparações foram incubadas até obtenção de uma frequência estável de batimentos espontâneos, determinada por flutuações de frequência menores que 5 batimentos por minuto (bpm), durante um intervalo de 15 minutos. A solução fisiológica de incubação foi mantida a uma temperatura de $36,5 \pm 0,1^\circ\text{C}$, com o auxílio de uma bomba de perfusão (Ética Equipamentos Científicos S.A.), e saturada com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2). Além disso, durante o período de incubação, a solução de Krebs-Hanseleit foi substituída a cada 15 minutos.

Os átrios que apresentaram irregularidades rítmicas ou não estabilizaram sua frequência após 60 minutos de incubação foram descartados.

6.2. Obtenção da Curva Dose-Resposta

As curvas dose-resposta (CDR) foram obtidas pelo método cumulativo, com incrementos sucessivos de 0,5 unidade logarítmica na concentração molar de agonista (VAN ROSSUM, 1963). A resposta máxima foi determinada quando três concentrações sucessivas crescentes do agonista não determinaram alteração da resposta obtida com a concentração imediatamente anterior.

A sensibilidade do átrio direito foi avaliada pela determinação do valor pD_2 de cada agonista de adrenoceptores, correspondente ao logaritmo negativo da concentração molar do agonista que determina uma resposta igual a 50% da resposta máxima (EC_{50}), em cada experimento.

Os agonistas adrenérgicos utilizados foram o isoproterenol (β_1 , β_2 , β_3 e β_4) (MOTOMURA *et al.*, 1990), a noradrenalina (β_1 , β_3 e β_4) e o soterenol (MINNEMAN *et al.*, 1981).

7. Pré-tratamento farmacológico in vitro do tecido atrial

Nos experimentos farmacológicos, no qual se utilizou antagonista β adrenérgico, antes da obtenção da CDR, as preparações foram submetidas a tratamento farmacológico. Este tratamento teve por objetivo produzir inibição dos mecanismos de recaptação neuronal e extraneuronal, assim como bloqueio dos receptores α adrenérgicos e muscarínicos.

7.1. Inibição dos Sistemas de Captação Neuronal e Extraneuronal

A inibição do sistema de captação extraneuronal foi realizada pela adição de fenoxibenzamina (10 μ M) ao líquido de incubação. A fenoxibenzamina promove a inibição do sistema de captação extraneuronal e recaptação neuronal (IVERSEN & WILSON, 1972; BRYAN *et al.*, 1981), bloqueio dos adrenoceptores α (BESSE & FURCHGOTT, 1976; BRYAN *et al.*, 1981) e dos receptores colinérgicos muscarínicos (FURCHGOTT & BURSZTYN, 1967).

A fenoxibenzamina permaneceu em contato com a preparação por 30 minutos e, após este período, o líquido de incubação foi substituído, sendo ainda renovado a cada 10 minutos até o retorno de uma frequência próxima à inicial.

Para garantir o bloqueio do processo de captação extraneuronal, após a estabilização da frequência de batimentos espontâneos, foi adicionada corticosterona (10 μ M) à preparação por cerca de 10 minutos, antes da realização da curva concentração-efeito, a qual permaneceu em contato com a preparação durante todo o processo. A corticosterona é um potente inibidor do mecanismo de captação extraneuronal (IVERSEN & SALT, 1970; BONISCH & TRENDELENBURG, 1974).

7.2. Pré-Tratamento com Antagonista

Após a inibição dos sistemas de captação neuronal e extraneuronal realizou-se uma incubação com 30 η M de CGP20712A, um antagonista adrenérgico seletivo β_1 (KAUMANN, 1986) juntamente com corticosterona previamente adicionada com o pré-tratamento (10 μ M) em 20 ml de solução fisiológica por um período de uma hora e, ao

término deste período, repetindo-se o procedimento. Ao final de duas horas de incubação foi obtida uma CDR à isoprenalina em meio contendo antagonista. A concentração de CGP20712A usada foi aquela na qual sua interação com o adrenoceptor β_1 possui altíssima afinidade e apenas mínimas interações a outros sítios (ZANESCO *et al.*, 1996).

7.3. Determinação do valor pK_B do CGP20712A

A determinação do valor pK_B (definido como o logaritmo negativo da constante de equilíbrio de dissociação do complexo antagonista-receptor) do CGP20712A foi realizada utilizando-se o método de SCHILD (SCHILD, 1947; ARUNLAKSHANA & SCHILD, 1959). Após a realização do tratamento farmacológico completo, foram obtidas curvas dose-resposta para o isoproterenol, na presença e na ausência de CGP20712A a 30 η M.

Após a obtenção das curvas, foram calculadas as razões das concentrações eqüiefetivas (DR), a partir da EC_{50} ($pD_2 = -\log EC_{50}$) do agonista, na presença e na ausência do antagonista. A partir deste resultado a constante do equilíbrio de dissociação para a interação do antagonista com o receptor, K_B , foi determinada usando-se o método de BESSE & FURCHGOTT (1976):

$$K_B = [B] / (DR - 1)$$

onde [B] indica a concentração molar do antagonista, apresentado como logaritmo negativo, ou pK_B .

8. Análise Estatística

A partir dos dados individuais foram calculados as médias e seus respectivos erros padrões.

A comparação das concentrações plasmáticas de colesterol total, suas frações e do triacilglicerol entre os diferentes grupos foi feita por meio de Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Valores de P menores ou iguais a 5% foram aceitos como indicativos de diferenças estatisticamente significativas. O método paramétrico foi

utilizado após aplicação do teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual nos indicou que os dados apresentavam distribuição gaussiana normal. Entretanto, utilizamos o teste não-paramétrico de Kuskal-Wallis para identificarmos a mediana e certificarmos a significância de P.

Análise de regressão não-linear usadas para determinar os valores pD_2 e para a confecção das curvas concentração-efeito foi realizada através do *software* Graph-Pad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA), com valores para resposta na ausência de agonista iguais a zero.

Análise de Variância seguida de teste de Tukey foi utilizada para comparar a frequência inicial de batimentos espontâneos, respostas máximas e valores pD_2 entre os grupos.

9. Fármacos e reagentes

Anestésico: Hipnol (pentobarbital sódico), marca Fontoveter – Divisão Veterinária de Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda;

Kits para análise de glicose, triacilgliceróis, colesterol total e HDL colesterol da marca Laborlab S/A Produtos para Laboratório;

Cloridrato de isoproterenol [(±)-isoproterenol.HCl], *bitartarato de noradrenalina* [(±) arterenol] e *corticosterona* Sigma Chemical Company – Sigma-Aldrich Química do Brasil Ltda;

Cloridrato de soterenol [soterenol.HCl] fabricada por Bristol-Myers Co. Evansville, Indiana 47721.

Hidrocloreto de fenoxibenzamina e *CGP20712A metanosulfonato* de marca Research Biochemicals International (RBI/Sigma), Natick, Massachusetts 01760-2447;

Todos os sais utilizados para o preparo da solução fisiológica foram de padrão ACS.

As soluções estoques foram preparadas em solução aquosa de ácido ascórbico a 2% e armazenadas a -20°C , por no máximo sete dias. A fenoxibenzamina e a corticosterona foram preparadas em etanol absoluto e armazenadas à mesma temperatura, por até 30 dias.

As diluições para as curvas dose-resposta foram feitas em solução de Krebs-Henseleit imediatamente antes do uso, e descartadas em seguida.

RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta os pesos corporais dos ratos. Na 6ª semana de vida, quando se iniciou o experimento, as médias dos pesos dos ratos dos grupos experimentais não diferiram entre si. A partir desta idade, os ratos passaram a receber dieta balanceada com 4% de lipídeos (normocolesterolêmicos) ou dieta rica em colesterol (hipercolesterolêmicos) até completarem dez semanas. Neste período de quatro semanas, o ganho de peso foi similar entre os animais normocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos. Assim sendo, na 10ª semana de vida, antes do início do tratamento com o infuso da sacaca a 10%, os pesos destes animais não foi diferente daqueles dos ratos hipercolesterolêmicos. Os ratos normocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos, que receberam água para beber (NA e HA), continuaram a ganhar peso nas duas semanas seguintes, de modo que seus pesos corporais não foram estatisticamente diferentes ao final da 12ª semana de idade. O mesmo ocorreu com os ratos que receberam ração hipercolesterolêmica e foram tratados com o infuso de sacaca a 10% (HI). Entretanto, ratos normocolesterolêmicos que beberam infuso de sacaca a 10% (NI) apresentaram ganho de peso menor que os demais grupos.

Foi avaliado também o aspecto macroscópico do fígado e observamos que houve um aumento significativo no peso do fígado dos animais hipercolesterolêmicos (Tabela 1). Este órgão apresentava coloração esbranquiçada, com pontos escuros, sugerindo esteatose hepática. A administração do infuso nas duas concentrações diferentes, durante 15 dias, não propiciou a reversão deste quadro (Figura 2).

TABELA 1 – Evolução do peso corporal de ratos normocolesterolêmicos que beberam água (NA), normocolesterolêmicos que beberam infuso de sacaca a 10% (NI); hipercolesterolêmicos que beberam água (HA) e hipercolesterolêmicos que beberam infuso de sacaca a 10% (HI) e peso hepático ao final do experimento.

Grupo\Idade	6 semanas (g)	10 semanas (g)	Δ	12 semanas (g)	∇	Fígado (g)
NA	158±3 (9)	269±5 ^a (18)	41,3	306±8 ^b (17)	12,1	8,9±0,3 (19)
NI	147±6 (9)	269±6 ^a (18)	45,3	284±5 ^c (18)	5,6	9,2±0,2 (19)
HA	149±5 (8)	265±4 ^a (22)	43,7	305±9 ^b (17)	13,1	18,7±1,2 ^c (7)
HI	148±5 (15)	269±6 ^a (28)	44,9	300±6 ^b (23)	10,3	20,2±0,6 ^c (14)

Dados apresentados como médias ± EPM. O número de animais utilizados está representado entre parênteses. Estatisticamente diferente ($p < 0,05$) em: ^a comparado aos animais com 6 semanas; ^b comparado aos animais com 10 semanas; ^c comparado ao grupo NA (ANOVA seguida de teste de Tukey). Δ e ∇ correspondem ao ganho de peso corporal (%) entre a 6^a e a 10^a semana e entre a 10^a e 12^a semana de idade, respectivamente.

A



B

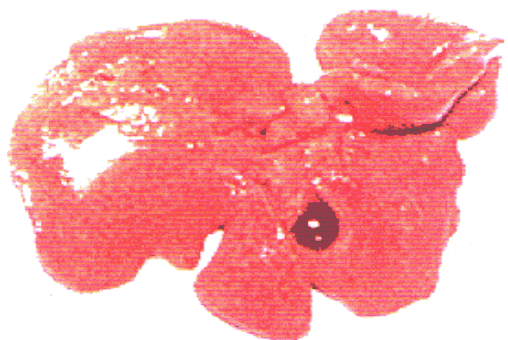


FIGURA 2 - Fotografia do fígado de um animal normocolesterolêmico (A) e de outro hipercolesterolêmico (B). Figuras extraídas de Pinto (1999).

A quantidade de ração e de líquidos ingeridos pelos ratos foi avaliada diariamente, no período entre a 10^a e a 12^a semanas de idade (Figuras 3A e B, respectivamente). Uma vez que não houve diferenças significativas da ingesta alimentar ou líquida durante o período, dentro de cada grupo, a ingesta diária média no período foi calculada e está apresentada na Tabela 2.

A ingesta alimentar diária média dos ratos normocolesterolêmicos (NA e NI) não apresentou diferença significativa, indicando que a ingesta do infuso não influenciou a ingesta de alimento. Por sua vez, os ratos hipercolesterolêmicos ingeriram uma quantidade de alimento significativamente menor comparado aos normocolesterolêmicos. Entretanto, estes animais apresentaram peso corporal semelhante àqueles dos grupos normocolesterolêmicos na 12^a semana de vida (Tabela 1). A ingesta de infuso em substituição à água também não influenciou a ingesta de ração com alto teor lipídico.

Quanto à ingesta líquida, não se observou qualquer diferença entre os grupos (Tabela 2).

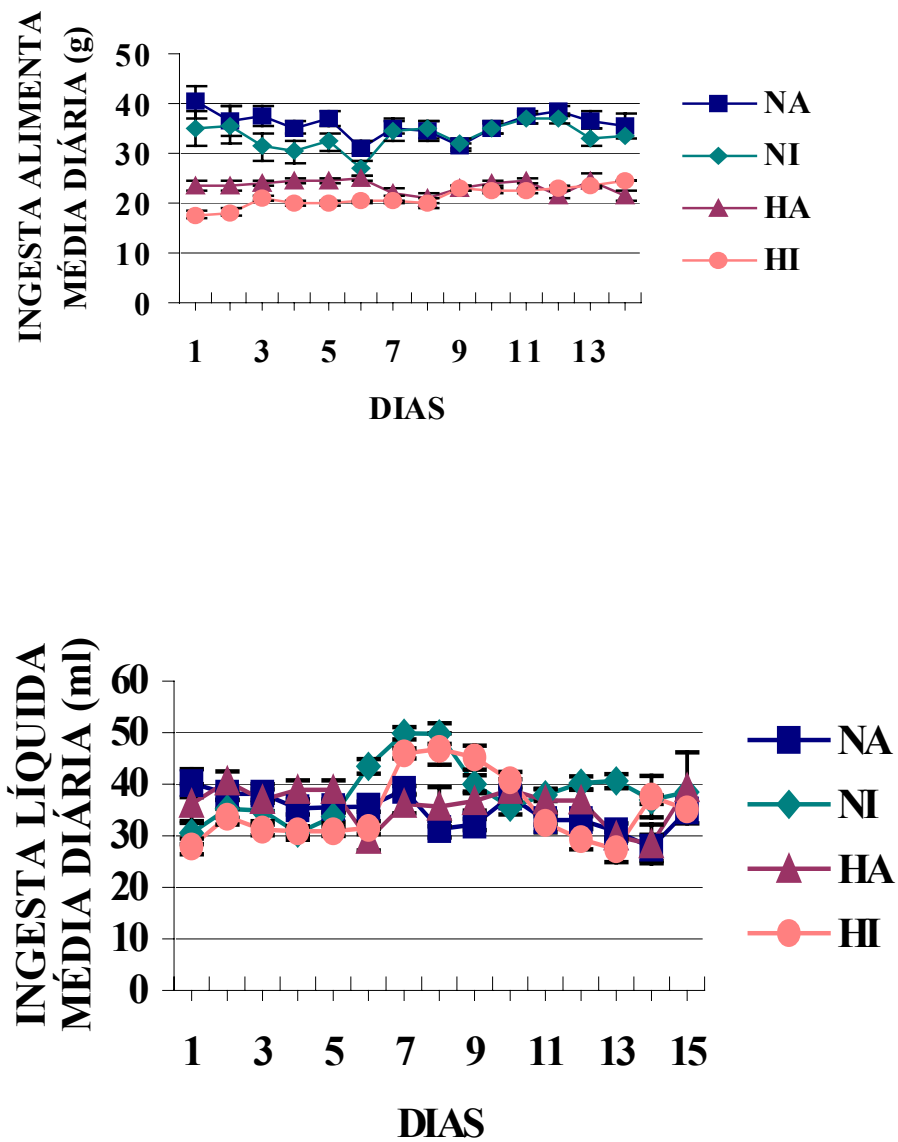


FIGURA 3 - Ingesta alimentar e líquida média diária de ratos normocolesterolêmicos que beberam água (NA), normocolesterolêmicos que beberam infuso de sacaca a 10% (NI); hipercolesterolêmicos que beberam água (HA) e hipercolesterolêmicos que beberam infuso de sacaca a 10% (HI), entre a 10^a e a 12^a semanas de idade. Diferenças estatísticas e números de experimentos estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 - Ingesta alimentar e líquida média diária de ratos normocolesterolêmicos que beberam água (NA), normocolesterolêmicos que beberam infuso de sacaca a 10% (NI); hipercolesterolêmicos que beberam água (HA) e hipercolesterolêmicos que beberam infuso de sacaca a 10% (HI).

Grupo	Ingesta Alimentar (g)	Ingesta Líquida (ml)
NA	35,9±1,3 (17)	35,7±1,0 (17)
NI	35,3±1,8 (18)	37,5±1,0 (18)
HA	23,2±0,4 ^a (17)	36,7±0,9 (17)
HI	20,6±0,4 ^a (23)	36,2±1,0 (23)

Dados apresentados como média ± EPM. O número de animais utilizados está representado entre parênteses. Estatisticamente diferente ($p < 0,05$) em: ^a comparados ao grupo NA e NI (ANOVA seguida de teste de Tukey).

A Tabela 3 apresenta as concentrações plasmáticas de colesterol total em ratos normocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos tratados ou não com infuso de sacaca.

A concentração sanguínea de colesterol de ratos com 6 semanas de idade corresponde ao valor basal para todos os grupos, visto que não havia, a esta idade, qualquer manipulação ou tratamento aplicado aos animais.

Na 10ª semana de idade ocorreu elevação das concentrações plasmáticas de colesterol total nos ratos alimentados com ração contendo alto teor lipídico (HA) quando comparados aos animais normocolesterolêmicos (NA), os quais permaneceram com taxas semelhantes àsquelas da 6ª semana (Tabela 3). Entretanto, até a 12ª semana, nos animais alimentados com ração contendo alto teor de lipídeos, não houve nenhum acréscimo adicional da concentração sanguínea de colesterol total.

Por outro lado, observou-se que a esta idade a concentração sanguínea de colesterol total de ratos hipercolesterolêmicos que beberam água ou infuso apresentou grande variação individual, sugerindo que alguns animais eram mais resistentes aos efeitos da ração hipercolesterolêmica enquanto outros eram mais sensíveis, de modo que a média aritmética dos dados não refletia a observação experimental. Para definirmos se realmente havia grupos distintos dentro do grupo de animais hipercolesterolêmicos, determinamos a frequência de distribuição (moda) dos valores de colesterol total, estabelecendo intervalos de dez unidades, a partir do valor mínimo obtido. Observamos a ocorrência de duas modas: uma delas se situava entre as concentrações de 61 e 80 mg/dL e a outra entre 91 e 110 mg/dL de colesterol plasmático.

Determinamos também as medianas das concentrações plasmáticas de colesterol total dos grupos alimentados com ração hipercolesterolêmica (HA e HI), as quais não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$; ANOVA seguida pelo teste de Tukey). As medianas também foram semelhantes às medias dos respectivos grupos (Tabela 3).

Assim sendo, levamos em conta os valores das modas para distribuir os dados obtidos em dois grupos denominados: ratos “sensíveis” aos efeitos da dieta, cujas concentrações plasmáticas de colesterol total se situavam próximos da moda superior, e ratos “resistentes” à dieta, cuja concentração sanguínea de colesterol total se aproximava da

moda inferior. No primeiro grupo, a concentração sangüínea de colesterol total foi cerca de 3 vezes maior que aquela observada em ratos normocolesterolêmicos, enquanto que no segundo grupo a concentração foi apenas 2 vezes maior. A ingesta de infuso de sacaca não alterou significativamente a concentração sangüínea de colesterol em nenhum dos grupos (Tabela 4).

TABELA 3 - Concentração sanguínea de colesterol total (mg/dL) em ratos com 6, 10 e 12 semanas de idade que ingeriram ração com 4% ou 15% de lipídeos, e beberam água (NA e HA) ou infuso a 10% de sacaca (NI e HI).

Grupo\Idade	6 semanas	10 semanas	12 semanas	Mediana	Mínimo	Máximo
NA	39,5±4,8 (10)	44,2±3,1 (8)	35,8±2,8 (17)	37,0	15,1	56,1
NI			29,7±1,8 ^a (18)	29,0	16,3	46,0
HA		96,3±9,1 ^{a b} (9)	84,2±4,8 ^b (20)	76,3	52,8	134,0
HI			81,2±4,9 ^b (23)	76,8	38,8	123,7

A partir da 6ª semana de idade, os ratos dos grupos NA e NI continuaram a ingerir ração com 4% de lipídeos e aqueles dos grupos HA e HI passaram a ingerir ração com 15% de lipídeos. Entre a 10ª e a 12ª semana de idade, os animais dos grupos NI e HI receberam infuso a 10% de sacaca. As coletas de sangue para análise das concentrações plasmáticas de colesterol total foram realizadas após jejum de 16 horas. Os dados estão apresentados como médias ± EPM. Estatisticamente diferente ($p < 0,05$) em: ^a comparado aos animais na 6ª semana de idade; ^b comparados aos grupos NA e NI na 12ª semana (ANOVA seguida do teste de Tukey).

As concentrações sanguíneas das lipoproteínas são apresentadas na Tabela 4. A concentração sanguínea de HDL foi estatisticamente similar em todos os grupos, ou seja, nem a ração hipercolesterolêmica nem o infuso de sacaca administrado aos ratos promoveram alteração na concentração sanguínea desta lipoproteína (Tabela 4).

A concentração sanguínea de LDL foi significativamente maior em ratos que ingeriram a dieta hipercolesterolêmica, principalmente naqueles classificados como “sensíveis”, o que indica que o aumento da concentração sanguínea de colesterol total observado nos animais alimentados com a ração hipercolesterolêmica foi decorrente do aumento da fração LDL do colesterol. O tratamento com infuso a 10% de sacaca promoveu redução nas concentrações plasmáticas de LDL, visto que ratos do grupo HI-sensível apresentaram uma concentração sanguínea significativamente reduzida quando comparado ao grupo HA-sensível ($p < 0,05$; ANOVA seguida de teste de Tukey). Entretanto, mesmo nos ratos do grupo HI-sensível, a concentração sanguínea de LDL foi maior que aquela de ratos normais (grupo NA). Os ratos alimentados com ração hipercolesterolêmica mas “resistentes” ao seu efeito (HA-r e HI-r), apresentaram concentrações plasmáticas significativamente inferiores àsquelas dos grupos “sensíveis”. Apresentaram, ainda, uma concentração sanguínea de LDL significativamente elevada em comparação ao grupo controle (NA), mas que não diferiram entre si (Tabela 4).

A ração hipercolesterolêmica promoveu elevação significativa da concentração sanguínea de VLDL ($p < 0,05$; ANOVA seguida pelo teste de Tukey). Entre aqueles alimentados apenas com ração hipercolesterolêmica, sensíveis ou resistentes ao seu efeito, tratados ou não com o infuso de sacaca, não houve alterações estatisticamente significativas (Tabela 4).

TABELA 4 - Concentrações sanguíneas de colesterol total, HDL, LDL e VLDL (mg/dL) de ratos que ingeriram ração com 4% ou 15% de lipídeos, e beberam água (NA e HA) ou infuso a 10% de sacaca (NI e HI). Os ratos que ingeriram ração hipercolesterolêmica estão divididos em sensível e resistente ao efeito da ração.

Grupo	Colesterol Total	HDL	LDL	VLDL	Índice Aterogênico
NA	35,8±2,8 (17)	19,1±3,1 (12)	13,6±2,7 (8)	5,1±0,4 (15)	0,87
NI	29,7±1,8 (18)	15,3±2,4 (12)	12,5±1,4 (7)	5,2±0,7 (16)	0,94
HA-sensível	102,0±4,8 ^{a b} (10)	11,1±3,4 (4)	93,4±7,7 ^{a b} (5)	8,0±1,4 ^a (6)	8,19
HA-resistente	66,4±2,2 ^{a b c} (10)	20,2±2,3 (6)	37,8±2,6 ^{a b c} (8)	7,1±0,8 ^a (8)	2,29
HI-sensível	99,3±4,7 ^{a b d} (12)	23,9±5,5 (9)	61,2±5,4 ^{a b c d} (11)	7,9±1,2 ^{a b} (11)	3,15
HI-resistente	61,6±3,3 ^{a b c e} (11)	16,5±3,9 (9)	43,2±5,6 ^{a b c} (9)	8,0±1,0 ^{a b} (9)	2,73

A partir da 6ª semana de idade, os ratos dos grupos NA e NI continuaram a ingerir ração com 4% de lipídeos e aqueles dos grupos HA e HI passaram a ingerir ração com 15% de lipídeos. Entre a 10ª e a 12ª semana de idade, os animais dos grupos NI e HI receberam infuso a 10% de sacaca. As coletas de sangue para análise das concentrações plasmáticas foram realizadas após jejum de 16 horas. Os dados estão apresentados como médias ± EPM dos animais na 12ª semana. A última coluna apresenta o índice aterogênico (Colesterol Total – HDL / HDL). Estatisticamente diferente ($p < 0,05$) em: ^a comparado ao grupo NA; ^b comparado ao grupo NI; ^c comparado ao grupo HA-sensível; ^d comparado ao grupo HA-resistente; ^e comparado ao grupo HI-sensível (ANOVA seguida do teste de Tukey).

A concentração sanguínea de triacilgliceróis se manteve inalterada em animais normocolesterolêmicos tratados ou não com o infuso de sacaca (NA e NI) (Tabela 5). Em ratos tratados com ração contendo alto teor de lipídeos, a concentração sanguínea de triacilglicerol não apresentou diferença significativa entre a 6ª e a 10ª semana de idade, ou seja, após quatro semanas ingerindo esta ração. Na 12ª semana a concentração sanguínea de triacilglicerol se elevou em comparação aos valores obtidos na 6ª semana. Entretanto, este aumento não foi estatisticamente diferente comparado aos ratos normocolesterolêmicos. O tratamento com infuso de sacaca não alterou a concentração sanguínea de triacilglicerol destes ratos tratados com a dieta hipercolesterolêmica (Tabela 5).

TABELA 5 - Concentração sangüínea de triacilglicerol (mg/dL) em ratos com 6, 10 e 12 semanas de idade que ingeriram ração com 4% ou 15% de lipídeos, e beberam água (NA e HA) ou infuso a 10% de sacaca (NI e HI).

Grupo\Idade	6 semanas	10 semanas	12 semanas
NA	27,8±3,9 (8)	25,6±2,7 (11)	23,8±2,3 (17)
NI			25,8±3,3 (18)
HA-sensível		32,6±8,4 (8)	40,3±7,1 (6)
HA-resistente			35,7±3,8 (8)
HI-sensível			39,6±6,1 (11)
HI-resistente			40,1±4,8 (9)

A partir da 6ª semana de idade, os ratos dos grupos NA e NI continuaram a ingerir ração com 4% de lipídeos e aqueles dos grupos HA e HI passaram a ingerir ração com 15% de lipídeos. Entre a 10ª e a 12ª semana de idade, os animais dos grupos NI e HI receberam infuso a 10% de sacaca. As coletas de sangue para análise das concentrações plasmáticas de triacilglicerol foram realizadas após jejum de 16 horas. Os dados estão apresentados como médias ± EPM. Os valores não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$; ANOVA seguida de teste de Tukey).

Analizamos o efeito da dieta e do tratamento com infuso a 10% de sacaca sobre a sensibilidade do átrio direito isolado de ratos aos agonistas de adrenoceptores. Curvas concentração-efeito monofásicas foram obtidas para a isoprenalina (Figura 4A), para a noradrenalina (Figura 4B) e para o soterenol (Figura 5). A frequência de batimentos espontâneos e a resposta máxima (calculadas em batimentos por minuto) aos agonistas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Tabelas 6, 7 e 8). A inclinação de cada curva concentração-efeito à isoprenalina e à noradrenalina foi calculada e os valores do coeficiente de Hill obtidos não foram significativamente diferentes da unidade (Tabelas 6 e 7).

As curvas concentração-efeito para a isoprenalina (Figura 4A) em átrios direitos de ratos normocolesterolêmicos não diferiram entre si, enquanto para a noradrenalina (Figura 4B) observamos uma ligeira e significativa redução. Quanto às curvas concentração-efeito realizadas em ratos hipercolesterolêmicos, todas foram deslocadas para a direita, cerca de 3,2 e 9,6 vezes respectivamente, ao nível dos valores pD_2 (Tabelas 6 e 7), em relação às curvas obtidas em átrios de ratos normocolesterolêmicos, indicando uma diminuição na sensibilidade do tecido a estes agonistas de adrenoceptores. As curvas concentração-efeito à isoprenalina e à noradrenalina obtidas em átrios de ratos hipercolesterolêmicos tratados com infuso a 10% de sacaca não diferiram estatisticamente daquelas obtidas em tecido cardíaco de ratos normocolesterolêmicos (Figura 4).

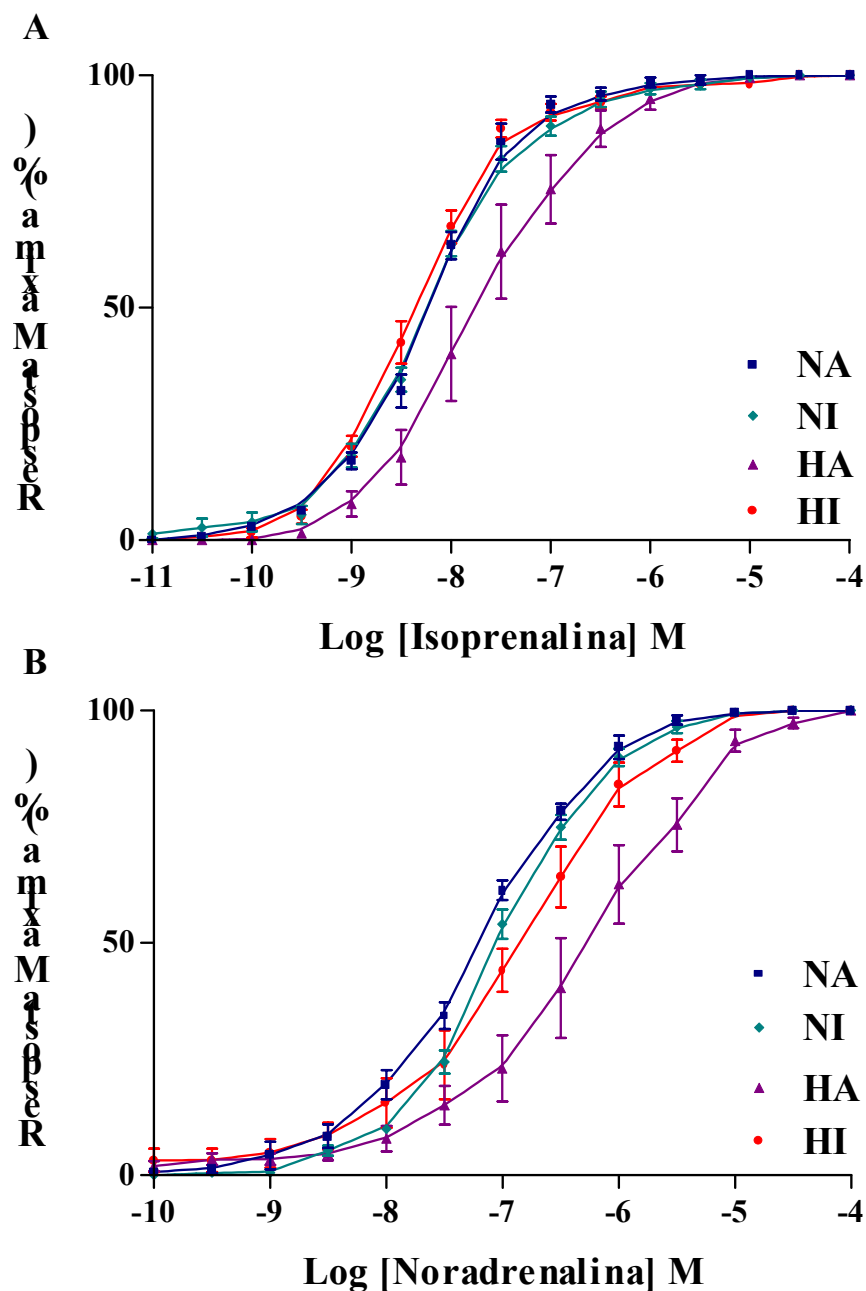


FIGURA 4 - Curvas concentração-efeito à isoprenalina (A) e à noradrenalina (B) em átrios direitos isolados de ratos normocolesterolêmicos que beberam água (NA) ou infuso de sacaca (NI); e de ratos hipercolesterolêmicos que beberam água (HA) ou infuso das cascas da sacaca a 10% (HI). As diferenças estatísticas e os números de experimentos estão apresentados nas Tabelas 6 e 7.

TABELA 6 - Frequência de batimentos espontâneos (FI), sensibilidade (pD_2), resposta máxima (RM) e coeficiente de Hill das curvas concentração-efeito à isoprenalina em átrios direitos de ratos normocolesterolêmicos que beberam água (NA) ou infuso (NI); e de ratos hipercolesterolêmicos que beberam água (HA) ou infuso das cascas da sacaca a 10% (HI).

ISOPRENALINA					
Grupos	n	pD_2	FI	RM	Coeficiente de Hill
NA	9	8,22±0,05	265±6	201±13	1,03±0,06
NI	10	8,24±0,05	267±11	195±15	0,93±0,08
HA	10	7,71±0,21 ^a	269±8	180±12	1,30±0,11
HI	7	8,36±0,08	265±8	205±14	1,04±0,05

Dados são apresentados como média ± EPM, sendo n o número de animais utilizados. Estatisticamente diferente ($p<0,05$) em: ^a comparados aos demais grupos (ANOVA seguida de teste de Tukey).

TABELA 7 - Frequência de batimentos espontâneos (FI), sensibilidade (pD_2), resposta máxima (RM) e coeficiente de Hill das curvas concentração-efeito à noradrenalina em átrios direitos de ratos normocolesterolêmicos que beberam água (NA) ou infuso (NI); e de ratos hipercolesterolêmicos que beberam água (HA) ou infuso das cascas da sacaca a 10% (HI).

NORADRENALINA					
Grupos	n	pD_2	FI	RM	Coeficiente de Hill
NA	9	7,22±0,04	271±10	202±11	0,86±0,07
NI	10	7,04±0,05 ^a	276±9	174±11	1,02±0,05
HA	10	6,24±0,21 ^a	274±8	163±12	0,95±0,08
HI	8	6,88±0,17	274±14	186±18	0,81±0,10

Dados são apresentados como média ± EPM, sendo n o número de animais utilizados. Estatisticamente diferente ($p < 0,05$) em: ^a comparados aos demais grupos (ANOVA seguida de teste de Tukey).

As curvas concentração-efeito ao soterenol são apresentadas na Figura 5. Em átrios de ratos normocolesterolêmicos, a resposta máxima ao soterenol foi igual a 64% da resposta máxima à isoprenalina (Tabela 8). As respostas máximas ao soterenol obtidas em átrios de ratos hipercolesterolêmicos não foram estatisticamente diferentes deste valor. O coeficiente de Hill calculado para estas curvas foi menor que a unidade, mas não diferiu entre os grupos (Tabela 6). Houve um deslocamento à direita de cerca de 3,5 vezes na curva concentração-efeito ao soterenol obtida em átrios de ratos hipercolesterolêmicos, em relação às curvas obtidas em átrios de ratos normocolesterolêmicos (Figura 5). Para este agonista, o deslocamento permaneceu mesmo após o tratamento dos animais com infuso de sacaca.

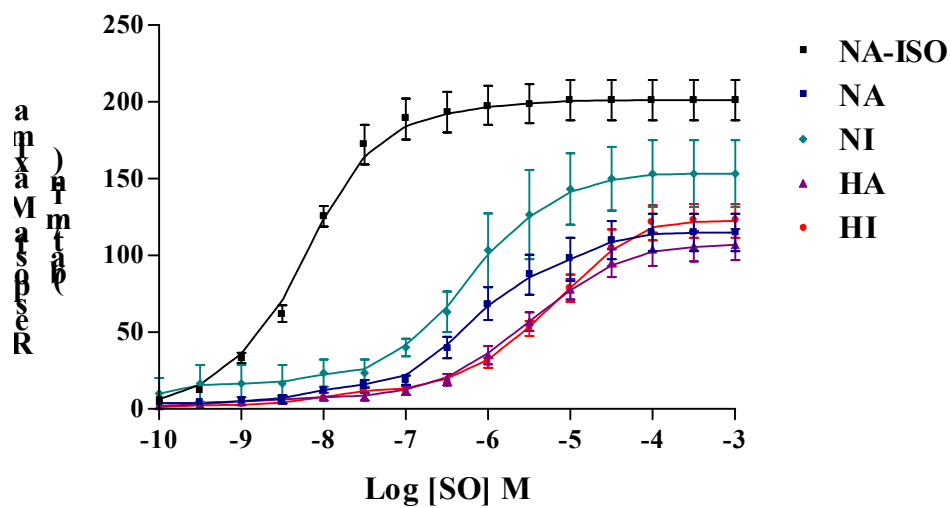


FIGURA 5 - Curvas concentração-efeito ao soterenol em átrios direitos isolados de ratos normocolesterolêmicos que beberam água (NA) ou infuso (NI); e de ratos hipercolesterolêmicos que beberam água (HA) ou infuso das cascas da sacaca a 10% (HI). Para comparação, foi acrescentada à figura a curva dose-resposta da isoprenalina do grupo normocolesterolêmico que bebeu água (ISO-NA). As diferenças estatísticas e os números de experimentos estão apresentados na Tabela 8.

TABELA 8 - Frequência de batimentos espontâneos (FI), sensibilidade (pD_2), resposta máxima (RM) e coeficiente de Hill das curvas concentração-efeito ao soterenol em átrios direitos de ratos normocolesterolêmicos que beberam água (NA) ou infuso (NI); e de ratos hipercolesterolêmicos que beberam água (HA) ou infuso das cascas da sacaca a 10% (HI).

SOTERENOL						
Grupos	n	pD_2	FI	RM	% ISO	Coeficiente de Hill
NA	3	$6,32 \pm 0,08$	290 ± 9	128 ± 12	64%	$0,71 \pm 0,07$
NI	3	$6,30 \pm 0,13$	286 ± 12	153 ± 22	78%	$0,65 \pm 0,29$
HA	10	$5,69 \pm 0,17^a$	269 ± 7	112 ± 12	62%	$0,86 \pm 0,09$
HI	8	$5,33 \pm 0,07^{a\ b}$	274 ± 7	123 ± 11	61%	$0,68 \pm 0,05$

Dados são apresentados como média $\pm$ EPM, sendo n o número de animais utilizados. Estatisticamente diferente ($p < 0,05$) em: ^a comparados aos demais grupos (ANOVA seguida de teste de Tukey). A coluna % ISO corresponde à porcentagem da resposta máxima do soterenol em relação à isoprenalina, com os respectivos grupos

Átrios direitos de ratos de cada grupo experimental foram tratados *in vitro* com fenoxibenzamina (10 μ M), para bloqueio dos receptores α -adrenérgicos (BESSE & FURCHGOTT, 1976) e muscarínicos (FURCHGOTT & BURSZTYN, 1967), bem como inibição do processo de recaptação neuronal (IVERSEN *et al.*, 1972; BRYAN *et al.*, 1981). Em seguida, curvas concentração-efeito à isoprenalina foram obtidas nestes tecidos, na presença de corticosterona (10 μ M), um inibidor do processo de captação extraneuronal (IVERSEN & SALT, 1970). Este tratamento não alterou a frequência de batimentos espontâneos nem a resposta máxima à isoprenalina.

Após este tratamento farmacológico *in vitro*, átrios direitos de ratos hipercolesterolêmicos (HA) permaneceram subsensíveis à isoprenalina, comparado aos ratos normocolesterolêmicos (NA). O tratamento dos animais normocolesterolêmicos com infuso de sacaca (NI) não alterou a sensibilidade do átrio direito à isoprenalina. Porém, átrios direitos de ratos hipercolesterolêmicos tratados com infuso de sacaca retornaram aos valores controles (Tabela 9), da mesma forma como foi observado nas curvas concentração-efeito para a isoprenalina sem o pré-tratamento (Tabela 6).

Os deslocamentos provocados nas curvas concentração-efeito da isoprenalina pelo CGP20712A, um antagonista seletivo de adrenoreceptores β_1 , foram paralelos e, em nenhum dos grupos experimentais foi observada diminuição da resposta máxima ao agonista, caracterizando assim um antagonismo do tipo competitivo. A partir dos deslocamentos horizontais observados nas curvas concentração-efeito, ao nível do valor pD_2 do agonista, foi calculado o valor pK_B do antagonista. Nossos resultados mostram que não houve diferenças significativas do valor pK_B do CGP20712A entre os grupos experimentais (Tabela 9).

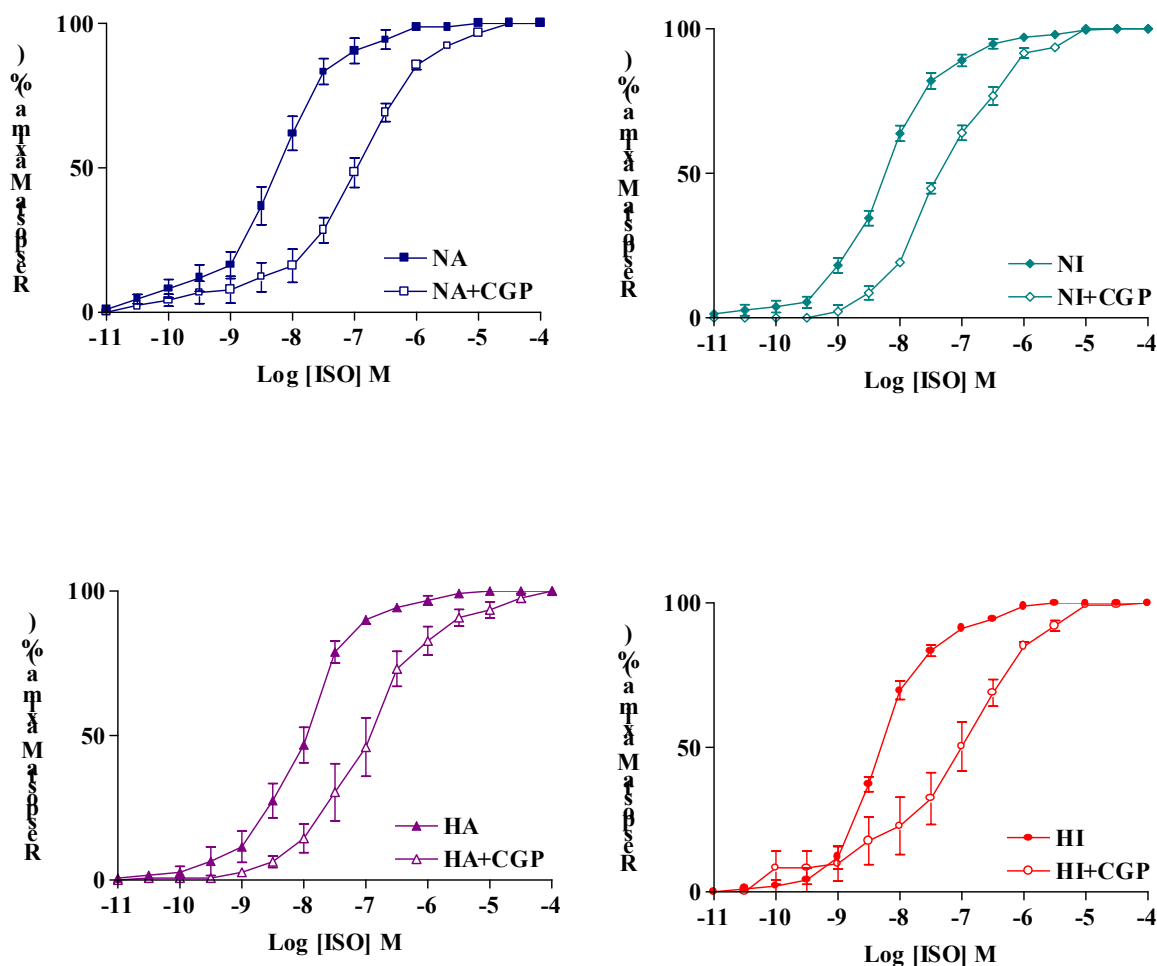


FIGURA 6 - Curvas concentração-efeito para o antagonismo do efeito cronotrópico da isoprenalina pelo CGP20712A (CGP) em átrios direitos isolados de ratos normocolesterolêmicos que beberam água (NA) ou infuso (NI); e de ratos hipercolesterolêmicos que beberam água (HA) ou infuso das cascas da sacaca a 10% (HI). As diferenças estatísticas e o número de experimentos estão apresentadas na Tabela 9.

TABELA 9 - Frequência de batimentos espontâneos (FI), sensibilidade (pD₂) e resposta máxima (RM) das curvas concentração-efeito à isoprenalina na presença e na ausência de 30 η M de CGP20712A e valores pK_B do CGP20712A em átrios direitos de ratos normocolesterolêmicos que beberam água (NA) ou infuso (NI); e de ratos hipercolesterolêmicos que beberam água (HA) ou infuso das cascas da sacaca a 10% (HI).

Grupo	[CGP20712A] ausente			[CGP20712A] 30 η M			DR	pK _B
	FI	RM	pD ₂	FI	RM	pD ₂		
NA (3)	296 $\pm$ 13	158 $\pm$ 14	8,56 $\pm$ 0,08	240 $\pm$ 14 ^a	198 $\pm$ 12	6,94 $\pm$ 0,06	45,60 $\pm$ 13,30	9,14 $\pm$ 0,12
NI (3)	276 $\pm$ 3	180 $\pm$ 15	8,46 $\pm$ 0,03	270 $\pm$ 11	156 $\pm$ 7	7,36 $\pm$ 0,06 ^b	12,80 $\pm$ 2,50	8,57 $\pm$ 0,08
HÁ (7)	267 $\pm$ 15	170 $\pm$ 16	8,03 $\pm$ 0,14 ^b	230 $\pm$ 15	192 $\pm$ 24	7,05 $\pm$ 0,20	17,80 $\pm$ 4,90 ^b	8,61 $\pm$ 0,17
HI (6)	293 $\pm$ 14	151 $\pm$ 7	8,30 $\pm$ 0,03	246 $\pm$ 12 ^a	175 $\pm$ 21	7,03 $\pm$ 0,20	25,10 $\pm$ 5,40	8,76 $\pm$ 0,21

Os tecidos foram previamente tratados com fenoxibenzamina (10 μ M) e corticosterona (10 μ M). Os dados são apresentados como médias $\pm$ EPM. Os números de animais utilizados são apresentados entre parênteses abaixo de cada grupo. Estatisticamente diferente (p<0,05) em: ^a comparado aos valores obtidos na ausência do antagonista; ^b comparado ao grupo NA (ANOVA seguida de teste de Tukey).

DISCUSSÃO

As médias dos pesos dos ratos no início do tratamento, quando os mesmos apresentavam 6 semanas de idade, não diferiram significativamente entre si. Partimos então da premissa que os efeitos observados ao final do experimento, quando os ratos apresentavam 12 semanas de idade, eram aqueles decorrentes dos tratamentos que cada grupo recebeu. Nossos resultados mostraram que todos os ratos ganharam peso de maneira significativa e sem diferenças entre os grupos, da sexta à décima semana de vida. Na décima segunda semana observou-se que os ratos normocolesterolêmicos que beberam água (NA) ganharam peso, enquanto o grupo de ratos normocolesterolêmicos que bebeu infuso de sacaca a 10% (NI) não apresentou ganho significativo de peso. O consumo médio diário de ração não foi diferente entre os grupos NA e NI, o que sugere que o infuso das cascas de sacaca exerceu alguma influência sobre o ganho de peso corporal dos ratos NI. GRASSI-KASSISSE (1997) já havia relatado que ratos ingerindo infuso de sacaca a 5% apresentaram ganho de peso corporal menor que aqueles que não ingeriram o infuso. A autora sugeriu que estes ratos poderiam apresentar alterações nos processos de absorção e/ou armazenamento do alimento ingerido ou, ainda, aumento da taxa metabólica, que causaria maior gasto energético. Por sua vez, FARIAS *et al.* (1996) utilizando extrato das folhas de *Croton cajucara* na dose de 200 mg/Kg, não observaram qualquer alteração no peso corporal de ratos machos alimentados com dieta hipercolesterolêmica.

Ratos alimentados durante quatro semanas com ração hipercolesterolêmica também ganharam peso durante este período, e nas duas semanas seguintes, independentemente de receberem o infuso de sacaca ou água para beber. Este ganho de peso não foi significativamente maior que aquele apresentado pelos ratos normocolesterolêmicos nos períodos correspondentes (10^a e 12^a semanas).

A leptina é um hormônio sintetizado em proporção à massa de gordura corporal, que atua no hipotálamo induzindo a saciedade e, desta forma, regulando a massa de tecido adiposo. Alguns autores sugeriram que a ingestão de dieta com alto teor de gordura, por curto período de tempo, estaria associada à diminuição da concentração plasmática de

leptina, o que acarretaria maior consumo de alimento e, conseqüentemente, aumento do peso corporal (AINSLIE *et al.*, 2000).

Nossos resultados mostraram que os ratos apresentaram consumo significativamente menor da ração contendo 15% de gordura do que aquela contendo 4%. Porém, o consumo calórico apresentado pelos ratos do grupo NA e HA (17; 140,2±6,8; 17; 114,1±5,1, respectivamente) não diferiu significativamente, o que pode Ter contribuído para um ganho de peso semelhante nos dois grupos. Por outro lado, a ingesta alimentar não foi alterada pela ingestão do infuso, ou seja, não diferiu entre os ratos normocolesterolêmicos (NA e NI) e nem entre os hipercolesterolêmicos (HA e HI). O mecanismo pelo qual o infuso de sacaca impediu o ganho de peso corporal dos ratos normocolesterolêmicos (NI) ainda é desconhecido. Este efeito não foi observado no grupo hipercolesterolêmico tratado com infuso de sacaca. Em nossos estudos não foi analisada a secreção ou a ação da leptina e, portanto, não é possível afirmar qual a participação deste hormônio em nossos resultados. O consumo hídrico não foi diferente entre os animais estudados.

Em um estudo para determinar a citotoxicidade dos compostos provenientes da sacaca em modelos de cultura celular utilizando fibroblastos isolados de pulmão e células hepáticas de hamster chinês, demonstrou-se que o infuso de cascas de sacaca e também a desidrocrotonina (DHC), uma substância química extraída da sacaca, apresentaram alto grau de toxicidade se colocados em contato direto com as células. O óleo essencial extraído da sacaca, por outro lado, não demonstrou hepatotoxicidade (BIGHETTI, 1999). Nossos resultados mostraram que a administração de infuso a 10% das cascas de sacaca, como substituto da água aos animais normocolesterolêmicos, não causou qualquer alteração macroscópica ou no peso do fígado. Lesões hepáticas, causadas por alcoolismo, ingestão de venenos ou de substâncias tóxicas, são acompanhadas, freqüentemente, por desenvolvimento de tecido fibroso na estrutura hepática, destruindo muitas das células parenquimatosas e, eventualmente concentrando-se em torno dos vasos sangüíneos, causando compressão destes vasos e impedindo, assim, o fluxo de sangue na circulação porta-hepática. Estas disfunções acarretam alteração na aparência do fígado, podendo ser observadas macroscopicamente, e se refletem no peso do órgão, que fica aumentado (GUYTON & HALL, 1996). Sendo assim, aparentemente, a administração deste infuso a 10% não foi tóxica ao fígado dos animais normocolesterolêmicos.

No entanto, entre os animais alimentados com a dieta hipercolesterolêmica, observamos aumento significativo no peso do fígado (hepatomegalia), bem como alteração macroscópica do órgão, que apresentou coloração esbranquiçada, indicativo de esteatose hepática, onde há excessiva deposição de lipídeos, triacilgliceróis e colesterol, nos hepatócitos (GUYTON & HALL, 1996). A administração de infuso de sacaca durante 15 dias não alterou este quadro.

Interessantemente, nos ratos normocolesterolêmicos e, portanto, com a função hepática normal, observamos que o tratamento com o infuso de sacaca promoveu menor ganho de peso enquanto que nos ratos hipercolesterolêmicos, que apresentaram fígado esteatoso, o tratamento com infuso de sacaca foi ineficaz. Esteatose hepática promove, além de mudanças macroscópicas, alterações em algumas funções hepáticas. Podemos, portanto, supor que o efeito que o infuso de sacaca sobre o ganho de peso poderia ser dependente de um tecido hepático íntegro.

A síntese de colesterol pelo fígado é bastante alta em ratos, quando comparada a outras espécies (DIETSCHY *et al.*, 1988). Macacos apresentam uma taxa cerca de 40% menor; coelhos, 20%; e humanos, cerca de 16%. Da mesma forma, a atividade da acil-CoA colesterol acil transferase (ACAT), enzima que limita a quantidade absorvida de colesterol, tende a ser mais alta em ratos do que em coelhos, humanos e *hamsters* (SUCKLING & STANGE, 1985). Assim sendo, a indução de hipercolesterolemia em ratos, por ingestão de dieta rica em lipídeos, é um processo bastante difícil e necessita de alguns cuidados importantes. Em nosso caso, para que a hipercolesterolemia se desenvolvesse por meio da dieta oferecida aos ratos, foi necessária a ingesta desta dieta a partir da 6ª semana de idade. Estudos pilotos demonstraram que animais que iniciaram a ingesta desta dieta com 8 ou 10 semanas de idade não desenvolveram hipercolesterolemia (dados não apresentados). Por sua vez, nossos resultados demonstram que a administração desta ração a partir da sexta semana de idade até a décima semana quase triplicou suas concentrações plasmáticas de colesterol total.

CARDONA-SANCLEMENTE *et al.* (1988) observaram que a adição de 0,5% de colesterol na dieta induzia, em 3 semanas, um aumento de 50 a 70% na concentração plasmática de colesterol em ratos. Por outro lado, SULTAN *et al.* (1990) observou que o

aumento da concentração plasmática de colesterol só foi significativo, em ratos, quando estes eram alimentados com uma dieta contendo 1% de colesterol, mas não 0,5%.

RUBATTU *et al.* (1993) trabalhando com um período idêntico ao utilizado em nosso experimento, ou seja, seis semanas de ingesta de ração hipercolesterolêmica, obteve concentração plasmática de colesterol igual a 220 ± 19 mg/dL em ratos geneticamente hipertensos (SHR). Entretanto, o valor obtido antes da administração desta dieta hipercolesterolêmica já se apresentava elevado (84 ± 2 mg/dL), comparado aos valores obtidos em nosso estudo (36 ± 3 mg/dL). Estes autores utilizaram uma ração diferente daquela que nós utilizamos, contendo 1% de colesterol, 0,5% de ácido fólico e conteúdo normal de vitaminas. Provavelmente, a diferença observada entre estes resultados e os nossos pode ser devido aos métodos utilizados na medição, visto que os aumentos na concentração sanguínea do colesterol foram proporcionais nos dois estudos.

Em nosso estudo, a concentração sanguínea de colesterol total de ratos alimentados com ração hipercolesterolêmica (HA e HI) apresentou grande variação individual, sugerindo que alguns animais eram mais resistentes ao efeito da ração, enquanto outros eram mais sensíveis a esta dieta. A ocorrência de dois subgrupos dentro dos grupos HA e HI foi confirmada pela análise da frequência de distribuição, determinada em intervalos de dez unidades, a partir do valor mínimo obtido, que revelou ser a distribuição bimodal. Determinamos também as medianas das concentrações plasmáticas de colesterol total, sendo que estas não diferiram estatisticamente das médias, o que nos autorizou a adotar as médias para as análises subsequentes (SNEDECOR & COCHRAN, 1989).

Considerando a distribuição bimodal, verificamos que cerca de 50% dos ratos tratados com ração hipercolesterolêmica apresentavam concentração sanguínea de colesterol em torno da moda superior e os restantes se distribuíram em torno da moda inferior. Esta observação permitiu a divisão dos ratos hipercolesterolêmicos em dois grupos que foram designados “sensíveis” ou “resistentes” aos efeitos da dieta.

Os resultados obtidos dos grupos HA e HI mostraram que o tratamento com infuso de sacaca não promoveu qualquer alteração nas concentrações plasmáticas de colesterol total.

A diminuição nos níveis plasmáticos de colesterol total em ratos tratados com infuso das cascas de sacaca ou com extrato hidro-alcoólico das folhas desta planta foi relatada

anteriormente (OLIVEIRA *et al.*, 1995; FARIAS *et al.*, 1996 a,b). FARIAS *et al.* (1996) demonstraram que o tratamento, de ratos hipercolesterolêmicos durante 10 semanas com extrato de *Croton cajucara*, na dose de 200 mg/Kg, mas não 100 mg/Kg, reduziu significativamente as concentrações séricas de colesterol total e de LDL-colesterol sem, contudo, alterar a concentração de triacilgliceróis e de HDL-colesterol. Este efeito resultou em elevação da razão HDL/colesterol total e em queda do índice aterogênico.

Nossos dados mostraram que os ratos hipercolesterolêmicos tratados com infuso de cascas de sacaca não apresentaram redução nos níveis plasmáticos de colesterol total. No entanto, observamos redução significativa na concentração sangüínea de colesterol total de ratos normocolesterolêmicos que receberam infuso de sacaca a 10% (NI) por 15 dias, quando comparados aos ratos normocolesterolêmicos que beberam água. Em nossos experimentos não houve controle rigoroso da dose de extrato ingerido pelos ratos, uma vez que optamos por um método de tratamento que privilegiasse a forma como este é utilizado popularmente. Assim sendo, estas diferenças poderiam justificar as diferenças nos resultados por nós obtidos e aqueles relatados pelos autores supracitados.

É importante salientar que os ratos hipercolesterolêmicos mantiveram a dieta rica em gordura durante o tratamento com infuso de sacaca o que, comparando com a prática, constituiria um método terapêutico medicamentoso não associado à mudança de hábito alimentar, o que constitui uma das medidas terapêuticas mais importantes no tratamento da hipercolesterolemia. Podemos especular, com base neste fato, que o tratamento crônico com infuso de sacaca, aliado a uma dieta equilibrada, poderia causar diminuição nas concentrações plasmáticas do colesterol total. Porém, esta hipótese não foi testada.

A concentração sangüínea de HDL não sofreu alteração significativa ao longo do período experimental, nem decorrente da ração fornecida aos animais, nem da administração do infuso de sacaca. Por outro lado, a concentração sangüínea de VLDL apresentou elevação decorrente da ingesta da ração hipercolesterolêmica, sem sofrer modificações em resposta ao tratamento com infuso de sacaca. Também a fração LDL apresentou elevação decorrente da ingesta da ração hipercolesterolêmica, a qual foi maior nos grupos “sensíveis” (HA-s e HI-s). O tratamento dos ratos com infuso de sacaca não alterou a concentração sangüínea de LDL quando comparados os grupos “resistentes” ao efeito da ração hipercolesterolêmica (HA-r e HI-r). Porém, quando comparados os grupos

“sensíveis” (grupos HA-s e HI-s), aquele que bebeu o infuso de sacaca apresentou uma redução significativa de sua concentração sangüínea, embora não a tenha normalizado. Estudos anteriores demonstraram que uma importante parcela (30 a 60%) do colesterol é secretado pelo fígado na forma de LDL (CARDONA-SANCLEMENTE *et al.*, 1988). O infuso de sacaca reduziu parcialmente as concentrações desta fração, considerada mais prejudicial, porém manteve inalterada a concentração sangüínea de colesterol total nos ratos hipercolesterolêmicos, provavelmente devido ao aumento, não significativo, na concentração sangüínea de HDL (HA-s vs HI-s). É importante ressaltar que esta redução na fração LDL do colesterol acompanhada de uma elevação da fração HDL pode ser de grande importância fisiológica. Isto é ainda corroborado pelo cálculo do índice aterogênico, significativamente menor nos animais hipercolesterolêmicos tratados com o infuso de sacaca

Taxas aumentadas de IDL e LDL estão associadas com riscos de doenças arteriais coronarianas pois, favorecem sua retenção na parede vascular e se tornam mais susceptíveis à oxidação (KRAUSS, 1994; AUSTIN & EDWARDS, 1996). Além disso, principalmente a fração LDL está diretamente relacionada com os fatores de risco que caracterizam a resistência à insulina (AUSTIN & EDWARDS, 1996). Além do aumento da resistência à insulina e outros distúrbios metabólicos já citados, os quais são acarretados pela dieta hiperlipidêmica, a dislipidemia pode também acarretar elevadas concentrações de triacilgliceróis, diminuição da fração HDL de colesterol, predominância da fração LDL e de suas precursoras (IDL e VLDL, principalmente), além de hiperlipidemia pós-prandial (TASKINEN, 1995).

Não observamos alteração nas concentrações plasmáticas de triacilglicerol em ratos normocolesterolêmicos, tratados ou não com infuso a 10% das cascas de sacaca durante 15 dias. Os ratos hipercolesterolêmicos apresentaram aumento da concentração sangüínea de triacilglicerol após a ingesta de ração com 15% de lipídeos, porém não se tornou estatisticamente significativo. O tratamento com infuso das cascas de sacaca a 10% não alterou este quadro. Provavelmente, este aumento na concentração de triacilglicerol está intimamente ligado ao aumento nas concentrações de VLDL e LDL, pois este representa o precursor natural de suas sínteses no fígado. Como já foi citado, uma dieta rica em gordura pode acarretar elevados índices plasmáticos de triacilgliceróis, além de outros distúrbios

metabólicos (TASKINEN, 1995). Concentrações plasmáticas de triacilgliceróis acima de 1,5 mmol/L já são considerados preocupantes do ponto de vista clínico (TASKINEN, 1995).

WANNAMETHEE & SHAPER (1994) observaram que os níveis de triacilgliceróis são positivamente correlacionados ao colesterol sangüíneo e inversamente correlacionados com a concentração sangüínea de HDL, e que a frequência cardíaca parece ser positivamente mas independentemente correlacionada com a concentração sangüínea de triacilgliceróis, embora nenhuma relação causal tenha sido estabelecida entre estes parâmetros. Estes autores também sugeriram que a associação entre lipídeos sangüíneos e frequência cardíaca pode estar sob a influência do sistema nervoso autonômico, pois aumento da atividade simpática, o qual eleva a frequência cardíaca, exerce também enorme influência no metabolismo lipídico sangüíneo. As catecolaminas inativam a lipoproteína lipase *in vitro*, e redução da atividade da lipoproteína lipase poderia levar à redução da taxa de remoção de triacilgliceróis, elevando sua concentração plasmática e, subsequente, aumentando os níveis de VLDL e LDL, com redução dos níveis de HDL (BØNAA & ARNESEN, 1992; DANEV *et al.*, 1997).

Nossos resultados mostraram que, em átrios direitos de ratos hipercolesterolêmicos, houve diminuição na sensibilidade da resposta ao isoproterenol, agonista não-seletivo de β_1 -AR e β_2 -AR, à noradrenalina, agonista seletivo β_1 -AR, e ao agonista parcial soterenol.

Subsensibilidade ao efeito de agonistas pode ser causada por aumento da atividade dos sistemas de metabolização das catecolaminas, diminuição do número de β -AR, decorrentes da contínua presença de catecolaminas na fenda sináptica, ou da oxidação destas aminas (GANGULY, 1991; CASTELLANO & BÖHM, 1997; ZANESCO *et al.*, 1997; COMMUNAL *et al.*, 1998), diminuição da afinidade entre o agonista e o receptor, causada por alteração na estrutura do receptor (COLLINS *et al.*, 1990; HEIN & KOBILKA, 1995; GUDBJARNASON & BENEDIKTSDÓTTIR, 1995), ou ainda por alterações do ambiente lipídico da membrana (BRODERICK *et al.*, 1989; HAENEN *et al.*, 1990; GUDBJARNASON & BENEDIKTSDÓTTIR, 1996; BREHM *et al.*, 1998), e/ou por alteração das vias intracelulares de sinalização que conduzem ao efeito (LURIE *et al.*, 1985; GUDBJARNASON & BENEDIKTSDÓTTIR, 1995).

LEWIS *et al.* (1982) estudando tecido cardíaco de coelhos hipercolesterolêmicos e LURIE *et al.* (1985) estudando hemáceas de codornas alimentadas com dieta hipercolesterolêmica, demonstraram uma perda da sensibilidade para a estimulação β adrenérgica sem, contudo, haver alteração no número de receptores. Além disso, MOKLER *et al.* (1985) já haviam demonstrado que a interação do β_1 -AR cardíaco com o agonista isoproterenol e com o antagonista metoprolol não havia sido alterada em coelhos alimentados com dieta rica em colesterol.

Utilizando uma dieta à base de óleo de peixe, rico em ácido eicosapentaenóico (EPA), PATTEN *et al.* (1989) mostraram que esta dieta era rapidamente incorporada nas membranas cardíacas de macacos e alterava significativamente as propriedades de *binding* dos β -AR. Estes autores sugeriram que as mudanças na afinidade dos β -AR poderiam ser consequência de alterações na composição de ácidos graxos dos fosfolípides da membrana ao invés de mudanças no *status* de colesterol da membrana.

Em nossos experimentos, subsensibilidade aos agonistas de β -AR não foi acompanhada de alteração na resposta máxima ao soterenol, o que permite concluir que não houve *downregulation* dos adrenoceptores em átrio direito de ratos hipercolesterolêmicos, uma vez que sendo agonista parcial, o soterenol necessita ocupar todos os receptores para desencadear a resposta máxima e que, portanto, alteração do número de receptores presentes levaria a alteração de sua resposta máxima. Além disso, como para o soterenol não há receptores de reserva, a potência pode ser indicativa da afinidade. Portanto, como nós observamos diminuição da potência do soterenol, nossos dados poderiam indicar diminuição da afinidade entre a população de adrenoceptores e o agonista parcial. Houve, portanto, diminuição na sensibilidade entre a população de β -AR de átrios direitos de ratos hipercolesterolêmicos para o agonista parcial soterenol, o que sugere que o mecanismo responsável por esta subsensibilidade é semelhante àquele proposto por LEWIS *et al.* (1982) e por LURIE *et al.* (1985), que observaram diminuição de sensibilidade sem alteração no número de receptores.

A possibilidade de que os sistemas de recaptação poderiam ter sido afetados pelo colesterol proveniente da dieta e que, através do infuso da sacaca poderiam ter sido restaurados, encontra embasamento na literatura. Vários autores já sugeriram que pode haver inibição da recaptação extraneuronal da noradrenalina por certos esteróis, incluindo o

colesterol (IVERSEN & SALT, 1970; BLOOM, 1975; RIBEIRO *et al.*, 1998). EILDEMAN *et al.* (1978) observaram *in vitro* que o extrato de β lipoproteína potencializava os efeitos da noradrenalina nos vasos cerebrais por reduzir a atividade da enzima monoamino oxidase (MAO). Tais efeitos também são relatados em músculo cardíaco e, como consequência, tenderiam a potencializar os efeitos do neurotransmissor por sua exposição mais prolongada na fenda sináptica (BLOOM *et al.*, 1975). Entretanto, nossos resultados demonstraram que a inibição da recaptação neuronal e extraneuronal não alterou a subsensibilidade relacionada à dieta hipercolesterolêmica observada entre os grupos.

Considerando que os resultados com agonista parcial sugerem que não houve alteração do número de receptores e que os processos de metabolização dos agonistas também não estão alterados em nosso modelo experimental, a subsensibilidade do átrio direito de ratos hipercolesterolêmicos aos efeitos cronotrópicos positivos do isoproterenol, noradrenalina e soterenol poderia ser atribuída à diminuição da afinidade entre os agonistas e a população de receptores e/ou a alteração dos mecanismos intracelulares de transdução do sinal (KENAKIN, 1993).

O uso de antagonistas poderia, neste caso, nos auxiliar, uma vez que os antagonistas não possuem efeitos e, portanto, o pK_B de um antagonista reflete a constante de dissociação entre o antagonista e o receptor a qual, neste caso, não é afetada pelos eventos intracelulares de transdução do sinal, uma vez que estes não são acionados quando da interação do antagonista com o receptor (KENAKIN, 1993).

O composto CGP20712A, possui afinidade para β_1 -AR ($pK_B=9,6$) cerca de cem vezes maior que sua afinidade para β_2 -AR ($pK_B=5,4$), podendo ser usado para bloqueio específico das respostas mediadas por β_1 -AR (LEMOINE & KAUMANN, 1991). Sendo um antagonista competitivo, não tem efeito e, assim sendo, mudanças na afinidade entre este composto e a população de adrenoreceptores de qualquer tecido, são indicativas de alterações na estrutura dos receptores (KENAKIN, 1993).

Nossos resultados mostraram que não houve alterações da constante de dissociação (pK_B) do CGP20712A em átrios direitos de ratos hipercolesterolêmicos tratados ou não com infuso de sacaca, indicando que a estrutura tridimensional do receptor não foi alterada de modo a modificar a afinidade deste antagonista.

A inativação de proteínas de membrana, tanto diretamente, por meio de ataque destas proteínas por radicais livres, como indiretamente, por meio de perturbação da membrana lipídica, é uma das possíveis rotas pela qual o estresse oxidativo inativa as funções celulares (HAENEN *et al.*, 1990; PETERS *et al.*, 1997). BREHM *et al.* (1998) propuseram que existiria um complexo *cross-talk* entre receptores β adrenérgicos e receptores de LDL, visto que aumento nos níveis de AMPc resulta em elevada expressão de receptores de LDL. Estes autores demonstraram que níveis moderadamente elevados de LDL resultaram em diminuição na densidade de β -AR acoplados funcionalmente sem, contudo, haver alterações da relação β_1 -/ β_2 -AR em artérias coronárias. HAENEN *et al.* (1990) observaram que em membranas cardíacas isoladas, a função dos β -AR era reduzida por estresse oxidativo, sugerindo que, neste estado, a adenilil ciclase não estaria inativa mas, mais provavelmente, o acoplamento entre a enzima e o receptor estaria enfraquecida, pois estes autores observaram que havia um aumento no número de β -AR enquanto a formação de AMPc estava reduzida, em membranas de ventrículos. Em átrio esquerdo e fatias de ventrículo direito a eficácia de agonistas β -AR foi reduzida em 30%, enquanto a resposta máxima mediada por β -AR foi reduzida para 50%. Membranas de átrio esquerdo expostas a estresse oxidativo não apresentaram alteração na densidade de β -AR, nem na afinidade ao isoproterenol. Aparentemente, o efeito que o estresse oxidativo tem sobre a fluidez da membrana, via indução de peroxidação de lipídeos, pode explicar a redução na formação de AMPc pelo estresse oxidativo em átrio esquerdo. Contudo, não se pode excluir que os radicais livres produzidos durante o estresse oxidativo inibam diretamente a formação de AMPc, por exemplo, por inativar a proteína G. PETERS *et al.* (1997) sugerem ainda que é provável que ocorram injúrias de outros componentes subcelulares que podem ter importante papel na transdução dos estímulos β -adrenérgicos, desta forma abrandando sua resposta.

A administração do infuso de sacaca a 10% reverteu a subsensibilidade observada para a isoprenalina e para a noradrenalina sem, porém, deslocar a curva concentração-efeito ao soterenol. Dados prévios em nosso laboratório demonstraram um deslocamento para a esquerda da curva dose-resposta à isoprenalina em átrio direito isolado de ratos que receberam o infuso de sacaca 5%. Entretanto, observou-se também um aumento da resposta máxima, fato não verificado neste estudo. Assim, como o infuso de sacaca é composto de

outras substâncias, uma delas ou mesmo o conjunto destas substâncias poderiam apresentar uma atividade *scavenger* e, se oxidação das lipoproteínas na membrana celular alterando a funcionalidade do receptor, ou de outras proteínas acopladas à membrana, uma possível atividade *scavenger* do infuso poderia explicar a recuperação da sensibilidade dos β -AR de átrios direitos de animais hipercolesterolêmicos tratados com sacaca, visto que nenhuma alteração foi observada em animais normocolesterolêmicos. Entretanto nós não avaliamos se o infuso apresenta ou não esta propriedade.

Também alterações na composição de ácidos graxos da bicamada lipídica da membrana do músculo cardíaco, induzidas por dietas gordurosas (CRANDALL *et al.*, 1983; PATTEN *et al.*, 1989), associada a alterações na concentração plasmática de lipídeos e de catecolaminas pode ter importantes implicações na função dos β -AR (HAENEN *et al.*, 1990; GANGULY, 1991; GUDBJARNASON & BENEDIKTSDÓTTIR 1996). Logo, a interação de um agonista ou antagonista com um receptor não dependeria apenas das propriedades estruturais destes compostos ou dos próprios receptores, mas poderia ser também influenciada pelo ambiente lipídico da membrana (GUDBJARNASON & BENEDIKTSDÓTTIR, 1996). De acordo com esta hipótese, os lipídeos que circundam as moléculas do receptor poderiam modular sua atividade ao interferirem em sua estrutura tridimensional e, conseqüentemente, modificar a afinidade aos ligantes. Além disso, o estado físico do domínio lipídico onde se insere o receptor poderia regular sua mobilidade lateral na membrana, e a interação do complexo ligante-receptor com a molécula transdutora da proteína G a qual, por sua vez, modificaria a atividade das moléculas efetoras que geram sinais intracelulares (LURIE *et al.*, 1985; GUDBJARNASON & BENEDIKTSDÓTTIR, 1995).

Colesterol é um importante componente lipídico de membranas plasmáticas de células de mamíferos (BRODERICK *et al.*, 1989), e em músculo cardíaco, os efeitos de um estado hipercolesterolêmico não estão bem definidos, mas é crescente o interesse no papel desempenhado pelos ácidos graxos insaturados e pelo colesterol na função da membrana celular de cardiomiócitos, no que se refere ao desenvolvimento de fibrilação ventricular e morte cardíaca súbita. A ingesta de gorduras polinsaturadas altera a composição de ácidos graxos e aumenta a fluidez da membrana celular (LURIE *et al.*, 1985; MARINETTI, 1990). Por sua vez, uma elevada ingesta de gorduras saturadas pode ter efeito contrário. Aumento

da fluidez da bicamada lipídica da membrana de hepatócitos e de eritrócitos aumenta a atividade estimulada da adenilil ciclase, e a síntese de AMPc, provavelmente por favorecer a estimulação do complexo β -AR-proteína G-subunidades catalíticas da adenilil ciclase. Por outro lado, enriquecimento da bicamada lipídica da membrana celular, como foi observado em eritrócitos de codornas alimentadas com dieta rica em colesterol, causa efeitos opostos, tais como a perda de até 50% da sensibilidade à estimulação adrenérgica, avaliada por meio da quantidade de AMPc formado em resposta à estimulação por isoproterenol, porém não observaram nenhuma alteração da afinidade a agonistas beta adrenérgicos (LURIE *et al.*, 1985). Mudanças significativas nos fosfolípídeos de membrana podem facilitar a internalização de receptores com subsequente seqüestro ou *downregulation*. Mudanças reversíveis nos lipídeos da membrana podem também servir para regular as propriedades de *binding* dos receptores de membrana, sua afinidade ou o número de sítios de *binding* (GUDBJARNASON & BENEDIKTSDÓTTIR, 1995).

Assim, com base nestes resultados, novas questões surgem: qual relação há entre uma dieta hipercolesterolêmica e o sistema nervoso simpático? Qual a relação entre a sacaca e o colesterol? Serão seus efeitos relacionados à sua ingesta e/ou metabolismo? Terá a sacaca algum efeito sobre o sistema nervoso central? Ou, ainda, serão seus efeitos atuantes na membrana plasmática? Poderia ter o infuso da sacaca algum efeito antioxidante?

Novos estudos são necessários e as respostas a estas perguntas podem auxiliar no esclarecimento de muitas patologias onde está envolvida hipercolesterolemia.

CONCLUSÃO

O protocolo estabelecido para indução de hipercolesterolemia em ratos, por meio de dieta administrada durante 6 semanas contendo 15% de gordura, 1,25% de colesterol e 0,5% de ácido cólico, foi eficaz. Porém, os ratos apresentaram diferentes susceptibilidades a este processo, o que permitiu a divisão em dois grupos: sensíveis e resistentes, embora ambos apresentassem aumento significativo das concentrações sanguíneas de colesterol total e de suas frações;

A ingesta de infuso de sacaca a 10% durante 15 dias não reverteu as elevadas concentrações plasmáticas de colesterol total de ratos hipercolesterolêmicos aos valores controles,

A fração HDL do colesterol não apresentou alterações, seja pela dieta, seja pelo tratamento com o infuso de sacaca; a fração LDL aumentou acentuadamente, o que sugere que o aumento do colesterol total foi devido principalmente ao aumento desta fração. A dieta hipercolesterolêmica administrada aos ratos promoveu aumento nas concentrações de triacilglicerol, não significativo, e da fração VLDL do colesterol, intimamente ligados à síntese da fração LDL do colesterol;

O infuso de sacaca reduziu a fração LDL do colesterol sem, contudo, alcançar os valores obtidos em ratos controles;

Átrios direitos de ratos que ingeriram a ração hipercolesterolêmica apresentaram diminuição na sensibilidade aos efeitos cronotrópicos do isoproterenol, noradrenalina e soterenol;

O infuso de sacaca a 10% reverteu a subsensibilidade para a isoprenalina e noradrenalina aos valores controles. No entanto, não se observou o mesmo efeito para o soterenol;

Não houve diferença nas respostas máximas do soterenol, o que sugere que não houve alterações do número de adrenoceptores estimulados por este agonista. Também não se observaram alterações no pK_B do CGP20712A, indicando que não houve mudanças na afinidade do antagonista para o β_1 -AR e, conseqüentemente, alterações na estrutura do receptor promovidas pela dieta ou pelo tratamento com infuso de sacaca.

A subsensibilidade aos agonistas de β -AR observada em átrios direitos de ratos hipercolesterolêmicos poderia ser decorrente de alterações nos mecanismos intracelulares de transdução do sinal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLQUIST, R.P. A study of adrenotropic receptors. **Am. J. Physiol.**, v.153, p.586-600, 1948.
- AINSLIE, D.A.; PROIETTO, J.; FAM, B.C.; THORBUN, A.W. Short-term, high-fat diets lower circulating leptin concentrations in rats. **Am.J.Clin.Nutr.**, v.71, p.438-42, 2000.
- ARUNLAKSHANA, O. & SCHILD, H.O. Some quantitative uses of drug antagonists. **Brit. J. Pharmacol.**, v.14, p.48-58, 1959.
- AUSTIN, M.A. & EDWARDS, K.L. Small, dense low density lipoproteins, the insulin resistance syndrome and noninsulin dependent diabetes. **Current Opinion in lipidology**, v.7, p.167-171, 1996.
- BASSANI, R.A.; De MORAES, S. Effects of repeated footshock stress on the chronotropic responsiveness of the isolated pacemaker of the rat: role of beta-2 adrenoceptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.246, p.316-321, 1988.
- BESSE, J.C. & FURCHGOTT, R.F. Dissociation constants and relative efficacies of agonists acting on alpha adrenergic receptors in rabbit aorta. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.197, n.1, p.66-78, 1976.
- BIGHETTI, E.J.B. **Efeitos de substâncias obtidas das cascas de *Croton cajucara* Benth. Sobre o processo inflamatório e o agente etiológico da malária.** Campinas-UNICAMP, 94 p. 1999. Dissertação de Tese (Mestrado em Fisiologia). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

- BLOOM, D.; McCALDEN, T.A. & ROSENDORFF, C. The effects of hypercholesterolaemic plasma on vascular sensitivity to noradrenaline. **Br. J. Pharmac.**, v.54, p.421-427, 1975.
- BØNAA, K.H. and ARNESEN, E. Association between heart rate and atherogenic blood lipid fractions in a population (The Tromsø Study). **Circulation**, v.86, p.394-405, 1992.
- BONISCH, H. & TRENDELENBURG, U. Extraneuronal removal, accumulation and O-methylation of isoprenaline in the perfused heart. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v.283, p.191-218, 1974.
- BREHM, B.R.; MEERGANS, M.; AXEL, D.I.; HEINLE, H. and KARSCH, K.R. Downregulation of β -adrenergic receptors by low-density lipoproteins and its prevention by β -adrenergic receptor antagonists. **Cardiovascular Research**, v.38, n.2, p.522-530, 1998.
- BRODERICK, R. & TULENKO, T. Mechanism of cholesterol-induced arterial supersensitivity. **Fed. Proc.**, 43:350, 1984.
- BRODERICK, R.; BIALECKI, R. & TULENKO, T.N. Cholesterol-induced changes in rabbit arterial smooth muscle sensitivity to adrenergic stimulation. **Am. J. Physiol.** 257 (Heart Circ. Physiol. 26): H170-H178, 1989.
- BRUMMELEN, P.VAN. The relevance of intrinsic sympathomimetic activity for β -blocker-induced changes in plasma lipids. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 5:S51-S55, 1983.
- BRYAN, L.J. A study designed to explore the hypothesis that beta-1 adrenoceptor are "innervated" receptors and beta-2 adrenoceptors are "hormonal" receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.216, n.2, p.395-400, 1981.

- BUCKNER, C.K.; TORPHY, T. and COSTA, D.J. Studies on β -adrenoceptors mediating changes in mechanical events and adenosine 3', 5'-monophosphate levels. Rat atria. **European Journal of Pharmacology**, v.47, p.259-271, 1978.
- BÜNEMANN, M.; LEE, K.B.; PALS-RYLAARSDAM, R.; ROSEBERRY, A.G.; HOSEY, M.M. Desensitization of G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system. **Annu. Rev. Physiol.**, v.61, p.169-92, 1999.
- CARDONA-SANCLEMENTE, L.E.; FEREZOU, J. & LUTTON, C. Cholesterol metabolism in the genetically hypercholesterolemic (RICO) rat. A study of plasma lipoproteins and effect of dietary cholesterol. **Biochimica et Biophysica Acta**, Ed. Elsevier, v.960, p.382-389, 1988.
- CARLSSON, E.; DAHLÖF, C.G.; HEDBERG, A.; PERSSON, H. and TANGSTRAND, B. Differentiation of cardiac chronotropic and inotropic effects of β -adrenoceptor agonists. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v.300, p.101-105, 1977.
- CARVAJAL, J.A.R. **Desidrocrotonina: atividade antiulcerogênica, toxicidade e metabolização *in vivo* e *in vitro***. Campinas-UNICAMP, 138 p. 1998. Dissertação de Tese (Doutorado em Bioquímica). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- CARVALHO, J.C.T.; SILVA, M.F.C.; MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; NUNES, D.S.; LIMA, R.M.; BASTOS, J.K. and SARTI, S.J. Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *trans*-dehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. Part I. **Planta Medica**, v.62, p.402-404, 1996.
- CASTELLANO, M. & BÖHM, M. The cardiac β -adrenoceptor-mediated signaling pathway and its alterations in hypertensive heart disease. **Hypertension**, v.29, p.715-722, 1997.

- COLLINS, S.; BOUVIER, M.; LOHSE, M.J.; BENOVIC, J.L.; CARON, M.G. and LEFKOWITZ, R.J. Mechanisms involved in adrenergic receptor desensitization. **Biochem. Soc. Trans.**, v.18, p.541-544, 1990.
- COMMUNAL, C.; RIBOUT, C.; DURAND, A. and DEMENGE, P. Myocardial β -adrenergic reactivity in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in the rat. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v.12, p.590-8, 1998.
- CRANDALL, D.L.; LAI, F.M.; HUGGINS, F.J.; TANIKELLA, T.K. and CERVONI, P. Effects of caloric restriction on cardiac reactivity and β -adrenoceptor concentration. **Am. J. Physiol.**, 244 (Heart Circ. Physiol. 13): H444-H448, 1983.
- DAAKA, Y.; LUTTRELL, L.M. & LEFKOWITZ, R.J. Switching of the coupling of the β_2 -adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. **Nature**, v.390, p.88-91, 1997
- DANEV, S.; NIKOLOVA, R.; KEREKOVSKA, M.; SVETOSLAVOV, S. Relationship between heart rate variability and hypercholesterolaemia. **Cent. Eur. Publ. Hlth**, v.5, n.3, p.143-146, 1997.
- DESPRÉS, J.P.; MARETTE, A. Relation of components of insulin resistance syndrome to coronary disease risk. **Current Opinion in Lipidology**, v.5, p.274-289, 1994.
- DIETSCHY, J.M.; SPADY, D.K. & MADDINGS, J.B. In: **Hyperlipidaemia and Atherosclerosis**, p.17-32, Suckling K. E. & Groot, P.H.E. London: Academic Press, 1988.
- DI STASI, L.C.; SANTOS, E.M.G.; SANTOS, C.M. & HIRUMA, C.A. In: **Plantas medicinais da Amazônia**, São Paulo: ed. UNESP, 1989. 194 p.

- DURRINGTON, P.N. Triglycerides are more important in atherosclerosis than epidemiology has suggested. **Atherosclerosis**, v.141 (suppl 1), p.S57-62, 1998.
- EILDEMAN, B.H.; MENDELOW, A.D.; McCALDEN, T.A. and BLOOM, D.S. Potentiation of the cerebrovascular response to intraarterial 5-hydroxytryptamine. **Am. J. Physiol.**, vol. 234 (Heart Circ. Physiol. 3), p.H300-304, 1978.
- FARIAS, R.A.F.; NETO, M.F.O.; VIANA, G.S.B.; RAO, V.S.N. & SILVEIRA, E.R., Efeito da *Croton cajucara* Benth nos lipídios séricos em ratos com dieta rica em colesterol, **XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Florianópolis-SC, Livro de resumos, 1996. p.132.
- FARIAS, R.A.F.; NETO, M.F.O.; VIANA, G.S.B.; RAO, V.S.N. Effects of *Croton cajucara* extract on serum lipids of rats fed a high fat diet. **Phytotherapy Res.**, v.10, p.697-699, 1996.
- FARIAS, R.A.F.; RAO, V.S.N.; VIANA, G.S.B.; SILVEIRA, E.R.; MACIEL, M.A.M. and PINTO, A.C. Hypoglycemic effect of *trans*-dehydrocrotonin, a nor-clerodane, diterpene from *Croton cajucara*. **Planta Medica**, v.63, p.558-560, 1997.
- FIELD, C.J.; RYAN, E.A.; THOMSON, A.B.R. and CLANDININ, M.T. Diet fat composition alters membrane phospholipid composition, insulin binding, and glucose metabolism in adipocytes from control and diabetic animals. **J. Biol. Chem.**, v.265, n.19, p.11143-11150, 1990.
- FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I. & FREDRICKSON, D.S. **Clin. Chem.**, v.18, p.499-509, 1972.
- FURCHGOTT, R.F. & BURSZTYN, P. Comparison of dissociation constants and relative efficacies of selected agonists acting on parasympathetic receptors. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.144, p.882-891, 1967.

- GANGULY, P.K. Impaired inotropic response to adrenergic stimulation following aortic constriction: role of oxidation product of catecholamines. **Angiology-The Journal of Vascular Disease. Adrenergic Receptors in Cardiac Hypertrophy**, v.42, n.2, p.133-139, 1991.
- GRASSI-KASSISSE, D.M. Efeitos da desidrocrotonina e da infusão das cascas de *Croton cajucara* Benth sobre o metabolismo de lipídeos e de colesterol. **Relatório Fapesp**, 1997. 66 p.
- GREENSPAN, F.S. and BAXTER, J.D. **Basic and clinical endocrinology**. Connecticut: Appleton & Lange, 4th ed., 1994. 811 p.
- GRUNDY, S.M. & BEARN, A.G. **The role of cholesterol in atherosclerosis: new therapeutic opportunities**. Philadelphia: Hanley & Belfus, 1988. 261 p.
- GUDBJARNASON, S. and BENEDIKTSDÓTTIR, V.E. Co-regulation of adrenoceptors and the lipid environment in heart muscle during repeated adrenergic stimulation. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v.27, p.243-251, 1995.
- GUDBJARNASON, S. and BENEDIKTSDÓTTIR, V.E. Regulation of β adrenoceptor properties and the lipid milieu in heart muscle membranes during stress. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.163/164, p.137-143, 1996.
- GUYTON, A.C. & Hall, J.E. The liver as an organ. In: **Textbook of Medical Physiology**. Philadelphia: W.B Saunders Company, 9th ed., 1996. 1148 p., p.883-888.
- HAENEN, G.R.M.M.; VEERMAN, M. and BAST, A. Reduction of β -adrenoceptor function by oxidative stress in the heart. **Free Radical Biology & Medicine**, v.9, p.279-288, 1990.

HEIN, L. and KOBILKA, B.K. Adrenergic receptor signal transductional and regulation. **Neuropharmacology**, v.34, n.4, p.357-366, 1995.

HIRUMA-LIMA, C.A. **Atividade antiulcerogênica da desidrocrotonina e do óleo essencial obtidos a partir das cascas de *Croton cajucara* Benth., uma planta da família Euphorbiaceae.** Campinas-UNICAMP, 1999. 120 p. Dissertação de Tese (Doutorado em Fisiologia). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

HOLVOET, P.; THEILMEIER, G.; SHIVALKAR, B.; FLAMENG, W. and COLLEN, D. LDL hypercholesterolemia is associated with accumulation of oxidized LDL, atherosclerotic plaque growth, and compensatory vessel enlargement in coronary arteries of miniature pigs. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.18, p.415-422, 1998.

HOWARD, B.V.; HANNAH, J.S. Dietary fat intake and diabetes. **Current Opinion in Endocrinology & Diabetes**. v.2, p.530-537, 1995.

IKEDA, K.; NARA, Y.; TAGAMI, M. and YAMORI, Y. Nitric oxide deficiency induces myocardial infarction in hypercholesterolaemic stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.24, p.344-348, 1997.

ITOKAWA, H.; ICHIRARA, Y.; KOJIMA, H.; WATANABE, K & TAKEYA, K. Norclerodane Diterpenes from *Croton cajucara*. **Phytochem.**, v.28, n.6, p.1667-1669, 1989.

IVERSEN, L.L. & SALT, P.J. Inhibition of catecholamine uptake₂ by steroids in the isolated rat heart. **Br. J. Pharmac.**, v.40, p.528-530, 1970.

IVERSEN, L.L.& WILSON, H.A. Inhibition of catecholamines uptake in isolated rat heart by haloalkylamines related to phenoxybenzamine. **Brit. J. Pharmacol.**, v.46, p.647-657, 1972.

- JUBERG, E.N.; MINNEMAN, K.P.; ABEL, P.W.. β_1 and β_2 adrenoceptor binding and functional response in right and left atria of rat heart. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v.330, p.193-202, 1985.
- KAUFMAN, L.N., M.M. PETERSON and S.M. SMITH. Hypertension and sympathetic hyperactivity induced in rats by high fat or glucose diets. **Am. J. Physiol.** (Endocrinol. Metab.): E95-E100, 1991.
- KAUMANN, A.J. The β_1 -adrenoceptor antagonist CGP20712A unmasks β_2 -adrenoceptors activated by (-)-adrenaline in rat sinoatrial node. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v.332, p.406-409, 1986.
- KAUMANN, A.J. Four β -adrenoceptor subtypes in the mammalian heart. **Trends in Pharmacological Science (TiPS)**, v.18, p.70-76, 1997.
- KAUMANN, A.J. and MOLENAAR, P. Modulation of human cardiac function through 4 β -adrenoceptor populations. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v.355, p.667-681, 1997.
- KENAKIN, T. **Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction**. New York: Raven Press, 2nd edition, 1993. 483 p.
- KOSKINEN, P.; KUPARI, M.; VIROLAINEN, J.; STJERNVALL, J., JOLKKONEN, J.; TUOMILEHTO, J. and TIKKANEN, M.J. Heart rate and blood pressure variability and baroreflex sensitivity in hypercholesterolaemia. **Clinical Physiology**, v.15, p.483-489, 1995.
- KRAUSS, R.M. Heterogeneity of plasma low-density lipoproteins and atherosclerosis risk. **Current Opinion in lipidology**, v.5, p.339-349, 1994.

- KUBO, I.; ASAKA, Y. & SHIBATA, K. Insect growth inhibitory nor-diterpenes, cis-dehydrocrotonin and trans-dehydrocrotonin, from *Croton cajucara*. **Phytochem.**, v.30, n.8, p.2545-2546, 1991.
- LEE, E.; BABA, A.; OHTA, A.; IWATA, H. Solubilization of adenylate cyclase of brain membranes by lipid peroxidation. **Biochim. Biophys. Acta**, v.689, p.370-374, 1982.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principles of biochemistry**. New York: Worth Publishers, 2nd edition, 1993. 1013p., p. 240-296, 479-503, 598-686.
- LEMOINE, H. and KAUMANN, A.J. Regional differences of β_1 - and β_2 -adrenoceptor-mediated functions in feline heart. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v.344, p.56-69, 1991.
- LEWIS, S.; BRISTOW, M.R.; LURIE, K.G.; MINOBE, W.A. and HOFFMAN, B.B. Uncoupling of myocardial beta adrenergic receptors in cholesterol fed rabbits. **Circulation**, 66, Suppl. II: II-207, 1982.
- LURIE, K.G.; CHIN, J.H. and HOFFMAN, B.B. Decreased membrane fluidity and β -adrenergic responsiveness in the atherosclerotic quail. **Am. J. Physiol.**, v.249 (Heart Circ. Physiol. 18), p.H380-H385, 1985.
- MA, X.L.; YUE, T.L.; LOPEZ, B.L.; BARONE, F.C.; CHRISTOPHER, T.A.; RUFFOLO, R.R.; FEUERSTEIN, G.Z. Carvelidol, a new beta-adrenoceptor blocker and free radical scavenger, attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in hipercholesterolemic rabbits. In: **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.277, n.1, p.128-136, 1996.
- MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; ARRUDA, A.C.; PAMPLONA, S.G.S.R.; VANDERLINDE, F.A.; LAPA, A.J.; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N.F.; CÔLUS, I.M.S.; FARIAS, R.A.F.; COSTA, A.M.L. and RAO, V.S.N.

- Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.70, p.41-55, 2000.
- MACKAY, D. How should values of pA_2 and affinity constants for pharmacological competitive antagonists be estimated? **J. Pharmac. Pharmacol.**, v.30, p.312-313, 1978.
- MAN, Z.W.; HIRASHIMA, T.; MORI, S.; KAWANO, K. Decrease in triglyceride accumulation in tissues by restricted diet and improvement of diabetes in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats, a non-insulin-dependent diabetes model. **Metabolism**, v.49, n.1, p.108-14, 2000.
- MARCONDES, F.K. **Influência do sexo e das fases do ciclo estral sobre a reação de estresse em ratos**. Campinas-UNICAMP, 1995. 58 p. Dissertação de Tese (Mestrado em Fisiologia). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- MARFO, E.K.; WALLACE, P.; TIMPO, G. and SIMPSON, B.K. Cholesterol lowering effect of jackbean (*Canavalia ensiformis*) seed protein. **Gen. Pharmac.**, v.21, n.5, p.753-757, 1990.
- MARINETTI, G.V. **Disorders of lipid metabolism**. New York: Plenum Press, 1990. 226 p.
- MINNEMAN, K.P.; PITTMAN, R.N. and MOLINOFF, P.B. β -Adrenergic receptor subtypes: properties, distribution and regulation. **Ann. Rev. Neurosci.**, v.4, p.419-461, 1981.
- MOKLER, C.M.; ABDEL-AZIZ, M.T. and HERIC, E. Effects of hypercholesterolemia on beta adrenoceptors in the rabbit heart. **Drug-Nutrient Interactions**, v.3, p.165-172, 1985.

- MOTOMURA, S.; ZERKOWSKI, H.R.; DAUL, A. and BRODDE, O.E. On the physiologic role of beta-2 adrenoceptors in the human heart: in vitro and in vivo studies. **Am. Heart J.**, v.119, p.608-619, 1990.
- OLIVEIRA, M.C.; BORRÁS, M.R.L.; SILVA, E.A. & ROLAND, I.A. Efeito da sacaca-Croton cajucara Bth. sobre os níveis plasmáticos de lipídeos em coelhos hipercolesterolêmicos. In: **Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), X**. Livro de Resumos, 1995. 224 p.
- PAIGEN, B.; A. MORROW; P.A.HOLMES; D.MITCHELL & R.A. WILLIAMS. Quantitative assessment of atherosclerosis lesion in mice. **Atherosclerosis**, v.68, p.231-240, 1987.
- PATTEN, G.; RINALDI, J.A. and McMURCHIE, E.J. Effects of dietary eicosapentaenoate (20:5 n-3) on cardiac beta-adrenergic receptor activity in the marmoset monkey. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.162, n.2, p.686-693, 1989.
- PETERS, S.L.M.; PFAFFENDOEFF, M.; VAN ZWIETEN, P.A. The influence of oxidative stress on various inotropic responses in isolated rat left atria. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v.355, p.390-397, 1997.
- PINTO, W.J. **Efeito de polpa de laranja/goma guar sobre aspectos do metabolismo lipídico, pressão arterial e frequência cardíaca em hamsters submetidos a dieta hipercolesterolêmica**. Campinas – UNICAMP, 1999. 89 p. Dissertação de Tese (Mestrado em Fisiologia). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- QUINTÃO, E.C.R. **Colesterol e aterosclerose**. Rio de Janeiro: Qualitymark, 1992. 276 p.
- RAIJ, L.; NAGY, J.; COFFEE, K.; DeMASTER, E.G. Hypercholesterolemia promotes endothelial dysfunction in vitamin E and selenium-deficient rats. **Hypertension**, v.22, p.56-61, 1993.

- RIBEIRO, C.A.F.; ALMEIDA, L.; PAIVA, I.; TAVARES, P.; CABRITA, S.; WULFROTH, P.; BEJA, M.L.M. and TEIXEIRA, F. Influence of 0.1 or 0.2% cholesterol enriched diets on the induction of atherosclerosis and aorta reactivity in vitro. **J. Cardiovasc Pharmacol.**, v.31, n.5, p.690-699, 1998.
- RUBATTU, S.; VOLPE, M.; ENEA, I.; RUSSO, R.; ROMANO, M.; TRIMARCO, B. Influence of hypercholesterolemia on adrenal steroid metabolism and electrolyte balance in spontaneously hypertensive rats. **Endocrinology**, v.133, n.5, p.2015-2021, 1993.
- SANDYK, R. & AWERBUCH, G.I. The relationship between melatonin secretion and serum cholesterol in patients with multiple sclerosis. **Intern. J. Neuroscience**, v.76, p.81-86, 1994.
- SATO, T.; MAGATA, K.; KOGA, N.; MITSUMOTO, Y. Defect of an early event of glucose metabolism in skeletal muscle of the male Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat, a non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) model. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.245, n.2, p.378-81, 1998.
- SCHILD, H.O. pA_2 and competitive drug antagonism. **Brit. J. Pharmacol.**, v.2, p.185-206, 1947.
- SIMÕES, J.C.; SILVA, A.R.J.; SERRUYA, H.; BENTES, M.H.S. Desidrocrotonina, uma norditerpeno de *Croton cajucara* Benth., (Euphorbiaceae). **Ciência e Cultura**, v.31, n.10, p.1140-1141, 1986.
- SIMPSON, P.; McGRATH, A. and SAVION, S. Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. **Circ. Res.**, v.51, p.787-801, 1982.

- SIMPSON, P.C.; KARIYA, K.; KARNS, L.R.; LONG, C.S. and KARLINER, J.S. Adrenergic hormones and control of cardiac myocyte growth. **Mol. Cell. Biochem**, v.104, p.35-43, 1991.
- SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. **Statistical methods**. Iowa: Iowa State University Press/AMES, 1989, 503 p.
- STROSBERG, A.D. Structural and functional diversity of β -adrenergic receptors. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.757, p.253-260, 1995.
- STROSBERG, A.D. and PIETRI-ROUXEL, F.. Function and regulation of the β_3 -adrenoceptor. **Trends in Pharmacological Sciences (TiPS)**, vol.17, p.373-381, 1996.
- SUCKLING, K.E. & STANGE, E. F., Role of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase in cellular cholesterol metabolism. **J. Lipid Res.**, v.26, p.647-671, 1985.
- SULTAN, F.; CARDONA-SANCLEMENTE, L.E.; LAGRANGE, D.; LUTTON, C. & GRIGLIO, S. Lipoprotein lipase and hepatic lipase activities in a hypercholesterolaemic (RICO) strain of rat. **Biochemical Journal**, v.266, p.349-353, 1990.
- TASKINEN, M.R., Insulin resistance and lipoprotein metabolism. **Current Opinion in Lipidology**, v.6, p.153-160, 1995.
- VAN DER BERG, M.E. **Plantas medicinais da Amazônia – Contribuição ao seu conhecimento sistemático**, Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, 223p., 1982.
- VANDERLEI, J.C.M. **Influência do ciclo estral e do estresse sobre a sensibilidade às catecolaminas em átrios de ratas**. Campinas-UNICAMP, 1996. 103 p. Dissertação de Tese (Mestrado em Fisiologia). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

- VAN ROSSUM, J.M. Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. **Arch. Int. Pharmacodyn.** v.143 (3/4), p.229-330, 1963.
- WALD, N.J.; LAW, M.R. Serum cholesterol and ischaemic heart disease. **Atherosclerosis**, v.118 (Suppl.), p.S1-S5, 1995.
- WANNAMETHEE, G. and SHAPER, A.G. The association between heart rate and blood pressure, blood lipids and other cardiovascular risk factors. **Journal of Cardiovascular Risk**, v.1, p.223-230, 1994.
- WHALEN, E.J.; LEWIS, S.J.. In vivo evidence that isoproterenol may increase heart rate in the rat by mechanisms in addition to activation of cardiac β_1 and β_2 -adrenoceptors. **European Journal of Pharmacology**, vol. 382, n.3, p.207-210, 1999.
- ZANESCO, A.; SPADARI-BRATFISCH, R.C. and BARKER, L.A.. Sino-aortic denervation causes right atrial *beta* adrenoceptor down regulation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.280, n.2, p.677-685, 1997.